

Cristina Manuela Pinto Vieira Lopes

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

**ACOPLAMENTO DE SISTEMAS DE FLUXO A EQUIPAMENTO DE
ESPECTROFOTOMETRIA ATÓMICA E ESPECTROMETRIA DE MASSA
APLICAÇÕES EM ANÁLISE ELEMENTAR EM QUÍMICA CLÍNICA**

**Dissertação de candidatura ao grau de doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

Universidade do Porto

Faculdade de Farmácia

Porto, 2008

Trabalho realizado no Serviço de Química-Física com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, concedido no âmbito do Programa Operacional Ciência Tecnologia Inovação (POCTI) do III Quadro Comunitário de Apoio.

Índice

Agradecimentos	vi
Resumo	ix
Abstract	x
Résumé	xi

Capítulo 1

1. Introdução	2
1.1. Importância da análise elementar em Química Clínica	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Elementos essenciais	4
1.2. Química Clínica: necessidade de evoluir	6
1.2.1. Química Clínica e Automatização/Fluxo	7
1.2.1.1 Fluxo segmentado	7
1.2.1.2 Fluxo não segmentado	9
1.2.1.2.1 <i>Análise por injeção em fluxo</i>	9
1.2.1.2.2 <i>Análise por injeção sequencial</i>	10
1.2.1.2.3 <i>Multicomutação</i>	13
1.2.1.2.4 <i>Multi-seringa</i>	17
1.2.1.2.5 <i>Lab-on-valve</i>	22
1.2.1.2.6 <i>Multi-impulsão</i>	25
1.2.2. Química Clínica e Espectrofotometria	29
1.2.2.1 A importância da espectrofotometria atômica em Química Clínica	29
1.2.2.2 Princípios básicos da espectrofotometria de absorção atômica	30
1.2.2.3 Técnicas de espectrofotometria atômica	32
1.2.2.3.1 <i>Fotometria de chama</i>	32
1.2.2.3.2 <i>Espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama</i>	32
1.2.2.3.2.1 <i>Interferências em EAA/chama</i>	36
1.2.2.3.2.2 <i>Sistemas de fluxo e EAA/chama</i>	38
1.2.2.3.3 <i>EAA com atomização electrotérmica</i>	40
1.2.2.3.3.1 <i>Interferências em EAA/atomização electrotérmica</i>	42
1.2.2.3.3.2 <i>Sistemas de fluxo e EAA/atomização electrotérmica</i>	44
1.2.2.3.4 <i>Espectrofotometria de emissão atômica em plasma</i>	45
1.2.2.3.4.1 <i>Interferências em ICP-AES</i>	49
1.2.2.3.4.2 <i>Sistemas de fluxo e ICP-AES</i>	50
1.2.2.3.5 <i>Espectrometria de plasma - massa</i>	51

1.2.2.3.5.1 Introdução da amostra	54
1.2.2.3.5.2 Plasma de acoplamento indutivo	65
1.2.2.3.5.3 Interface ICP – Espectrómetro de massa	70
1.2.2.3.5.4 Lentes iónicas	71
1.2.2.3.5.5 Espectrómetro de massa	75
1.2.2.3.5.6 Detector	82
1.2.2.3.5.7 Interferências e padrão interno em ICP-MS.....	85
1.2.2.3.5.8 Diluição isotópica e razão isotópica	86
1.2.2.3.5.9 Sistemas de fluxo e ICP-MS	87
1.3. Enquadramento e objectivos gerais do trabalho	89
1.4. Bibliografia.....	92

Capítulo 2

2. Parte experimental: aspectos gerais.....	2
2.1. Introdução.....	2
2.2. Reagentes e soluções.....	2
2.3. Material de laboratório de uso corrente	3
2.4. Instrumentação	5
2.4.1. Espectrofotómetros de absorção atómica.....	5
2.4.2. Fotómetros.....	6
2.4.3. Equipamento de ICP-MS.....	6
2.4.4. Forno de microondas	7
2.5. Componentes básicos das montagens de fluxo.....	7
2.5.1. Dispositivos responsáveis pela introdução, pelo transporte e pela definição do trajecto dos líquidos nos sistemas de fluxo	8
2.5.1.1 Bombas peristálticas	8
2.5.1.2 Bombas de pistão	9
2.5.1.3 Micro-bombas solenóides	10
2.5.1.4 Válvulas solenóides	11
2.5.1.5 Válvulas multi-posição selectoras de fluidos	13
2.5.2. Tubagem e outros componentes dos sistemas de fluxo.....	14
2.6. Optimização do funcionamento dos sistemas de fluxo.....	15
2.7. Avaliação das metodologias analíticas desenvolvidas	16
2.7.1. Métodos estatísticos de avaliação	16
2.8. Outras avaliações e informações relevantes.....	19
2.9. Referências bibliográficas	22

Capítulo 3

3. Determinação de Rb por espectrofotometria atômica	2
3.1. Introdução	2
3.2. Parte experimental	9
3.2.1. Instrumentação	9
3.2.2. Material e Reagentes	10
3.2.3. Sistema de fluxo	10
3.3. Resultados e discussão	12
3.3.1. Desenvolvimento do sistema de fluxo	12
3.3.2. Optimização dos parâmetros experimentais	16
3.3.3. Características do sistema de fluxo	23
3.4. Conclusões	29
3.5. Bibliografia	31

Capítulo 4

4. Fluxo pulsado e espectrofotometria atômica com atomização em chama: estudos preliminares e aplicação analítica	2
4.1. Introdução	2
4.1.1. Fluxo pulsado e espectrofotometria atômica com atomização em chama: estudos preliminares	2
4.1.2. Fluxo pulsado e espectrofotometria atômica com atomização em chama: aplicação analítica	4
4.1.2.1 Determinação de Ca e Mg em digestos de amostras de cabelo	4
4.1.2.2 Determinação Na em amostras de urina	7
4.2. Experimental	8
4.2.1. Instrumentação	8
4.2.2. Material e Reagentes	9
4.2.3. Preparação das amostras	10
4.2.3.1 Amostras de cabelo	10
4.2.3.1 Amostras de urina	11
4.2.4. Sistemas de fluxo	12
4.2.4.1 Determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo	12
4.2.4.2 Determinação de Na em amostras de urina	12
4.3. Resultados e discussão	14
4.3.1. Estudos preliminares	14
4.3.1.1 Introdução contínua de amostra	14
4.3.1.2 Introdução de um segmento de amostra	17
4.3.2. Aplicações analíticas	23

4.3.2.1 Determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo	23
4.3.2.2 Determinação de Na em amostras de urina	29
4.4. Conclusões	36
4.5. Bibliografia.....	37

Capítulo 5

5. Determinação sequencial de Cu em amostras de soro e de urina por EAA/Chama	2
5.1. Introdução.....	2
5.2. Experimental	6
5.2.1. Instrumentação.....	6
5.2.2. Material e Reagentes.....	8
5.2.3. Preparação das amostras e das soluções de calibração	10
5.2.3.1 Urina	10
5.2.3.2 Soro.....	12
5.2.4. Sistema de fluxo.....	13
5.2.4.1 Módulo I - determinação de CuS	13
5.2.4.1.1 Lavagem do canal da amostra de soro	13
5.2.4.1.2 Determinação do CuS	14
5.2.4.2 Módulo II - determinação de CuU	14
5.2.4.2.1 Lavagem do canal da amostra	14
5.2.4.2.2 Pré-concentração do CuU	15
5.2.4.2.3 Eluição da coluna de pré-concentração e determinação do CuU	15
5.2.4.2.4 Condicionamento da coluna de pré-concentração	15
5.3. Resultados e discussão	16
5.3.1. Desenvolvimento e otimização do sistema de fluxo	16
5.3.1.1 Determinação de CuS (módulo I).....	16
5.3.1.2 Determinação de CuU (módulo II)	18
5.3.2. Características do sistema de fluxo.....	25
5.3.2.1 Determinação de CuS (módulo I).....	25
5.3.2.2 Determinação de CuS (módulo II).....	28
5.4. Conclusões	32
5.5. Bibliografia.....	34

Capítulo 6

6. Determinação de Rh, Pd e Pt em amostras de urina por ICP-MS.....	2
6.1. Introdução.....	2
6.2. Experimental	9

6.2.1. Instrumentação.....	9
6.2.2. Material e Reagentes.....	12
6.2.3. Sistema de fluxo.....	13
6.3. Resultados e discussão	15
6.3.1. Desenvolvimento e otimização do sistema de fluxo	15
6.3.1.1 Pré-concentração dos PGEs	15
6.3.1.1.1 Acidificação das amostras	15
6.3.1.1.2 Coluna.....	17
6.3.1.1.3 Caudal.....	18
6.3.1.1.4 Volume de amostra.....	19
6.3.1.1.5 Tamponamento e pré-tratamento da amostra	20
6.3.1.2 Lavagem do sistema de fluxo após a etapa de pré-concentração	21
6.3.1.3 Eluição.....	23
6.3.1.3.1 Composição do eluente.....	23
6.3.1.3.2 Temperatura do eluente	26
6.3.1.3.3 Caudal do eluente	26
6.3.1.4 Adição de padrão interno.....	27
6.3.1.5 Condicionamento da coluna de pré-concentração.....	28
6.3.1.6 Metais coexistentes.....	29
6.3.2. Características do sistema de fluxo.....	30
6.4 Conclusões	33
6.5. Bibliografia.....	35

Capítulo 7

7. Considerações finais	2
-------------------------------	---

Agradecimentos

Para mim, em alturas como esta, agradecer é difícil... Não porque seja avessa à utilização de palavras de agradecimento, mas porque fico sempre com a nítida sensação que elas nunca reflectem fielmente a grandeza real do sentimento de gratidão, que sendo adimensional nos impede de ter a noção do quanto agradecemos e de se o fizemos em “quantidade” suficiente. Além disso, derivado da longa-duração de um doutoramento e de serem tantas as pessoas com quem nos cruzamos ao longo de todo esse processo (pessoas que desempenham um papel para nós importante, ainda que muitas vezes limitado no tempo), há a acrescer o facto de invariavelmente acontecer esquecermo-nos de agradecer a alguém a quem é imperdoável não agradecer. Contudo, imperdoável mesmo, é nem sequer tentar agradecer e, por isso, queria apresentar os meus mais sinceros agradecimentos:

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela concessão de uma bolsa de doutoramento e de outros apoios financeiros, no âmbito do POCTI do III Quadro Comunitário de Apoio, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de doutoramento.

Ao Prof. Doutor José Luís Costa Lima, em primeiro lugar, por me ter dirigido o convite e insistido para que eu embarcasse nesta viagem que me permitiu alargar os meus horizontes e certamente mudar o meu destino. Depois, pela co-orientação, por todo o apoio, quer o moral quer o financeiro, e por toda disponibilidade sempre demonstrada para me ajudar.

Ao Prof. Doutor Agostinho Almeida, com quem muito aprendi, por ter aceitado orientar esta tese, mas também pelo seu espírito crítico, de análise, de intervenção criteriosa, honesta, documentada e incisiva que contribuiu de modo muito significativo para melhorar a minha experiência enquanto estudante de doutoramento.

À Facultad de Ciencias da Universidad de Valladolid, concretamente ao Prof. Doutor Enrique Barrado, por ter partilhado comigo o seu gabinete e o seu conhecimento científico e de vida. Ainda, por todo o apoio que sempre me concedeu, mesmo após o meu regresso a Portugal.

A todos os Professores do Serviço de Química-Física e a todos aqueles com quem eu “partilhei” o laboratório, sem excepção, na medida em que todos, numa ou noutra altura, directa ou indirectamente, contribuíram de algum modo para que este trabalho fosse possível. Além disso, agradeço ainda de um modo geral terem-me proporcionado muitos momentos de prazer, de estima e de salutar convívio.

Merecem contudo um agradecimento especial os seguintes:

Prof. Doutora Conceição Montenegro, pela amizade, por ter acreditado em mim e ter sido a alavanca impulsionadora de muitas mudanças agradáveis na minha vida.

Prof. Doutor João Luís Santos, pela participação muito activa nos trabalhos desenvolvidos. Graças aos seus empurrões (os científicos e os outros) fui seguindo em frente.

Prof. Doutora Lúcia Saraiva, por me ajudar a lidar com o lado temperamental da estratégia de fluxo de SIA.

Prof. Doutor Alberto Araújo, pelas dicas (várias) sobre emissão e absorção atómica, entre outras.

Prof. Doutor Rui Lapa, por ter sido algumas vezes o Dr. House do controlo informático dos vários sistemas de fluxo, descobrindo sempre a causa da “doença” e o “tratamento” eficaz.

Eng. Bartolomeu Pereira e Eng. Paulo Lira, por toda a disponibilidade para “me” socorrerem de modo imediato.

Manuela Barros, pela diligência com que tratou sempre os vários pedidos de reagentes/material urgente.

Os meus amigos: Adriana Pimenta; Célia Amorim; Christophe Siquet; David Costa; Emília Santos; João Prior; José António Rodríguez; Karine Marques; Marieta Passos; Marlene Lúcio; Paula Pinto; Pedro Maia; Rodrigo Santos e Sofia Costa Lima, por... por

tanta coisa! Não conseguiria lembrar-me de algo em particular para agradecer a cada um individualmente, na medida em que todos desempenharam um papel muito importante na realização deste trabalho e na minha vida. Pelos momentos de lazer, de boa disposição, de ajuda, de confissão, de partilha, ... por estarem sempre lá, na alegria e na tristeza!

À minha ex-chefe e grande amiga Maria Reis, que quase fez do meu objectivo o seu tendo-me ajudado a alcançá-lo.

À minha amiga Sofia Diogo, psicóloga de serviço, por toda a energia positiva transmitida à hora do café.

E, depois, à minha família.

A família tem sempre um papel importante nas nossas conquistas. É sempre a família que nos apoia de forma incondicional na realização dos nossos objectivos. Neste contexto, merecem especial referência os meus pais, a quem tudo devo, e os meus sogros. A ambos agradeço por me ouvirem e pela forma ponderada e sábia com que sempre me ajudaram a analisar todas as situações, e também pelo inestimável contributo (ainda que apenas indirecto) para a concretização deste trabalho.

Também à Isabel, minha cunhada e acima de tudo amiga, o meu agradecimento pelo tempo de antena que me dispensou para o alívio do stress de doutoramento.

E, claro, um agradecimento muito especial às duas pessoas que tiveram o azar de partilhar casa comigo durante este longo período de tempo do meu doutoramento e que, por isso, tantas vezes acompanharam de muito perto as minhas variações de humor entre o mau e o muito mau: à Rosário e ao João Pedro (por todas as razões, co-autor deste trabalho), a quem eu agradeço pela paciência, pela compreensão, pela força e por toda a ajuda.

Por fim, e de uma forma geral, o meu sincero “MUITO OBRIGADA” a todos aqueles que sempre me fizeram acreditar que era possível!

Resumo

Nesta dissertação descrevem-se vários sistemas de fluxo, desenvolvidos com o objectivo de permitirem efectuar em linha alguns tipos de pré-tratamento da amostra muito comuns na análise laboratorial, visando contribuir para facilitar a aplicação e expandir as potencialidades analíticas da espectrofotometria atómica e da espectrometria de massa em análise elementar, em Química Clínica.

No Capítulo de Introdução a esta dissertação é feita uma descrição sumária do interesse da análise elementar inorgânica no contexto da Química Clínica e descrevem-se as estratégias de fluxo e as técnicas instrumentais mais comumente utilizadas para esse fim, com especial destaque para a descrição dos conceitos e princípios básicos da técnica de ICP-MS.

No trabalho experimental descrito nos primeiros três primeiros Capítulos foram utilizadas técnicas de espectrofotometria atómica e foram empregues diferentes estratégias de fluxo, nomeadamente multicomutação e multi-impulsão. Concretamente, construíram-se sistemas capazes de adequarem, em linha, a concentração do analito ao intervalo de resposta instrumental linear, quer por meio de procedimentos de diluição, quer por meio de procedimentos de pré-concentração. No primeiro trabalho descrito envolvendo multi-impulsão, são apresentados ainda os resultados obtidos no estudo da influência exercida por um fluxo pulsado, característico daquele tipo de sistemas, sobre os processos de aspiração e nebulização das soluções próprios do equipamento de espectrofotometria atómica.

No trabalho apresentado no último Capítulo descreve-se um sistema de SIA que permite a separação/pré-concentração dos analitos, neste caso PGEs, a partir de amostras de urina, de modo a serem posteriormente quantificados por ICP-MS, com um analisador de massas do tipo quadrupolo.

Abstract

In this dissertation several flow systems are described, which were developed in order to allow performing on line some sample pretreatments that are very common in laboratory analysis. These flow systems were intended to allow an easier application and expansion of the analytical potentialities of atomic spectrophotometry and mass spectrometry in elemental analysis, in Clinical Chemistry.

In the Chapter of Introduction to this dissertation a brief description of the interest of the inorganic elemental analysis in Clinical Chemistry context is made, and flow strategies and the instrumental techniques more commonly used for that purpose are described, giving special emphasis to the description of the concepts and basic principles of ICP-MS technique.

In the experimental work described in the first three Chapters, atomic spectrophotometric techniques were used and different flow strategies were employed, namely multicommutation and multipumping. Concretely, flow systems capable of adjusting, on line, the concentration of the analyte to the instrumental linear range, either by means of dilution procedures or by means of preconcentration procedures, were assembled. In the first work described involving multipumping, the results obtained in the study on the influence exerted by a pulsed flow, which is a feature of that type of systems, in the process of solutions' aspiration and nebulization that are characteristic of atomic spectrophotometry equipment, are also presented.

In the work presented in the last Chapter, a SIA flow system that allows the separation/preconcentration of the analytes, which in this case are PGEs, from urine samples, in order to allow their subsequent quantification by ICP-MS with quadrupole mass analyzer, is described.

Résumé

Cette dissertation traite de plusieurs systèmes de flux développés dans le but de permettre, en ligne, certains types de pré-traitement d'un échantillon très communs en analyse de laboratoire. Cette thèse désire contribuer à faciliter l'application et à étendre les potentialités analytiques, en chimie clinique, de la spectrométrie atomique et de la spectrométrie de masse.

Le chapitre d'introduction à cette dissertation contient une description sommaire de l'intérêt de l'analyse élémentaire inorganique dans le contexte de la chimie clinique ainsi qu'une description des stratégies de flux et des techniques instrumentales communément utilisées à cette fin, avec une attention spéciale à la description des concepts et principes basiques de la technique de spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).

Des techniques de spectrométrie atomique et différentes stratégies de flux, notamment la multi-commutation et la multi-impulsion, sont décrites dans le travail expérimental des trois premiers chapitres.

Concrètement, des systèmes ont été construits afin d'adapter, en ligne, la concentration de l'analyte à l'intervalle de réponse linéaire instrumentale soit par dilution soit par pré-concentration.

Les résultats obtenus de l'étude de l'influence exercée par un flux pulsé, caractéristique de ces types de systèmes, sur les processus d'aspiration et de nébulisation des solutions, propres des équipements de spectrométrie atomique, sont présentés dans le premier travail décrit.

Le travail présenté au dernier chapitre décrit un système d'analyse à injection séquentielle (SIA) qui permet la séparation/pré-concentration des analytes, PGE's dans ce cas, à partir d'échantillons d'urine, afin d'être postérieurement quantifiés par ICP-MS équipé d'un analyseur de masses de type quadrupole.

A decorative graphic consisting of three overlapping squares: a light gray square at the top left, a black square in the middle, and a white square at the bottom left containing the chapter title.

Capítulo

1

Introdução

1. Introdução

1.1. Importância da análise elementar em Química Clínica

1.1.1. Generalidades

A abundância relativa dos vários elementos químicos na crosta terrestre adveio dos fenómenos físico-químicos que ocorreram imediatamente após o “*Big Bang*”. “Forçados” pela selecção natural, os sistemas biológicos tiveram de se adaptar aos elementos químicos presentes no local onde habitavam, a fim de conseguirem sobreviver. Assim, a selecção natural conduziu à optimização da utilização dos elementos químicos pelos sistemas biológicos (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994).

Em termos gerais, pode dizer-se que os elementos existentes na crosta terrestre, representados na tabela periódica (Figura 1.1), se dividem em dois grupos: i) os elementos (relativamente) abundantes, do H ao Ca, excluindo o Li, Be e B (H, C, N, O, F, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K e Ca) e ii) os elementos vestigiais, a partir do V, excluindo o Fe (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994).

No organismo humano, há maior abundância de elementos solúveis, com capacidade para formar sais, de baixo peso atómico (Na, K, Ca e Mg); de não metais, que podem formar moléculas orgânicas estáveis do ponto de vista cinético (H, C, O, F, Si, P, S, Cl) e de um metal com capacidade de intervir em reacções de oxidação/redução, o Fe (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). Genericamente, os fluidos corporais são soluções de electrólitos (sais) que contêm combinações de elementos de baixo peso atómico, de não-metais e de compostos orgânicos. O Na e o K são os elementos envolvidos na manutenção do equilíbrio hidroelectrolítico, uma vez que não se ligam a moléculas orgânicas. O Ca e o Mg são os elementos envolvidos em

funções de “carácter electromecânico” (por exemplo, funcionamento do músculo cardíaco, formação dos ossos e dentes), uma vez que se ligam fortemente a moléculas orgânicas e não estão sujeitos a modificações covalentes nem a alterações do estado redox. Os elementos com um peso atómico superior, excluindo o Fe, devido à sua pouca abundância, são elementos vestigiais, estando muitos deles especializados numa função específica. Estes elementos encontram-se essencialmente ligados a proteínas (enzimas), funcionando como co-factores. De facto, a maioria dos elementos vestigiais são constituintes de metaloenzimas e participam em actividades como o transporte de oxigénio, a eliminação de radicais livres, a organização estrutural de macromoléculas e a regulação da actividade hormonal (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). Outros elementos vestigiais, como Al, As, Cd, Hg e Pb (e mesmo os elementos essenciais se numa quantidade superior à necessária para o normal funcionamento do organismo), apresentam conhecidos efeitos tóxicos para a saúde humana. Recentemente passou a existir ainda uma preocupação acrescida acerca das possíveis consequências para a saúde humana de outros “novos” elementos como a Pt, Rh, Pd, Ga ou o Ir, actualmente muito utilizados na indústria electrónica e em conversores catalíticos.

1 H 1.00797																	2 He 4.002602														
3 Li 6.939																	4 Be 9.0122														
11 Na 22.9898																	12 Mg 24.312														
19 K 39.102	20 Ca 40.08															21 Sc 44.956	22 Ti 47.90	23 V 50.942	24 Cr 51.996	25 Mn 54.9380	26 Fe 55.847	27 Co 58.9332	28 Ni 58.71	29 Cu 63.54	30 Zn 65.37	31 Ga 69.72	32 Ge 72.59	33 As 74.9216	34 Se 78.96	35 Br 79.904	36 Kr 83.80
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62															39 Y 88.905	40 Zr 91.22	41 Nb 92.906	42 Mo 95.94	43 Tc (99)	44 Ru 101.07	45 Rh 102.905	46 Pd 106.4	47 Ag 107.870	48 Cd 112.40	49 In 114.82	50 Sn 118.69	51 Sb 121.75	52 Te 127.60	53 I 126.904	54 Xe 131.30
55 Cs 132.905	56 Ba 137.34	57 La 138.91	58 Ce 140.12															59 Pr 140.907	60 Nd 144.24	61 Pm (147)	62 Sm 150.35	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.924	66 Dy 162.50	67 Ho 164.930	68 Er 167.26	69 Tm 168.934	70 Yb 173.04	71 Lu 174.97	
87 Fr (223)	88 Ra (226)	89 Ac (227)	90 Th (232)	91 Pa (231)	92 U 238.03	93 Np (237)	94 Pu (242)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (249)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)															

* 58 Ce 140.12	59 Pr 140.907	60 Nd 144.24	61 Pm (147)	62 Sm 150.35	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.924	66 Dy 162.50	67 Ho 164.930	68 Er 167.26	69 Tm 168.934	70 Yb 173.04	71 Lu 174.97
† 90 Th 232.038	91 Pa 231	92 U 238.03	93 Np (237)	94 Pu (242)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (249)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)

Figura 1.1

Tabela periódica dos elementos químicos.

Nas células, os diversos elementos encontram-se preferencialmente em diferentes compartimentos (Tabela 1.1). Na membrana celular podemos encontrar canais iónicos que permitem a movimentação de iões entre os diferentes compartimentos, permitindo o estabelecimento de gradientes de concentração entre o conteúdo dos meios intracelular e extracelular e, desse modo, a manutenção da homeostase e o normal funcionamento do organismo. Estes canais funcionam como filtros altamente selectivos, e desde há alguns anos vêm sendo aproveitados como local para a actuação de moléculas farmacologicamente activas.

Tabela 1.1

Localização preferencial dos metais.

Meio extracelular	Meio intracelular	Citoplasma
Na, Ca, Cu, Mo, Al	K, Mg, Fe, Co, Zn, Ni, Mn, Se	K, Mg, Co, Zn, Se

Apesar do progresso que se tem verificado ao nível da investigação dos elementos vestigiais e do conhecimento acerca das suas funções no organismo, o seu papel no estado de saúde e de doença ainda não é suficientemente claro. Na verdade, ainda hoje, o metabolismo, a distribuição dos elementos nos diferentes tecidos e fluidos biológicos, a especiação e as relações dinâmicas entre os vários elementos não são totalmente conhecidos (Bolann *et al.*, 2007; Patriarca *et al.*, 1998).

1.1.2. Elementos essenciais

Noventa e oito por cento da massa corporal humana é constituída por nove elementos não-metais e 1,89% é constituída pelos electrólitos Na, K, Mg e Ca (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). Os elementos vestigiais típicos representam apenas 0,012% do peso corporal (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). Contudo, a determinação de elementos vestigiais é de reconhecida

utilidade uma vez que, como já foi referido, muitos deles desempenham funções importantes nos processos biológicos do organismo humano, sendo por isso essenciais.

Um elemento é considerado essencial se for necessário ao normal funcionamento do organismo e à manutenção do estado de saúde. Mesmo alguns elementos reconhecidamente tóxicos podem, em quantidades ultravestigiais, ser essenciais ao normal funcionamento do metabolismo celular (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). Na Tabela 1.2 apresentam-se os elementos que são mais unanimemente considerados essenciais para o organismo humano. Dentro deste grupo de elementos podemos encontrar quatro metais de baixo peso atómico (Na, K, Ca e Mg) e dez metais de peso atómico mais elevado. Para além destes dez elementos metálicos, há cerca de 20-30 outros que ainda não são comprovadamente considerados essenciais apesar de serem uma presença constante nos seres vivos. Esta presença poderá resultar exclusivamente da exposição ambiental e, por isso, estes metais são muitas vezes designados de metais vestigiais “acidentais” (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994).

Tabela 1.2

Elementos essenciais para o organismo humano.

Elementos maioritários		Elementos vestigiais
Não-metais	Electrólitos	
H, C, N, O, P, S	Na, K, Mg, Ca, Cl	F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn, I

1.2. Química Clínica: necessidade de evoluir

A Química Clínica é uma aplicação da Química que visa essencialmente contribuir para o aumento do conhecimento acerca da influência de parâmetros de natureza química e bioquímica na fisiopatologia das doenças. De uma forma genérica, tem como principais objectivos contribuir para o diagnóstico da doença e para a avaliação da sua gravidade, e para a monitorização da progressão da doença e da resposta do organismo, quer à própria doença quer ao tratamento. Nesse sentido, muito do trabalho realizado nos laboratórios de Química Clínica envolve a determinação em amostras de tecidos e fluidos biológicos de, por exemplo: i) parâmetros de natureza bioquímica, como as hormonas, as enzimas e outras proteínas, os hidratos de carbono e os lípidos; ii) minerais (Na, K, Ca, Mg, etc.) e iii) elementos vestigiais (i.e., elementos cuja concentração no organismo humano é inferior a 0,01% do seu peso seco) (Geldmacher-von Mallinckrodt e Meissner, 1994). A determinação de elementos vestigiais permite, por exemplo, o diagnóstico de doenças associadas a deficiências ou a intoxicações, a monitorização do tratamento dessas mesmas deficiências ou intoxicações e a monitorização de tratamentos envolvendo fármacos contendo elementos metálicos, como é o caso de diversos agentes antineoplásicos.

Em 1950, nos laboratórios mais desenvolvidos, a determinação de sódio e de potássio em fluidos biológicos já era feita por fotometria de chama (Willis, 1999). No entanto, a determinação de outros metais era muito mais difícil e menos prática como, por exemplo, a determinação de cálcio pelo método de Kramer e Tisdall (Willis, 1999). De facto, esta determinação envolvia a precipitação de cálcio com oxalato, dissolução do precipitado em ácido sulfúrico e posterior titulação com uma solução de permanganato. Havia outras alternativas para a determinação de cálcio, como a titulação com EDTA ou o uso da técnica de fotometria de chama, mas eram igualmente morosas (Willis, 1999). Além disso, a precisão dos resultados dependia

muito da capacidade que os técnicos tinham para reproduzir exactamente as condições em que os mesmos eram obtidos (Willis, 1999).

Entretanto, o aumento do número e tipo de solicitações resultantes da evolução da Medicina tornou impossível, aos Químicos Clínicos, continuar a usar as metodologias analíticas clássicas. Quanto mais aumentava o número de análises, mais era evidente a imprecisão e inexactidão dos resultados obtidos (Willis, 1999). A solução passava, por um lado, pela mecanização de vários procedimentos utilizados correntemente nos laboratórios de Química Clínica e, por outro, pela descoberta de novas técnicas analíticas capazes de permitir a análise das amostras com um menor grau de manipulação prévia (pré-tratamento).

1.2.1. Química Clínica e Automatização/Fluxo

1.2.1.1 Fluxo segmentado

Um ponto de viragem na história da Química Clínica foi o desenvolvimento de equipamento analítico baseado num sistema de fluxo segmentado, por Leonard Skeggs (Skeggs, 1957). A *Technicon Instrument Corporation* foi pioneira nesta matéria, comercializando o “*AutoAnalyzer*” em 1957. Do ponto de vista dos analistas clássicos, o aparecimento do *AutoAnalyzer* não seria bem recebido; no entanto, de um ponto de vista prático, a possibilidade que este equipamento criou de efectuar um maior número de análises no mesmo espaço de tempo, com razoável reprodutibilidade, era muito atractiva. Além disso, o *AutoAnalyzer* não era como uma simples “caixa preta”, pelo contrário, permitia ao analista improvisar e manter uma grande influência sobre os procedimentos analíticos.

Desde o aparecimento da estratégia de análise por fluxo segmentado (SFA, do inglês *Segmented Flow Analysis*) que a investigação em Química Clínica se tem centrado na automatização de metodologias analíticas clássicas, procurando melhorar vários

parâmetros, como precisão, exactidão, sensibilidade, selectividade, segurança e custos da análise.

Em Química Clínica, o termo automatização é muitas vezes empregue em substituição do termo mecanização. No entanto, esta substituição não é correcta caso o equipamento não seja capaz de “auto-ajustar” alguns parâmetros, interferindo desse modo na realização da análise por mecanismos de *feedback*. Contudo, como o objectivo final é a automatização e a maioria dos equipamentos hoje em dia já dispõem de um microprocessador interno, não há muitas razões para se censurar a utilização do termo, pelo que nesta dissertação se utilizará sempre o termo automatização.

O fundamento da SFA assenta na aspiração de um volume reduzido de amostra para um sistema tubular, ao longo do qual irão ocorrer vários processos, e que termina com o acoplamento, em fim de linha, a um equipamento de detecção (Figura 1.2). A identidade das amostras neste tipo de sistemas é assegurada através da sua separação com segmentos de ar, os quais são removidos imediatamente antes da sua chegada ao detector. As determinações efectuadas recorrendo a esta estratégia ocorrem em condições de equilíbrio químico e físico.

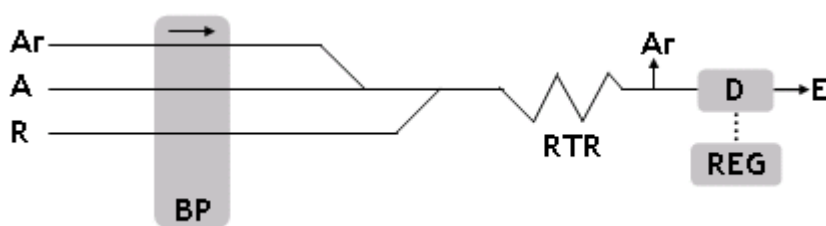


Figura 1.2

Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Fluxo Segmentado (SFA). Legenda - Ar: ar; A: amostra; R: reagente; BP: bomba peristáltica; RTR: reactor de transporte/reacção; D: detector; REG: registador; E: esgoto.

No entanto, as estratégias de fluxo contínuo, não segmentado, são hoje as mais utilizadas, pelo que serão discutidas com mais detalhe a seguir.

1.2.1.2 Fluxo não segmentado

1.2.1.2.1 Análise por injeção em fluxo

A primeira estratégia de fluxo não segmentado foi a análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) (Ruzicka e Hansen, 1975). Na altura, a característica mais interessante deste tipo de estratégia, do ponto de vista conceptual, era o facto das determinações não se efectuarem em condições de equilíbrio químico e físico, contrariamente ao que sucedia em SFA. Nesta nova estratégia (FIA), era feita a intercalação rápida e precisa de um pequeno volume de amostra num transportador, não segmentado por ar, que fluía continuamente num sistema tubular (Figura 1.3). Ao longo do transporte, por fluxo laminar, da amostra em direcção ao detector, esta ia-se dispersando no transportador, podendo inclusivamente reagir com este, gerando-se um gradiente de concentração do analito. A chegada ao detector traduzia-se num sinal transiente (um “pico”) que reflectia esse gradiente de concentração.

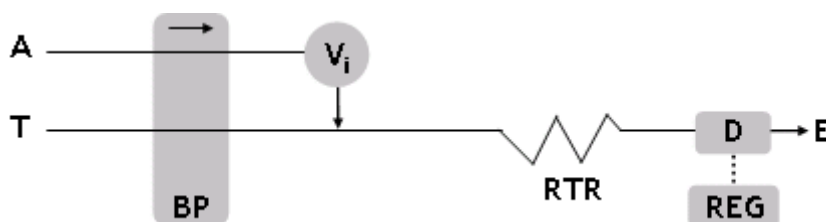


Figura 1.3

Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Legenda - A: amostra; T: solução transportadora; Vi: dispositivo de intercalação da amostra; BP: bomba peristáltica; RTR: reactor de transporte/reacção; D: detector; REG: registador; E: esgoto.

A estratégia de FIA veio permitir a construção de sistemas de fluxo capazes de automatizar as várias operações que normalmente antecedem a etapa de detecção do analito, como adição de reagentes (Fernandes *et al.*, 1997), diálise (Van Staden e Hattingh, 1995), digestão (Xiang *et al.*, 2000), diluição (Wabner e Sears, 1996),

extracção líquido-líquido (Almendral *et al.*, 2004), extracção sólido-líquido (Dadfarnia *et al.*, 2007) e precipitação (Plamboeck *et al.*, 2003), entre outras.

O controlo dos sistemas de FIA não tem necessariamente de se efectuar por meio de um programa informático, o que distingue esta estratégia das que surgiram posteriormente. Além disso, os sistemas de FIA apresentam, por norma, uma configuração simples, embora sejam robustos e capazes de produzir resultados precisos e exactos. Porém, apresentam também significativas desvantagens, das quais se destacam: i) elevado consumo de reagentes, originado pela necessidade de impulsão contínua dos mesmos; ii) necessidade de um canal para cada solução, o que pode, dependendo da determinação em causa, complicar a configuração dos sistemas e iii) necessidade de se proceder a uma reconfiguração do sistema de fluxo para diferentes determinações analíticas.

1.2.1.2.2 *Análise por injeccção sequencial*

Em 1990, surgiu a estratégia de fluxo designada análise por injeccção sequencial (SIA, do inglês *Sequential Injection Analysis*), que permitia a construção de sistemas de fluxo mais versáteis relativamente à FIA, embora também simples e robustos (Ruzicka e Marshall, 1990). O princípio de operação dos sistemas de SIA reside no controlo temporizado, por intermédio de um programa informático, de uma válvula multi-posição selectora de fluidos e de um dispositivo responsável pela gestão (isto é, propulsão/aspiração) dos mesmos que, por exemplo, pode ser uma bomba peristáltica ou uma bomba de pistão (Figura 1.4). Este dispositivo possibilita o movimento bidireccional de cada um dos fluidos que acede ao chamado “tubo de armazenamento” através da válvula sendo que, por norma, nenhum desses fluidos chega a atingi-lo.

Em traços gerais, a SIA baseia-se na aspiração sequencial de um volume preciso de diferentes soluções através da válvula multi-posição selectora de fluidos, por

selecção do canal (“porta”) respectivo. Segmentos intercalados dessas soluções, que de ora em diante chamaremos de amostra e reagente, acumulam-se no tubo de armazenamento até que a válvula multi-posição selectora de fluidos mude para dar acesso ao canal ao qual se encontra ligado o detector. Nessa altura, o dispositivo responsável pela gestão de fluidos reverte o sentido inicial do fluxo. A inversão do sentido de fluxo durante o transporte dos segmentos de amostra e de reagente em direcção ao detector, devido aos fenómenos de dispersão axial e radial, conduz à formação de uma zona de sobreposição daqueles dois segmentos, que ao chegar ao detector origina um sinal transiente de magnitude proporcional à concentração do analito.

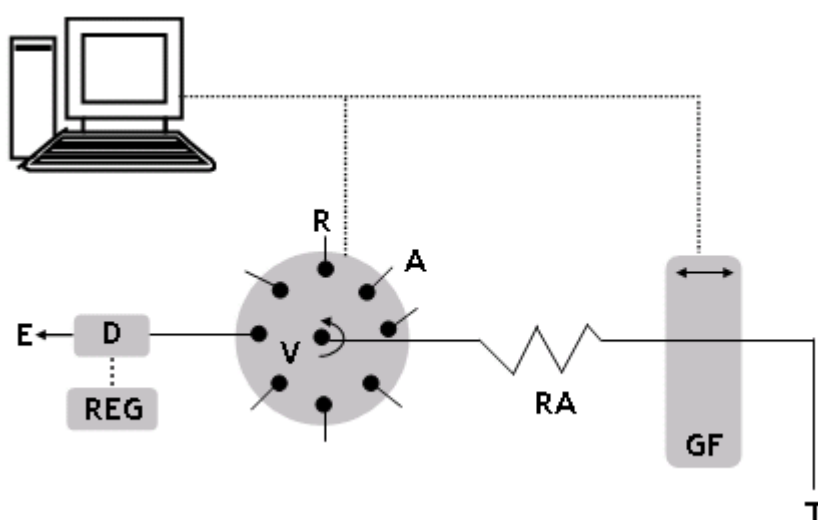


Figura 1.4

Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção Sequencial (SIA). Legenda - A: amostra; R: reagente; V: válvula multi-posição selectora de fluidos; RA: reactor de armazenamento; GF: dispositivo responsável pela gestão de fluidos (movimento bidireccional); T: Transportador; D: detector; REG: registador; E: esgoto.

Inicialmente, os dispositivos mais comumente utilizados na gestão de fluidos de um sistema de SIA eram as bombas peristálticas. De facto, para além de nestes sistemas nem as amostras nem os reagentes chegarem a atingir os tubos de impulsão das bombas peristálticas, a água é também o transportador mais vulgarmente utilizado.

Por isso, os tubos de impulsão acabam por ter um tempo de vida superior àquele que teriam em caso de estarem em contacto com reagentes agressivos ou com solventes orgânicos. Contudo, os tubos de impulsão acabam sempre por sofrer desgaste com o tempo de utilização, motivado pela sua fricção contra os rolamentos da bomba peristáltica, o que provoca alterações nos valores de caudal. Por esse motivo, as bombas peristálticas acabam muitas vezes por ser preteridas em favor de bombas de pistão (Miró *et al.*, 2002).

Muito embora a SIA se baseie nos mesmos princípios da FIA (como seja, volumes precisos de amostra e dispersão controlada), há diferenças significativas entre estas duas estratégias, particularmente no que respeita ao padrão de dispersão que ocorre nos dois tipos de sistema de fluxo. Em SIA, mesmo após se dar a inversão do sentido do fluxo, ocorre apenas uma sobreposição parcial da amostra com o reagente, situação que mais facilmente pode conduzir à imprecisão dos resultados. Para além disso, em SIA é necessário um conhecimento e um controlo mais rigoroso dos factores que afectam a precisão dos volumes, como seja o binómio tempo/caudal, as características físicas da amostra (particularmente a viscosidade) e a dimensão da tubagem utilizada, nomeadamente no que respeita ao comprimento e diâmetro interno. Outras desvantagens dos sistemas SIA relativamente aos sistemas FIA são: i) maior custo associado às determinações — a válvula multi-posição selectora de fluidos é mais dispendiosa do que a válvula convencional utilizada em FIA; e ii) menor rendimento analítico — obtêm-se rendimentos analíticos inferiores utilizando sistemas SIA, quer devido à necessidade de aspiração das soluções para o reactor de armazenamento, quer devido ao tempo que a válvula multi-posição necessita para rodar entre cada uma das diferentes portas.

Como vantagens deste tipo de sistemas, pode referir-se o facto de em SIA não ser necessário um fluxo permanente de solução, o que se traduz num menor consumo de amostra e reagente(s) e, conseqüentemente, numa menor produção de efluentes. Adicionalmente, em SIA existe apenas um canal para todas as soluções, enquanto em

FIA é necessário um canal para cada uma delas. Por fim, convém referir ainda que, contrariamente ao que acontece nos sistemas de FIA convencionais, os sistemas de SIA poderão ser aplicados a diferentes determinações analíticas e a diferentes condições de análise sem ser necessário recorrer a alterações na sua configuração inicial.

O recurso à estratégia de SIA possibilita a construção de sistemas muito versáteis, que permitem levar a cabo, em linha, procedimentos complexos de manipulação e de pré-tratamento das amostras. Esta versatilidade advém de vários factores, muito particularmente da bidireccionalidade do fluxo e da utilização da válvula multi-posição que possibilita a ligação de diferentes dispositivos, com diferentes características/funções a cada uma das portas (Economou, 2005).

Entre os procedimentos que os sistemas de SIA permitem implementar com sucesso destaca-se a pré-concentração dos analitos. Esta é uma etapa muitas vezes necessária, e permite aumentar quer a sensibilidade, quer a selectividade da análise, por pré-concentração do analito e sua separação dos restantes componentes da amostra. Um exemplo deste tipo de aplicação é o trabalho apresentado no Capítulo 6 desta dissertação, onde se recorreu a um sistema de fluxo do tipo SIA para a análise de elementos ultravestigiais (ródio, paládio e platina) em amostras de urina por ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*). O sistema de fluxo desenvolvido permitia pré-concentrar o ródio, o paládio e a platina e ao mesmo tempo eliminar ou minimizar potenciais interferências espectrais e não espectrais, expectáveis devido à natureza da amostra e ao equipamento de detecção utilizado (ICP-MS equipado com analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo).

1.2.1.2.3 Multicomutação

No início da década de noventa foi proposta uma nova estratégia de gestão de fluidos em sistemas de fluxo: a multicomutação (Reis *et al.*, 1994). A comutação pressupõe a

existência de dois estados e a alternância entre cada um deles; esse é também o conceito inerente à multicomutação.

Os sistemas de fluxo por multicomutação (Figura 1.5) assentam na utilização de válvulas electromecânicas activadas por um solenóide. Estas válvulas são o dispositivo “injector”, isto é, o dispositivo responsável pela introdução das soluções no sistema de fluxo. Pode utilizar-se um só dispositivo injector ou, então, vários dispositivos, criando-se redes de canais, que apesar de serem mais complexas são também muito versáteis devido ao facto de permitirem diferentes possibilidades de circulação das soluções no sistema de fluxo. Estas redes de fluxo poderão assumir várias configurações, permitindo explorar diferentes alternativas para um dado sistema de fluxo até encontrar a que melhor se adequa aos objectivos pré-estabelecidos. Das configurações possíveis, pode referir-se, a título de exemplo, a configuração linear (Araújo *et al.*, 1995), a configuração circular (Lapa *et al.*, 1998) ou mesmo a configuração em estrela (Kronka *et al.*, 1996).

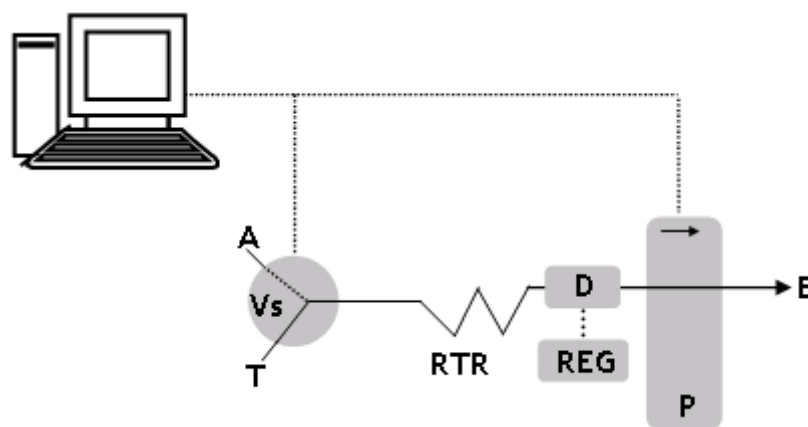


Figura 1.5

Representação esquemática de um sistema básico de Multicomutação. Legenda - A: amostra; T: transportador/reagente; Vs: válvula solenóide de 3-vias; RTR: reactor de transporte/reacção; D: detector; REG: registador; P: dispositivo de propulsão; E: esgoto.

Os dispositivos injectores mais comumente utilizados são as válvulas solenóides de 3-vias (Figura 1.5). Estas válvulas são dispositivos com capacidade para alternar

muito rapidamente (mais de 10 vezes por segundo) entre dois estados: aberto (ou activado) e fechado (ou desactivado), cada um deles permitindo a inserção no sistema de fluxo de uma solução diferente. O controlo do volume de solução inserida está dependente do controlo do binómio tempo/caudal. O controlo do tempo durante o qual uma válvula solenóide de 3-vias se encontra em cada uma das posições é feito por computador, o que permite assegurar a inserção no sistema de fluxo de volumes muito pequenos de solução, na ordem dos microlitros, de um modo preciso e exacto. A utilização das válvulas solenóides de 3-vias que, como se referiu, podem alternar muito rapidamente entre “aberto” e “fechado”, permitiu a implementação de uma estratégia de amostragem/gestão de fluidos inovadora, a qual consiste na intercalação de múltiplas pequenas alíquotas de diferentes soluções, proporcionando a sua homogeneização de um modo mais rápido: é a chamada “amostragem binária” (Martelli *et al.*, 1995). Este tipo de estratégia, em que a entrada de amostra no sistema de fluxo ocorre alternadamente com a entrada de transportador, relativamente à introdução de um segmento único de amostra numa corrente contínua de transportador (como acontece nos sistemas FIA), apresenta várias vantagens, das quais se destacam: i) melhor desenvolvimento da reacção; ii) possibilidade de utilização de reactores de menor comprimento; iii) menor dispersão; iv) melhor sensibilidade e v) menor consumo de reagentes/produção de efluentes. As alíquotas de cada solução inserida no sistema de fluxo podem ter o mesmo volume ou volumes bastante diferentes, criando assim, no segundo caso, a possibilidade de se efectuarem, em linha, diluições de grande magnitude recorrendo a esta estratégia de amostragem (Giné *et al.*, 1996).

Para além de permitir a implementação da estratégia de amostragem atrás discutida, a multicomutação permitiu ainda explorar, em linha, outro tipo de estratégias como, por exemplo, as empregues para a determinação do ponto final em titulações espectrofotométricas ou em determinações com base em métodos de cinética diferencial (Zagatto *et al.*, 1999). Adicionalmente, permitiu também simplificar

estratégias já implementadas à data, como era o caso da diluição em linha por amostragem de zonas (do inglês, *zone sampling*) (Araújo *et al.*, 1995).

Relativamente a um sistema de fluxo do tipo SIA, um sistema de fluxo construído com base no conceito de multicomutação apresenta logo à partida uma diferença bem visível: o tipo de válvula. Enquanto nos sistemas de SIA se recorre a uma válvula multi-posição selectora de fluidos, nos sistemas com multicomutação recorre-se à utilização de válvulas solenóides de 3-vias. Devido ao facto da válvula multi-posição selectora de fluidos apresentar uma velocidade de rotação entre canais adjacentes inferior à velocidade com que uma válvula solenóide de 3-vias comuta entre as duas posições possíveis, nos sistemas de fluxo baseados em multicomutação é possível conseguir-se um maior rendimento analítico. Além disso, muitas vezes a válvula multi-posição selectora de fluidos é subaproveitada, na medida em que não são utilizados todos os canais possíveis, acrescendo o facto do seu custo de aquisição ser bastante superior ao custo de aquisição de uma válvula solenóide de 3-vias. Porém, há a referir que a válvula multi-posição selectora de fluidos, pelo facto de ser mais robusta, usualmente tem um tempo de vida superior, o que a longo prazo pode acabar por rentabilizar o seu custo de aquisição.

Por fim, convém salientar como vantagem adicional dos sistemas de fluxo com multicomutação relativamente aos sistemas do tipo FIA ou SIA, o facto dos primeiros serem mais facilmente miniaturizados, devido às reduzidas dimensões das válvulas solenóides de 3-vias comparativamente aos dispositivos utilizados em FIA ou SIA, dando origem a sistemas mais compactos, portáteis, aplicáveis na análise *in situ*.

O recurso a sistemas de fluxo com multicomutação foi a estratégia utilizada em dois trabalhos apresentados nesta dissertação. No Capítulo 3 descreve-se um sistema de fluxo que, explorando as vantagens da associação do fluxo multicomutado com a estratégia de diluição por amostragem de zonas, permitiu efectuar a diluição das amostras em análise em linha, ajustando automaticamente o factor de diluição à concentração inicial do analito, sem necessidade de se proceder a uma

reconfiguração física do mesmo. A aplicabilidade daquele sistema de fluxo foi demonstrada na determinação de rubídio em soluções muito concentradas naquele elemento, no sentido de poder constituir uma alternativa válida para dar resposta a uma necessidade actual da indústria farmacêutica: a medida do efluxo de isótopos não radioactivos de Rb^+ para avaliação do efeito de potenciais novos fármacos sobre os canais iónicos. No Capítulo 5 descreve-se um sistema de fluxo de configuração modular, idealizado para a determinação sequencial de cobre em amostras de soro e de urina, nas quais a concentração esperada daquele elemento é muito diferente, utilizando uma técnica instrumental muito difundida e acessível: a espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama. O sistema de fluxo desenvolvido era composto por dois módulos independentes, cada um dos quais possibilitando efectuar uma manipulação diferente das amostras, com base na concentração esperada de cobre em cada uma delas: pré-concentração nas amostras de urina e diluição nas amostras de soro. No caso do módulo responsável pela diluição das amostras de soro, a estratégia de fluxo utilizada foi a multicomutação e a estratégia de amostragem foi a amostragem binária. A combinação destas duas estratégias permitiu a determinação de cobre em amostras de soro de um modo preciso e exacto recorrendo apenas à utilização de válvulas solenóides de 3-vias e ao efeito de aspiração natural do nebulizador do espectrofotómetro de absorção atómica.

1.2.1.2.4 Multi-seringa

Em 1999 foi proposta uma nova estratégia de fluxo: a análise por injeção em fluxo com multi-seringa (Cerdà *et al.*, 1999). A revisão das vantagens e desvantagens apresentadas pelas estratégias anteriormente descritas, nomeadamente pela FIA e pela SIA, permitiu concluir que seria de todo o interesse a existência de uma terceira estratégia que assimilasse a robustez e a versatilidade típicas dos sistemas de SIA

baseados na utilização de buretas automáticas, contornando a sua principal desvantagem: o menor rendimento analítico, quando comparados com os sistemas de FIA, originado quer pelo periódico enchimento da seringa com o transportador, quer pela própria utilização do reactor de armazenamento para o qual são sequencialmente aspiradas as diferentes soluções. Nos sistemas do tipo multi-seringa estes inconvenientes foram contornados substituindo a válvula multi-posição selectora de fluidos por válvulas solenóides de 3-vias (Miró *et al.*, 2002). Neste tipo de sistemas, o dispositivo responsável pela gestão de fluidos é uma adaptação das buretas automáticas: a bureta multi-seringa (Figura 1.6).

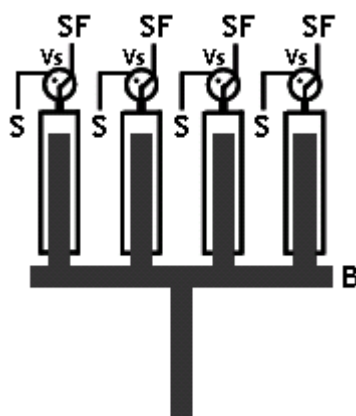


Figura 1.6

Representação esquemática de uma bureta multiseringa. Legenda - B: barra condutora dos pistões das seringas; S: reservatório de solução; Vs: válvula solenóide de 3-vias; SF: sistema de fluxo.

A bureta multi-seringa típica é composta por quatro seringas, cujos êmbolos estão ligados a um eixo comum que os desloca em simultâneo, por meio de um motor “passo-a-passo” controlado por computador. As quatro seringas podem ser de diferente capacidade: 0,5; 1; 2,5; 5; 10 ou 25 mL (Miró *et al.*, 2002). Uma vez que o motor “passo-a-passo” das buretas multi-seringa mais recentes efectua um total de 40.000 passos, o volume mínimo por passo que é possível conseguir com estes dispositivos é de 0,0125 μL (Segundo e Magalhães, 2006).

Na extremidade de cada seringa, oposta ao respectivo êmbolo, está uma válvula solenóide de 3-vias. Dependendo da posição dessa válvula (“aberta/activada” ou “fechada/desactivada”): i) ao movimentar-se o êmbolo da seringa no sentido ascendente, a solução contida na seringa poderá ser direccionada para o sistema de fluxo ou, alternativamente, para o reservatório de onde proveio, o que permite que apenas seja introduzido no sistema de fluxo o volume de solução necessário, reaproveitando-se o excedente; adicionalmente, ii) ao movimentar-se o êmbolo da seringa no sentido descendente pode ocorrer o enchimento da seringa a partir do reservatório de solução ou, alternativamente, ser aspirada solução a partir do sistema de fluxo, por exemplo para encher um *loop*. A válvula solenóide de 3-vias incorporada em cada uma das quatro seringas de uma bureta multi-seringa substitui com vantagem a válvula normalmente incorporada na bureta automática utilizada nos sistemas SIA convencionais. Para além de ter um menor custo, é capaz de comutar muito mais rapidamente entre cada uma das posições, não sendo por isso necessária a paragem do êmbolo quando essa comutação ocorre.

Nos sistemas de fluxo com base em multi-seringa não é aconselhável a utilização de uma das seringas da bureta como reservatório de amostra, na medida em que isso conduziria a uma diminuição significativa do rendimento analítico. De facto, tal opção conduziria à necessidade de um período alargado de lavagem entre amostras consecutivas, no sentido de se evitar a contaminação cruzada (*carry over*). Além disso, seria ainda necessário disponibilizar um grande volume de amostra para esta etapa de lavagem, o que não é uma situação praticável em todos os casos. Assim, numa fase inicial, em alternativa, utilizavam-se válvulas de injeção, semelhantes às utilizadas em FIA. Em linhas gerais, as vantagens deste tipo de sistema quando comparado com um sistema de FIA (que, como já foi referido, apresenta limitações associadas à utilização de bombas peristálticas, desgaste relativamente rápido dos tubos de impulsão e fluxo contínuo de transportador), eram a maior robustez e o menor gasto de reagentes (introdução no sistema de fluxo apenas do volume

necessário de cada reagente, retornando o excesso ao reservatório). Relativamente a um sistema de SIA há a salientar o facto de não ser necessária a introdução sequencial de segmentos de amostra e de reagente num reactor de armazenamento, o que favorece o rendimento analítico, e também o facto de a confluência da amostra com o reagente ser efectuada por meio da utilização de confluências em “T” ou em “Y”, o que origina uma transferência radial de massas. Disso resulta o favorecimento do processo de mistura em relação à transferência axial que ocorre em SIA (Miró *et al.*, 2002). Posteriormente, e ainda no sentido de facilitar a introdução da amostra nos sistemas de fluxo com base em multi-seringa, surgiu uma nova proposta que consistia na utilização de duas válvulas solenóides de 3-vias adicionais, de modo semelhante ao que ocorre nos sistemas de fluxo com multicomutação. Esta solução revelou-se mais prática do que a anterior (válvulas de injeção semelhantes às utilizadas em FIA), tendo permitido simplificar os sistemas de fluxo com base em multi-seringa e aumentar o número de possibilidades de introdução da amostra nos mesmos, devido à grande versatilidade das válvulas solenóides de 3-vias, as quais podem funcionar como válvulas de injeção da amostra nos sistemas de fluxo ou apenas como dispositivos comutadores. Outra possibilidade que também se traduz num aumento de versatilidade dos sistemas de fluxo com base em multi-seringa é a utilização de válvulas multi-posição selectoras de fluidos, de modo semelhante ao que ocorre em SIA, o que se torna particularmente útil nos casos em que se pretende efectuar uma etapa de diluição ou pré-concentração em linha (Miró *et al.*, 2002).

A selecção do volume de amostra que é introduzido no sistema de fluxo pode ser feita quer em termos de tempo de amostragem, quer em termos de volume amostrado (Figura 1.7). No primeiro caso (Figura 1.7 - A), o volume de amostra é determinado pelo caudal e pelo período de tempo utilizados para a introdução da amostra num reactor de armazenamento, de onde segue depois para o sistema de fluxo propriamente dito. No segundo caso (Figura 1.7 - B), o volume de amostra é

determinado pelo volume de um tubo colocado entre duas válvulas solenóides (*loop*), que a amostra, ao deslocar-se em direcção ao esgoto, irá preencher, e de onde posteriormente, após comutação da posição das duas válvulas, irá seguir para o sistema de fluxo propriamente dito (Segundo e Magalhães, 2006).

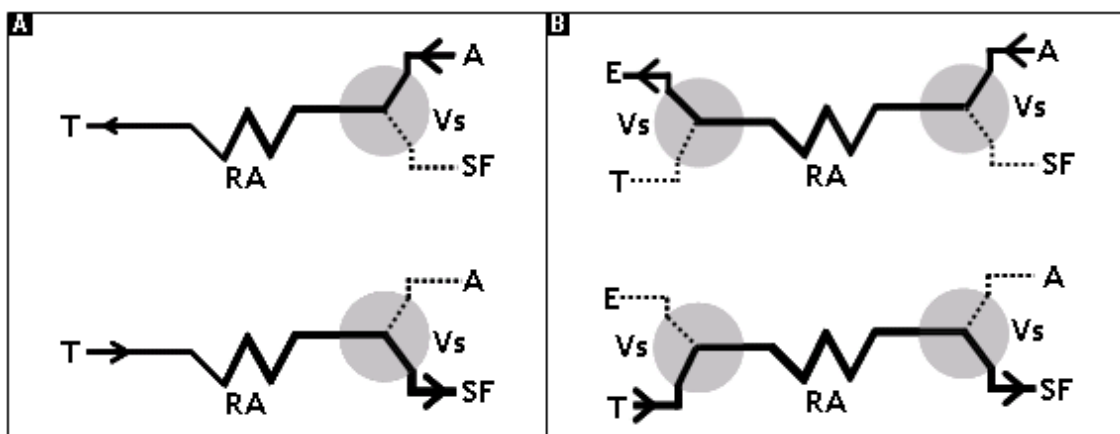


Figura 1.7

Representação esquemática do modo de introdução da amostra num sistema de fluxo com base em multi-seringa - A: tempo de amostragem e B: volume amostrado. Legenda - T: transportador; E: esgoto; RA: reator de armazenamento; A: amostra; Vs: válvula solenóide de 3-vias; SF: sistema de fluxo.

Apesar das vantagens apresentadas pelos sistemas de fluxo com base em multi-seringa, este tipo de sistema de fluxo não tem sido grandemente utilizado nem para a análise de amostras biológicas, nem acoplados a detectores de espectrofotometria atómica, como se pode verificar pelo trabalho de revisão publicado por Segundo e Magalhães (2006). De facto, na sua grande maioria, a aplicabilidade destes sistemas tem sido demonstrada na análise de amostras ambientais por espectrofotometria de UV/Vis.

1.2.1.2.5 Lab-on-valve

Os sistemas de fluxo do tipo SIA deram origem a uma nova estratégia de fluxo, apresentada em 2000, chamada *laboratory-on-valve* ou, mais abreviadamente, *lab-on-valve* (LOV) (Ruzicka, 2000).

Relativamente aos sistemas de fluxo ditos “convencionais”, os sistemas do tipo LOV geram um volume menor de efluente, na ordem dos microlitros, pelo facto de terem sido idealizados de modo a minimizar o volume de amostra e de reagente necessário em cada determinação. Esta característica dos sistemas do tipo LOV é da máxima importância, especialmente quando existem limitações associadas à utilização de amostra ou de algum reagente, por existirem em pouca quantidade, serem dispendiosos ou se tratar de substâncias com alguma toxicidade.

À semelhança dos sistemas de fluxo do tipo SIA, também os sistemas do tipo LOV são muito versáteis. Esta versatilidade advém do princípio base de operação no qual ambos os tipos de sistema assentam, ou seja, o recurso a uma válvula multi-posição selectora de fluidos. Este dispositivo, como já foi referido anteriormente, oferece diversas vantagens como, por exemplo, a possibilidade de através de controlo por computador se inverter o sentido ou se parar o fluxo, bem como de se poderem seleccionar diferentes portas de entrada no sistema de fluxo para diferentes soluções. Os sistemas de fluxo do tipo LOV surgem assim do aproveitamento da já conhecida versatilidade da válvula multi-posição selectora de fluidos, tendo como objectivo final o aumento da robustez e a miniaturização dos sistemas de SIA convencionais. Nesse sentido, foi construído um dispositivo designado por unidade central de processamento da amostra, abreviadamente CSPU (do inglês, *Central Sample Processing Unit*) que, figuradamente, se pode considerar uma estrutura monolítica rígida, em bloco único, na qual está incorporada uma célula de fluxo, uma válvula multi-posição selectora de fluidos e os canais de processamento da amostra (Ruzicka, 2000) (Figura 1.8). Nesta unidade, os canais de processamento da amostra

mantêm-se numa posição fixa, situação que favorece a precisão analítica. A célula de fluxo incorporada na CSPU foi concebida de modo a tornar mais versátil a utilização daquela unidade, sendo considerada uma célula de fluxo multifunção. Assim, por exemplo, a utilização desta célula de fluxo permite que, apenas através da reconfiguração das fibras ópticas emissora e receptora, se possam fazer determinações com base na medida da absorvência, fluorescência ou reflectância da amostra (Ruzicka, 2000).

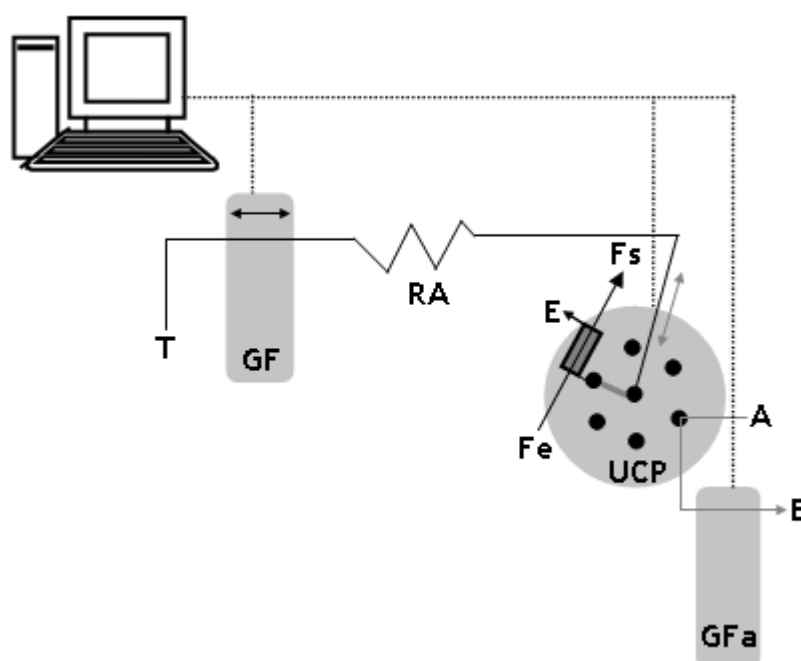


Figura 1.8

Representação esquemática de um sistema básico do tipo *lab-on-valve*. Legenda - A: amostra; E: esgoto; UCP: Unidade Central de Processamento da amostra, que inclui uma válvula multi-posição selectora de fluidos, uma célula de fluxo e os canais de processamento da amostra; GF: dispositivo responsável pela gestão de fluidos (movimento bidireccional); GFa: dispositivo auxiliar responsável pela gestão de fluidos; RA: reator de armazenamento; T: Transportador; Fe: feixe de luz de entrada; Fs: feixe de luz de saída.

Para além da redução do volume de efluente gerado, os sistemas de fluxo do tipo LOV permitem ainda efectuar de modo mais eficaz a manipulação de amostras em linha, por exemplo a pré-concentração por extracção em fase sólida, a qual é, como

já foi referido, um dos procedimentos a que mais comumente se recorre em sistemas de fluxo, quer com vista à obtenção de limites de detecção mais baixos, quer com a intenção de se separar o analito dos potenciais interferentes constituintes da amostra. Ora, num sistema de pré-concentração em fluxo convencional (i.e., utilizando consecutivamente a mesma massa de resina em todas as determinações), este procedimento não raras vezes apresenta algumas limitações, que se reflectem na exactidão e precisão analíticas e que são maioritariamente devidas a alterações das características físicas e químicas da própria resina. Ruzicka já havia proposto um modo eficaz de resolver o problema da “degradação” do material adsorvente que geralmente acontece na realização de imunoensaios: a sua substituição após cada determinação - num procedimento chamado de *bead injection* (Ruzicka, 1995; Ruzicka, 2000). Esta estratégia foi utilizada por Hansen e colaboradores na análise de elementos vestigiais em amostras ambientais e biológicas por espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (Wang e Hansen, 2000) e ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) (Wang e Hansen, 2001). Aqueles autores propuseram um sistema de fluxo do tipo LOV com uma coluna de pré-concentração incorporada, na qual a massa de resina utilizada na etapa de pré-concentração era renovada após cada ciclo analítico. Em ambos os casos os sistemas construídos revelaram-se versáteis e robustos, permitiram obter resultados precisos e exactos e a obtenção de limites de detecção muito baixos (Wang e Hansen, 2003b).

Muito embora os sistemas de fluxo do tipo LOV-*bead injection* tenham sido já utilizados em diversas aplicações analíticas, tais como na análise de auto-anticorpos (Carroll *et al.*, 2003) ou na análise de formulações farmacêuticas (Solich *et al.*, 2003), este tipo de sistemas tem-se mostrado particularmente útil na determinação de elementos vestigiais em matrizes de composição complexa (Hansen *et al.*, 2006). Contudo, os sistemas de fluxo do tipo LOV-*bead injection* apresentam também algumas limitações, principalmente relacionadas com as características que as

resinas devem possuir para poderem ser utilizadas, nomeadamente o facto de terem de ser perfeitamente esféricas e de apresentarem um tamanho uniforme e uma densidade próxima da densidade da água (Hansen *et al.*, 2006).

1.2.1.2.6 Multi-impulsão

Em 2002 foi proposta uma estratégia de fluxo envolvendo multi-impulsão (Lapa *et al.*, 2002). A grande novidade desta estratégia de fluxo era o tipo de dispositivos utilizados para a inserção das soluções no sistema de fluxo: micro-bombas solenóides, cujo funcionamento é controlado por meio de um computador e se encontra descrito mais detalhadamente no Capítulo 2 desta dissertação. Estes dispositivos actuam simultaneamente como portas para a entrada das soluções no sistema de fluxo, como unidades de propulsão dessas mesmas soluções e também como comutadores que permitem o seu direccionamento, dispensando por isso a utilização adicional de outro tipo de dispositivos que complementem a sua acção como acontece, por exemplo, com as bombas peristálticas (que servem apenas para a propulsão de soluções) ou com as válvulas solenóides de 3-vias (que servem apenas para a inserção de soluções e seu direccionamento no sistema de fluxo). Deste modo, é possível construir sistemas de fluxo extremamente simples e, por isso, menos susceptíveis à ocorrência de problemas (Figura 1.9).

Outra característica importante das micro-bombas solenóides é o tipo de fluxo resultante do seu funcionamento: um fluxo pulsado, que confere aos sistemas de fluxo com multi-impulsão características hidrodinâmicas diferentes das apresentadas pelos outros tipos de sistema de fluxo que cronologicamente os antecederam. De facto, nos sistemas de fluxo com multi-impulsão o fluxo não é laminar, mas antes do tipo turbulento. Esta situação é resultado da abertura repentina do diafragma da micro-bomba, que “obriga” a solução contida na câmara da mesma a ser expelida a uma velocidade instantânea muito elevada, originando o movimento caótico dessa

mesma solução no interior da tubagem do sistema de fluxo e, conseqüentemente, melhorando o processo de mistura.

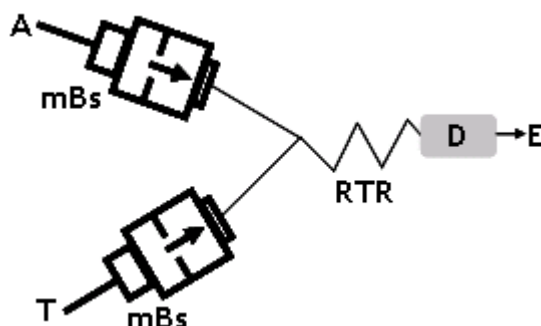


Figura 1.9

Representação esquemática de um sistema básico com multi-impulsão. Legenda - A: amostra; T: solução transportadora; mBs: micro-bomba solenóide; RTR: reator de transporte/reacção; D: detector; R: registador; E: esgoto.

O fluxo tipicamente pulsado favorece a dispersão radial relativamente à dispersão axial. Comparativamente ao que sucede nos sistemas de fluxo essencialmente laminar, nos sistemas de fluxo com multi-impulsão a mistura das soluções ocorre de um modo mais rápido e mais eficaz. Por exemplo, quando há necessidade de se obter uma íntima mistura da amostra com o reagente, a sensibilidade analítica conseguida é substancialmente superior num sistema de fluxo com multi-impulsão (Lapa *et al.*, 2002). Mesmo em condições de dispersão limitada, como sucede quando se utilizam reactores curtos, os sistemas de fluxo com multi-impulsão continuam a apresentar uma boa capacidade de mistura. De facto, a mistura pode ser total logo no ponto de confluência das soluções quando se selecciona, por exemplo, uma estratégia de amostragem por *merging zones* (i.e., introdução de amostra e reagente em simultâneo), situação que permite melhorar o rendimento analítico (Lima *et al.*, 2004).

O volume total de líquido que é dispensado por uma micro-bomba solenóide é calculado tendo em conta o volume debitado em cada pulso e o número total de

pulsos. Por sua vez, o caudal é calculado tendo em conta o volume debitado pela micro-bomba em cada pulso e a frequência com que ocorrem os pulsos. Um parâmetro importante, que condiciona o grau de mistura das soluções nos sistemas de fluxo com multi-impulsão, é precisamente o volume debitado pelas micro-bombas solenóides em cada pulso, especialmente quando se recorre às estratégias de amostragem por introdução de um segmento único de amostra (introdução do volume total pretendido de amostra seguida da introdução de reagente) ou por amostragem binária (introdução intercalada de amostra e de reagente). Assim, quanto menor for o volume interno das micro-bombas solenóides, menor é o comprimento de cada segmento de amostra e de reagente introduzido no sistema em cada pulso, maior é o contacto entre estas soluções e consequentemente melhor é o grau de mistura conseguido.

As micro-bombas solenóides permitem a inserção no sistema de fluxo de pequenos volumes de solução de um modo reprodutível, conseguindo-se assim elevada precisão analítica e um gasto reduzido de amostra e de reagentes sem necessidade de se recorrer à sua recirculação, como acontece, por exemplo, nos sistemas de fluxo com base em multi-seringa. Relativamente às estratégias de amostragem que normalmente são utilizadas para inserir as soluções num sistema de fluxo (*merging zones*, amostragem binária e introdução de um segmento único de amostra), uma vez que cada solução é introduzida por uma micro-bomba solenóide distinta e que estes dispositivos são controlados de modo independente entre si, qualquer uma dessas estratégias pode ser facilmente implementada nos sistemas de fluxo com multi-impulsão sem ser necessário proceder a alterações na sua configuração inicial. Convém referir ainda que a pequena dimensão das micro-bombas solenóides (dispositivos cilíndricos que apresentam uma altura e um diâmetro médios de cerca de 70 mm e 45 mm, respectivamente) permite a construção de sistemas de fluxo compactos, portáteis, facilmente adaptados à análise de amostras *in situ*, tal como já havia sido referido também para os sistemas de fluxo multicomutado. Apresentam

no entanto, relativamente a estes, a vantagem de dispensarem um dispositivo específico de propulsão das soluções, uma vez que a própria micro-bomba solenóide executa também essa tarefa.

Sendo a miniaturização de sistemas de fluxo uma preocupação muito actual, foi proposto recentemente um outro tipo de micro-bomba de diafragma, também capaz de gerar um fluxo pulsado, apresentando contudo dimensões ainda mais reduzidas (de acordo com o fabricante: 23 mm de diâmetro, 3 mm de altura) e um menor gasto energético. O caudal debitado por estes dispositivos é controlado através da frequência de um actuador *piezo*. Devido às suas características, estas micro-bombas estão a ser aplicadas na construção de sistemas *lab-on-chip*, nomeadamente pela companhia alemã *thinXXS Microtechnology AG*, que propôs já um sistema deste tipo para a análise de amostras de sangue (*thinXXS Microtechnology AG*, 2008). Ribeiro *et al.* também confirmaram o potencial destes dispositivos na implementação de metodologias analíticas em fluxo, tendo demonstrado a sua aplicação na determinação espectrofotométrica de gabapentina (Ribeiro *et al.*, 2007).

A estratégia de fluxo com multi-impulsão, recorrendo a micro-bombas solenóides, foi utilizada em dois trabalhos apresentados nesta dissertação. No Capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da influência exercida por um fluxo pulsado sobre o processo global de aspiração, nebulização e atomização das soluções próprio do equipamento de espectrofotometria atómica, e demonstra-se a aplicabilidade analítica dos sistemas de fluxo de diferente configuração que foram estudados na determinação de cálcio e magnésio em digestos de amostras de cabelo, e de sódio em amostras de urina. Como já anteriormente foi referido, no Capítulo 5 descreve-se um sistema de fluxo de configuração bi-modular: um módulo destinado à determinação de cobre no soro (estratégia de fluxo: multicomutação; estratégia de amostragem: amostragem binária); o outro destinado à sua pré-concentração em amostras de urina. No módulo responsável pela pré-concentração de cobre, a estratégia de fluxo utilizada foi a multi-impulsão e a estratégia de amostragem foi a

amostragem por *merging zones*. A amostra e a solução tampão eram introduzidas no sistema de fluxo em simultâneo, o que permitia tirar partido da excelente capacidade apresentada pelas micro-bombas solenóides na mistura das soluções, tornando-se desnecessário o uso de reactores compridos, obtendo-se em consequência disso um melhor rendimento analítico. A utilização de válvulas solenóides de 3-vias no sistema de fluxo proposto contribui também para melhorar o rendimento analítico, além de tornar o sistema ainda mais versátil/flexível. De facto, a combinação das micro-bombas solenóides e das válvulas solenóides de 3-vias tornou possível a lavagem mais rápida do canal da amostra e também a eluição da coluna de pré-concentração de modo reverso (ou seja, no sentido oposto ao do fluxo durante a etapa de pré-concentração), o que é geralmente considerada uma estratégia vantajosa para se limitar a dispersão e aumentar a sensibilidade analítica (Xu *et al.*, 1992).

1.2.2. Química Clínica e Espectrofotometria

1.2.2.1 A importância da espectrofotometria atómica em Química Clínica

Tem-se verificado uma evolução notável no que respeita à determinação de elementos metálicos e metalóides num contexto de Química Clínica. Tradicionalmente, os elementos com interesse clínico e/ou toxicológico eram apenas os elementos maioritários e os elementos minoritários com história de reconhecida toxicidade para o organismo humano, como o chumbo ou o arsénio. As amostras habitualmente analisadas eram sobretudo o sangue e a urina, e mais raramente as faneras e material de autópsia. Actualmente é dada atenção também a outro tipo de amostras e a muitos outros elementos, incluindo elementos ultravestigiais, como é o caso dos elementos do grupo da platina (PGEs, do inglês, *Platinum Group Elements*). O aparecimento de diferentes possibilidades de colheita de amostras biológicas (por exemplo, colheita de biópsia) e o aparecimento de técnicas dotadas de maior

sensibilidade analítica, mais precisas e mais simples de utilizar vieram despertar o interesse da comunidade científica para o conhecimento mais aprofundado da influência exercida pelos elementos químicos vestigiais no organismo humano.

Como já anteriormente se referiu, as metodologias clássicas eram morosas. Além disso, mais tarde, com o aparecimento da espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama veio-se provar que também a exactidão dos resultados era duvidosa (Willis, 1999). Os primeiros trabalhos referentes à análise de elementos vestigiais em Química Clínica empregavam métodos colorimétricos e polarográficos e eram maioritariamente direccionados para a Medicina Veterinária, exposição ocupacional ao chumbo e envenenamentos por arsénio (Taylor, 2006). O desenvolvimento da espectrofotometria atómica foi o principal responsável pelo conhecimento que actualmente existe acerca da importância dos elementos vestigiais no organismo humano e sua intervenção no estado de saúde e de doença.

Na medida em que as técnicas de espectrometria utilizadas na maioria dos trabalhos efectuados no âmbito desta dissertação, para a análise elementar em Química Clínica, foram as técnicas espectrofotométricas (excepção feita apenas para a técnica de ICP-MS), e em particular de espectrofotometria de absorção atómica (EAA), antes de se abordarem as particularidades de algumas técnicas de espectrometria muito utilizadas, descrevem-se sumariamente os princípios básicos nos quais assenta a determinação da concentração de um analito na amostra por EAA.

1.2.2.2 Princípios básicos da espectrofotometria de absorção atómica

A espectrofotometria de absorção atómica (EAA) envolve a absorção de radiação UV/Vis por átomos no estado gasoso, a qual obedece à lei geral expressa na equação $P = P_0 \times 10^{(-kNL)}$, em que P_0 é a potência do feixe incidente por unidade de área, P a potência transmitida, L o percurso óptico, N o número de espécies absorventes por

unidade de volume e k o coeficiente de absorção. Este último, depende da frequência da radiação e da probabilidade de transição electrónica associada ao processo de absorção. Em termos instrumentais, para se quantificar a absorção de radiação é necessário, portanto, medir P e P_0 . Se isso for feito em condições em que k e L se mantenham constantes, é possível relacionar essas medidas com N , ou seja, obter uma informação de carácter quantitativo das mesmas. Em termos práticos, é mais conveniente usar a grandeza absorvância (A), definida como $A = \log_{10} (P_0/P)$, uma vez que é uma função linear de N , o número de átomos absorventes.

Em espectrofotometria de absorção atómica, os átomos livres, susceptíveis de absorverem radiação electromagnética, são produzidos num dispositivo/sistema de atomização que, no caso da espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama (EAA/chama), se trata de um queimador. Para alguns elementos existe ainda a possibilidade de serem produzidos quimicamente derivados voláteis dos mesmos. É o que se verifica na chamada geração de vapor frio, utilizada na determinação de mercúrio, e na geração de hidretos, utilizada na determinação de elementos formadores de hidretos gasosos, como é o caso do arsénio, antimónio, bismuto, selénio, telúrio e estanho, os quais são depois conduzidos para um atomizador.

O processo de atomização em EAA/chama ocorre a nível de uma chama, geralmente de ar/acetileno, muito embora, para elementos que formam óxidos refractários à dissociação térmica, seja necessário utilizar uma chama mais quente, como a de óxido nitroso/acetileno.

O sistema de atomização deve permitir que a densidade de átomos de um determinado elemento que são produzidos e que interagem com a radiação seja proporcional à concentração desse elemento na amostra e, idealmente, que não haja dependência da natureza e concentração dos componentes da matriz.

1.2.2.3 Técnicas de espectrofotometria atômica

1.2.2.3.1 Fotometria de chama

A importância da espectrofotometria atômica em Química Clínica começou com o aparecimento do fotómetro de chama, um equipamento de espectrofotometria de emissão atômica. Até então, a determinação de sódio e de potássio no soro envolvia procedimentos de espectrofotometria de absorção molecular, pelo que era morosa e implicava o uso de grandes volumes de amostra. Como apenas se podia efectuar um pequeno número de determinações por dia, não era possível generalizar o uso destas determinações para monitorizar a resposta do organismo à doença e à terapêutica (Taylor, 2006). Os fotómetros de chama representaram assim uma pequena revolução na Medicina em geral e no diagnóstico clínico-laboratorial em particular, traçando o caminho da Química Clínica moderna, na medida em que tornaram possível obter informação sobre parâmetros bioquímicos de um doente praticamente em tempo real. O processo de emissão atômica será discutido posteriormente aquando da referência às técnicas de espectrofotometria de emissão atômica com atomização em chama e de espectrofotometria de emissão atômica em plasma.

1.2.2.3.2 Espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama

Em 1955, foi apresentada, por Walsh, Alkemade e Milatz, uma nova técnica para a determinação de elementos vestigiais: a espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama (EAA/chama) (Bolann *et al.*, 2007). A EAA/chama começou por ser usada em Química Clínica para a determinação de cálcio e de magnésio (Taylor, 2006). Relativamente aos métodos colorimétricos e titrimétricos até então utilizados para aquelas determinações, a EAA/chama permitia efectuar determinações muito mais rápidas e exactas, com um consumo bastante menor de amostra (Taylor, 2006). Logo que foram comercializados os primeiros equipamentos de EAA/chama, aumentou grandemente o número de pedidos de análises que

requeriam a determinação daqueles elementos, e com isso aumentou também consideravelmente o conhecimento acerca da importância do cálcio para o metabolismo ósseo e para a neurofisiologia (Taylor, 2006). Adicionalmente, com o aparecimento da EAA/chama foi possível criarem-se novas áreas de investigação clínica e foram desenvolvidos novos métodos para a determinação de vários outros elementos vestigiais em amostras biológicas (Taylor, 2006). Enquanto a anemia por deficiência em ferro e a ligação entre o bócio e a falta de iodo eram já reconhecidas há muito tempo, era crença geral que as deficiências de outros elementos vestigiais essenciais não ocorreriam em virtude das quantidades requeridas para o normal funcionamento do organismo serem tão baixas que seria impossível não as obtermos através da dieta. Contudo, por exemplo, com o aparecimento de métodos para a determinação de zinco por EAA/chama tornou-se evidente que a ingestão diária de alimentos nem sempre era adequada às necessidades do organismo. E hoje sabe-se que a deficiência em zinco apresenta uma elevada incidência, sendo apenas superada pela deficiência em ferro (Taylor, 2006).

Assim, com a utilização da EAA/chama foi possível ampliar grandemente o conhecimento sobre o papel dos elementos vestigiais essenciais para o organismo humano. Além disso, a importância deste tópico cedo se estendeu para além dos simples problemas dietéticos. Prasad e colaboradores descobriram um grupo de jovens adolescentes do sexo masculino que eram de baixa estatura e não apresentavam características sexuais secundárias. Depois de investigados, concluiu-se que o problema estava relacionado com uma baixa concentração de zinco no soro e assim que lhes foram administrados suplementos daquele metal, os jovens passaram a crescer normalmente e adquiriram as características sexuais secundárias próprias daquela idade (Prasad *et al.*, 1963). Hoje sabe-se que a deficiência grave em zinco provoca, por exemplo, diarreia e lesões eruptivas periorais. Na acrodermatite enteropática, uma doença genética rara, estes mesmos sintomas aparecem quando as crianças que padecem desta patologia deixam de ser

alimentadas com leite materno (Taylor, 2006). Muito embora esta patologia tivesse sido descrita muitos anos antes, foi apenas com o aparecimento da EAA/chama - e consequentemente com a possibilidade de se determinar de um modo fiável a concentração de zinco no soro - que foi possível perceber que os sintomas da doença eram devidos a uma deficiência neste metal e que podiam ser resolvidos com a administração de um suplemento oral (Moynahan, 1974). Exemplos de outras doenças genéticas que também foram clarificadas após o aparecimento da EAA/chama são a hemocromatose (deposição excessiva de ferro nos tecidos), a doença de Wilson (acumulação de cobre) e a doença de Menkes (deficiência em cobre) (Taylor, 2006).

O posterior desenvolvimento de novos procedimentos de pré-concentração tornou possível também a determinação por EAA/chama de elementos não essenciais, existentes nas amostras biológicas em concentração muito baixa. Como exemplo desses procedimentos, pode citar-se a quelatação e extracção com solvente, com reagentes como a pirrolidinaditiocarbamato de amónio e a metilisobutilcetona, que vieram tornar muito mais prática e fiável a determinação de chumbo em amostras de sangue (Taylor, 2006). Assim, por exemplo, apesar do reconhecimento dos efeitos nefastos da exposição ocupacional ao chumbo ser bastante anterior e de inclusivamente ser feito o controlo dessa exposição recorrendo a um método colorimétrico, o aparecimento da EAA/chama criou a oportunidade para um trabalho mais exaustivo e despertou o interesse na reavaliação e aprofundamento desta matéria (Taylor, 2006). A maior sensibilidade analítica da EAA/chama veio permitir, inclusive, efectuar a determinação da concentração de chumbo em amostras de indivíduos não sujeitos a exposição ocupacional. Deste modo, despertou-se a consciência social para os problemas ambientais originados pela utilização de gasolina ou de tintas aditivadas com chumbo. A nível instrumental merece destaque o desenvolvimento de novos dispositivos de atomização, como a “*Delves cup*” (Delves, 1970; Taylor e Brown, 1983), que permitia ultrapassar a baixa eficiência do nebulizador pneumático e reduzir muito quer os limites de detecção da EAA/chama,

quer também o volume de amostra necessário. Com estes desenvolvimentos foi possível efectuar estudos alargados, nomeadamente de natureza epidemiológica, que acabaram por conduzir à retirada do chumbo da gasolina no final da última década (Taylor, 2006).

O aparecimento da EAA/chama veio ainda permitir a exploração de outros domínios em Química Clínica, como seja a monitorização dos níveis plasmáticos de elementos vestigiais usados com fins terapêuticos. Por exemplo, o lítio tem sido usado, desde há muito tempo, como tratamento de primeira-linha para a chamada doença bipolar (ou perturbação maníaco-depressiva). É geralmente muito eficaz no controlo da mania e na prevenção do reaparecimento, quer dos episódios maníacos, quer dos episódios depressivos. No entanto, a utilização segura e eficaz de lítio como agente terapêutico requer uma monitorização apertada da sua concentração no soro, na medida em que apresenta uma janela terapêutica estreita e sujeita a grande variabilidade inter-individual.

Além do estudo das propriedades farmacológicas de elementos vestigiais, a EAA/chama permitiu também começar a compreender o mecanismo envolvido na manifestação dos seus efeitos tóxicos. Por exemplo, hoje sabe-se que a metalotioneína é uma proteína que está envolvida no normal metabolismo de elementos essenciais, na protecção do organismo contra as manifestações de toxicidade de elementos vestigiais e nos mecanismos pelos quais os metais exercem os seus efeitos terapêuticos (Taylor *et al.*, 1987). Contudo, só foi possível compreender melhor as funções desta proteína quando se passou a efectuar a determinação de elementos vestigiais em amostras de tecidos corporais. Um outro aspecto ainda, também ele ilustrativo da importância da EAA/chama em Química Clínica: hoje sabe-se que a resposta do organismo a algumas agressões (por exemplo, a infecções) passa pela redistribuição de alguns elementos no próprio organismo (i.e., os elementos movem-se rapidamente, mudando de "compartimento") (Taylor, 2006). Assim, certas alterações nos níveis sanguíneos de determinados elementos

vestigiais podem ajudar a perceber se uma dada patologia está a progredir ou a regredir. Um exemplo prático desta situação é a monitorização da concentração de cobre no soro, que tem sido utilizada para fazer ajustes na terapêutica administrada a doentes oncológicos (Taylor, 1996).

1.2.2.3.2.1 Interferências em EAA/chama

A EAA/chama é uma técnica de elevada selectividade. Apesar disso, é possível a ocorrência de alguns tipos de interferências, as quais são geralmente divididas em cinco grupos: i) químicas, ii) devidas à composição da matriz (características físicas), iii) devidas à ionização, iv) de natureza espectral, e v) devidas ao *background*.

Interferências químicas ocorrem quando o analito se combina com outro catião ou anião presente na amostra formando um composto refractário à dissociação térmica, de que resulta uma diminuição do número de átomos disponíveis para absorver radiação. Pode eliminar-se este tipo de interferências utilizando uma chama mais quente ou por meio da adição de um “agente libertador”, uma substância que se combina preferencialmente com o elemento interferente, ou de um “agente protector”, uma substância que se liga preferencialmente ao analito mas do qual resulta um composto facilmente dissociável sob acção do calor da chama.

As interferências devidas à composição da matriz ocorrem quando as características físicas das amostras (por exemplo, viscosidade, tensão superficial, etc.) diferem consideravelmente das características físicas das soluções de calibração. São utilizados diferentes procedimentos para se eliminar este tipo de interferências como, por exemplo, a diluição das amostras, a utilização de padrões de calibração com uma composição que simule a da matriz da amostra ou o recurso ao método das adições de padrão.

As interferências devidas à ionização ocorrem quando a temperatura da chama é suficientemente alta para provocar a remoção de um electrão da camada de valência

do analito, originando uma espécie catiónica. Muito embora o catião seja capaz de absorver radiação, o comprimento de onda ao qual o faz é diferente daquele do átomo neutro, pelo que a criação de espécies iónicas reduz em primeiro lugar a sensibilidade analítica. Depois, se a extensão do fenómeno for diferente entre amostras e soluções de calibração, a exactidão é também afectada. Este problema pode ser resolvido com a adição de um tampão de ionização. Essencialmente, trata-se de um elemento muito facilmente ionizável (mais facilmente ionizável que o analito em causa), normalmente um metal alcalino (por exemplo, o cézio), que é adicionado em excesso tanto às amostras como às soluções de calibração.

As interferências espectrais ocorrem quando o comprimento de onda de absorção de um elemento presente na amostra se sobrepõe ao comprimento de onda de absorção do analito. Para evitar este tipo de interferência pode-se utilizar uma fenda espectral de entrada mais estreita ou efectuar a determinação do analito num comprimento de onda alternativo.

As interferências devidas ao chamado *background* (“fundo”) são originadas pela dispersão ou absorção do feixe de radiação incidente por parte de espécies moleculares ou partículas presentes no trajecto óptico, incluindo as que são devidas à própria chama. O efeito da chama é particularmente evidente para comprimentos de onda abaixo dos 250 nm e pode obviar-se através do ajuste dos caudais do comburentes e do combustível (essencialmente quando se utilizam solventes orgânicos), ou através do recurso a uma chama que absorva menos no comprimento de onda com interesse analítico (por exemplo, chama de árgon/hidrogénio). O efeito da absorção de radiação por parte de espécies moleculares pode evitar-se através do recurso a uma chama mais quente. Em qualquer dos casos, estas interferências podem ser corrigidas fazendo a determinação do valor do *background* num comprimento de onda próximo daquele com interesse analítico mas ao qual o analito não absorva radiação (a absorção específica do analito, neste caso, obtém-se por diferença) ou através do recurso a um sistema de correcção de *background*, o qual,

na versão mais simples, envolve a utilização adicional de uma fonte de radiação contínua (por exemplo, uma lâmpada de deutério).

1.2.2.3.2.2 Sistemas de fluxo e EAA/chama

A EAA/chama ainda hoje desempenha um papel fundamental na determinação de elementos metálicos em amostras biológicas. O seu baixo custo de aquisição e de utilização, a rapidez analítica, o baixo nível de interferências e a facilidade de utilização são características que motivam uma opção preferencial pela EAA/chama sempre que isso permita cumprir os objectivos analíticos. A sua principal limitação num contexto de Química Clínica é o valor, muitas das vezes insuficientemente baixo, dos limites de detecção. Nesse sentido, têm sido procuradas diversas formas de tornar mais ampla a aplicação da EAA/chama, recorrendo-se muitas vezes a processos de pré-concentração. Noutros casos, porém, é necessária uma diluição prévia das amostras de modo enquadrar a concentração do analito no intervalo de concentrações em que há uma resposta instrumental directamente proporcional (i.e., no intervalo de resposta linear). Neste contexto, merece especial destaque a utilização de sistemas de fluxo, preferencialmente num acoplamento em linha, os quais, entre outras virtudes, constituem um processo simples e fiável de introdução e/ou processamento das amostras, para além de permitirem uma total automatização do procedimento e de diminuírem o volume de amostra necessário e os riscos de contaminação.

As primeiras publicações que descrevem o acoplamento de sistemas de fluxo a equipamento de EAA/chama datam de 1979 (Tyson, 1999). Inicialmente, as estratégias de fluxo, nomeadamente a FIA, eram utilizadas com o objectivo de servir unicamente como sistema de amostragem (aporte da amostra), melhorando-se assim o rendimento do processo de nebulização. De facto, a utilização de volumes reduzidos de amostra e a propulsão contínua de um fluido transportador permitem

não só reduzir o tempo de contacto das amostras com o nebulizador/queimador do equipamento de EAA/chama, como também assegurar a sua limpeza de um modo contínuo e mais eficaz. Nestas circunstâncias, por exemplo, torna-se mais fácil a análise de amostras com um elevado teor salino sem ser necessário efectuar um tratamento prévio das mesmas. As estratégias de fluxo revelam-se vantajosas também nos casos em que o volume de amostra disponível é baixo, como é frequente para as amostras biológicas, na medida em que permitem a determinação do analito sem necessidade de que o sinal analítico atinja um estado estacionário. Posteriormente, à medida que as diferentes estratégias de fluxo foram sendo exploradas, foi também possível propor novas metodologias analíticas, mais eficazes, capazes de permitir a execução em linha de muitos procedimentos frequentemente requeridos nas determinações por EAA/chama. Podem referir-se, a título de exemplo, os procedimentos necessários para eliminar determinados tipos de interferências (como seja a adição à amostra de um agente libertador, de um tampão de ionização ou de um padrão interno) ou o recurso à pré-concentração por extracção em fase sólida ou em fase líquida ou ainda a processos de diálise para se separar o analito dos restantes componentes da amostra (Tyson, 1999).

Os equipamentos de EAA/chama operam também em modo de emissão atómica: espectrofotometria de emissão atómica com atomização em chama (EEA/chama). Neste caso, o seu funcionamento assemelha-se ao de um fotómetro de chama. De facto, a temperatura da chama pode ser suficiente para conduzir os átomos de determinados analitos a um estado excitado. No modo de emissão atómica mede-se a radiação que é emitida por esses átomos ao regressarem ao seu estado fundamental. De notar, contudo, que à temperatura da chama habitual (ar/acetileno) há um muito maior número de átomos no estado fundamental do que no estado excitado. Além disso, o número de elementos que se consegue determinar por EAA/chama é superior ao número de elementos susceptíveis de serem determinados por EEA/chama, uma vez que, como foi já referido, a chama fornece energia suficiente apenas para

excitar os átomos de alguns elementos. Na prática, os elementos que se podem determinar com razoável precisão e sensibilidade por EEA/chama são os metais alcalinos e alcalino-terrosos, pelo facto de terem orbitais atómicas de baixa energia não ocupadas.

Em vários dos trabalhos descritos nesta dissertação foi utilizado um equipamento de espectrofotometria atómica em algumas determinações analíticas com interesse em Química Clínica, tendo, num deles, sido testado o detector tanto no modo de emissão e como no modo de absorção.

1.2.2.3.3 EAA com atomização electrotérmica

Em 1961, Boris L'vov publicou o primeiro trabalho referente a uma nova técnica, ou, mais correctamente, uma nova variante da EAA: a espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (EAA/AE) (Ribeiro *et al.*, 2002). Como o próprio nome indica, basicamente tratou-se da introdução de um novo processo de atomização. Nesta proposta, a amostra era colocada dentro de um pequeno tubo de grafite, no qual ocorria a sua atomização, dependente da energia térmica produzida por efeito de Joule. O primeiro equipamento deste tipo foi comercializado em 1970 pela *Perkin-Elmer*. Os equipamentos de EAA/AE possibilitam a atomização da amostra num espaço confinado (o interior do tubo de grafite), formando-se uma “nuvem atómica” densa. Desse modo, consegue-se obter uma grande sensibilidade analítica e um gasto muito menor de amostra (alguns microlitros apenas).

O aparecimento da EAA/AE foi de enorme importância em Química Clínica, podendo citar-se, a título de exemplo, a influência que esta técnica exerceu na qualidade de vida e no aumento da sobrevida dos doentes insuficientes renais sujeitos a tratamento por hemodiálise. De facto, durante muitos anos, em muitos centros de hemodiálise por todo o mundo, os doentes, após várias sessões de hemodiálise, apresentavam sintomas neurológicos que evoluíam e eventualmente culminavam com

a morte dos mesmos. Foram propostas várias explicações, mas aquela que veio a provar-se correcta foi a da toxicidade provocada pelo excesso de alumínio no organismo desses doentes (Alfrey *et al.*, 1976). A compreensão da etiologia dos sintomas apresentados pelos doentes, o seu tratamento e a prevenção e diagnóstico precoce da intoxicação aluminica apenas se tornou possível com o aparecimento da EAA/AE. Só então passou a existir verdadeiramente a possibilidade de determinar de um modo fiável concentrações baixas de alumínio no soro e nos fluidos de hemodiálise. E a vida de várias centenas de milhares de doentes terá sido salva em resultado desta nova possibilidade. De facto, na medida em que permitia obter limites de detecção muito mais baixos (100 a 1000 vezes), a EAA/AE possibilitou a extensão do trabalho anteriormente iniciado com a EAA/chama a outros elementos e a outras patologias. Podem citar-se ainda outros exemplos, como as alterações nos núcleos da base (características da encefalopatia portal sistémica) e a cardiomiopatia fatal, que ocorriam ambas em doentes com nutrição parentérica total e que foram associadas, respectivamente, à deposição intracelular de manganês (Mirowitz e Westrich, 1992) e à deficiência em selénio (Johnson *et al.*, 1981).

A técnica de EAA/AE tem revelado ser muito adequada à determinação de metais e metalóides em amostras nas quais aqueles elementos existam em muito baixa concentração. A sua grande sensibilidade (que permite obter limites de detecção, para a maioria dos elementos, na ordem dos ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$) deve-se ao facto da alíquota de amostra que é colocada dentro do tubo de grafite ser totalmente atomizada num curto período de tempo e do tempo médio de residência dos átomos no percurso óptico ser elevado (1 segundo ou mais) (Ribeiro *et al.*, 2002). De facto, o forno de grafite é um sistema de atomização que permite a obtenção de nuvens atómicas muito mais densas do que os queimadores de chama, facto que compensa o muito menor percurso óptico. Além da sensibilidade analítica da EAA/AE, há ainda a salientar o baixo volume de amostra que é requerido por cada determinação, o que é evidentemente um aspecto também muito importante no contexto concreto da

Química Clínica. Contudo, a EAA/AE apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a impossibilidade de se proceder à análise directa de amostras de matriz complexa devido à ocorrência de interferências provocadas pela composição da matriz, já que a desproporção entre espécie a medir e os componentes da matriz é grande (Burguera e Burguera, 2007).

1.2.2.3.3.1 Interferências em EAA/atomização electrotérmica

As interferências em EAA/AE podem dividir-se basicamente em duas categorias: i) espectrais (resultantes da emissão e/ou absorção da radiação por outras espécies, atómicas ou moleculares, que não o analito, e eventual dispersão da radiação) e ii) não espectrais (resultantes de uma alteração na produção ou na disponibilidade da nuvem atómica do analito para absorver a radiação) (Beaty e Kerber, 2002).

As interferências espectrais podem dever-se a: i) emissão de luz intensa pelo tubo de grafite, que pode ser ultrapassada por meio de arranjos instrumentais, limpeza do tubo de grafite e utilização de temperaturas de atomização não superiores às requeridas para a atomização do analito; ou a ii) *background* (absorção da radiação por outras espécies, atómicas ou moleculares, que não o analito, e dispersão da radiação). Um dos métodos mais usados para eliminar o *background* envolve a separação térmica do analito relativamente à maioria dos componentes da amostra, objectivo da etapa de pirólise, que antecede a atomização num programa-tipo de aquecimento do forno de grafite. Para facilitar esta separação é habitual adicionar à amostra um reagente, habitualmente chamado “modificador de matriz” que, no caso mais habitual, se destina a formar com o analito um composto termicamente mais estável, permitindo assim que mais componentes da matriz sejam removidos na etapa de pirólise. Há ainda outros tipos de modificadores de matriz como, por exemplo, aqueles que têm como principal função auxiliarem na decomposição da matéria orgânica da amostra ou facilitarem a volatilização de componentes da

matriz. Para além da utilização de modificadores de matriz para reduzir o nível do *background* (“fundo”), há também a possibilidade de utilizar sistemas instrumentais de correcção. Há vários tipos de sistemas que são utilizados em EAA/AE: i) utilização adicional de uma fonte de radiação contínua (por exemplo, lâmpada de deutério), já referida também para EAA/chama; ii) efeito de *Smith-Hieftje* (pulsção a alta e baixa corrente da fonte de radiação - lâmpada de cátodo oco); e iii) efeito de *Zeeman* (aplicação de um campo magnético intenso aos átomos, no sistema de atomização) (Beaty e Kerber, 2002). Qualquer que seja o sistema de correcção utilizado, o espectrofotómetro faz sempre a determinação da absorção atómica e do *background* para, depois, medir apenas o *background*, obtendo-se o valor da absorção atómica (“específica”, “corrigida”) pela diferença entre aquelas duas medidas.

Para minimizar as interferências não espectrais contribuem, por exemplo, a utilização de modificadores de matriz, a utilização de tubos de grafite com revestimento pirolítico e a utilização da chamada plataforma de *L’vov*. Esta consiste numa pequena plataforma de grafite pirolítica que é colocada dentro do tubo de grafite e onde é efectivamente colocada a amostra. Visa retardar a atomização da amostra até que se atinjam condições isotérmicas dentro do tubo (Beaty e Kerber, 2002). Por fim, há ainda o recurso ao método da adição de padrão.

O conjunto de condições instrumentais e analíticas básicas que, quando utilizadas em simultâneo, permitem efectuar determinações por EAA/AE com grande fiabilidade foram reunidas no designado conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*). Este conceito inclui a utilização de: i) tubos de grafite de grande qualidade, com revestimento pirolítico; ii) plataforma de *L’vov*, em grafite pirolítica de grande qualidade; iii) aquecimento rápido e preciso dos tubos; iv) interrupção do fluxo de gás de protecção (árgon, idealmente) pelo interior do tubo de grafite durante a atomização; v) espectrómetros com uma resposta electrónica muito rápida; vi) medida do sinal analítico em área de pico; vii) sistema de correcção de

alterações na linha de base; viii) utilização de modificadores de matriz e ix) utilização de um fiável corrector de *background*, como sejam os baseados no efeito de Zeeman (Beaty e Kerber, 2002).

1.2.2.3.3.2 Sistemas de fluxo e EAA/atomização electrotérmica

Apesar do aperfeiçoamento dos equipamentos de EAA/AE, os sistemas de correcção podem não eliminar todas as interferências aquando da análise de amostras com uma matriz complexa. Recordar que, como já foi referido, em EAA/AE a relação matriz/analito é por norma superior ao que ocorre noutras técnicas como, por exemplo, em EAA/chama (Burguera e Burguera, 2007). Nestas circunstâncias, um tratamento prévio da amostra empregando processos separativos em linha constitui muitas vezes uma alternativa eficaz, que permite simultaneamente remover os interferentes e concentrar o analito. Muito embora inicialmente se considerasse que o acoplamento de sistemas de fluxo a equipamento de EAA/AE fosse pouco viável devido aos diferentes modos de operação de cada um, foi possível sincronizar o modo de operar descontínuo, característico da EAA/AE, com o modo contínuo, característico das técnicas de fluxo, através da utilização de sistemas de controlo informático, que funcionam em paralelo (Costa *et al.*, 2002; Fang, 1998). Desde sensivelmente o início da década de 90, altura na qual as vantagens do acoplamento de sistemas de fluxo a equipamento de EAA/AE começaram a ser exploradas, até à data de hoje, muitos foram os trabalhos publicados, tendo motivado também a publicação de vários livros e artigos de revisão, o que reflecte o interesse da comunidade científica nesta matéria (Burguera e Burguera, 1998; Burguera e Burguera, 2001; Burguera e Burguera, 2007 e Fang, 1998). Alguns exemplos de métodos utilizados para a separação do analito da amostra em sistemas de fluxo acoplados a equipamento de EAA/AE passam pela extracção em fase sólida ou em

fase líquida, geração de compostos voláteis, co-precipitação ou deposição electroquímica. (Burguera e Burguera, 2007 e Fang, 1998).

1.2.2.3.4 Espectrofotometria de emissão atómica em plasma

Em 1964-65, Wendt e Fassel nos Estados Unidos e Greenfield em Inglaterra co-inventaram uma nova técnica analítica, com capacidade para análise multi-elementar: a ICP-AES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) (Lagalante, 1999). No entanto, devido à grande popularidade da EAA/chama naquela altura, o potencial da técnica de ICP-AES apenas viria a ser reconhecido nos anos setenta (Lagalante, 1999). Hoje, trata-se de uma técnica muito utilizada em análise de rotina, principalmente no sector da indústria e para a análise de amostras ambientais.

A técnica de ICP-AES baseia-se na utilização de um plasma de acoplamento indutivo (do inglês, *inductively coupled plasma*) para efectuar uma eficiente atomização da amostra e excitação atómica. A possibilidade de determinação multi-elementar, a elevada sensibilidade analítica e o amplo intervalo de concentrações em que há uma resposta instrumental linear constituem as mais importantes características desta técnica.

Do plasma de acoplamento indutivo falar-se-á posteriormente, aquando da referência à técnica de ICP-MS. Nessa altura, referir-se-ão também os diferentes dispositivos que são comuns às duas técnicas. De seguida, faz-se uma referência sumária aos princípios básicos da técnica de ICP-AES e aspectos particulares do modo de funcionamento do equipamento.

A técnica de ICP-AES baseia-se na excitação de átomos livres no estado gasoso (por acção da energia térmica) e na consequente emissão de radiação electromagnética aquando do retorno das espécies excitadas ao seu estado de mais baixa energia, o estado fundamental.

O fenómeno de excitação ocorre por mudanças nos níveis de energia dos electrões periféricos dos átomos, e obriga à conversão prévia da amostra (sólida, líquida ou gasosa) em vapor atómico: a atomização da amostra. Este processo encontra-se esquematizado na Figura 1.10, para o caso de uma amostra líquida.

A amostra é introduzida no plasma sob a forma de um aerossol (líquido/gás, sendo o gás argon). O aerossol é transportado para o plasma, onde as pequenas gotículas líquidas rapidamente sofrem dessolvatação (remoção do solvente), com formação de pequenas partículas sólidas (nesta fase passa a existir um aerossol sólido/gás). Segue-se a fusão e volatilização dessas partículas, com formação de espécies moleculares gasosas, e a dissociação destas em átomos (atomização). O vapor atómico resultante do processo de atomização de uma amostra é fundamentalmente constituído por átomos gasosos no estado fundamental. Contudo, uma fracção mais ou menos extensa desses átomos é excitada e mesmo ionizada, produzindo-se uma mistura gasosa final com átomos e iões em vários estados de energia. Estes, ao regressarem ao estado fundamental emitem radiação de comprimento de onda específico, que pode ser medida para efeitos de quantificação do analito na amostra. Assim, o espectro de emissão relativo a um dado elemento é constituído por um conjunto de riscas, às quais estão associadas transições electrónicas entre diferentes níveis de energia. A cada risca corresponde uma energia bem definida, que pode ser caracterizada pelo seu comprimento de onda.

A temperatura do plasma exerce um efeito drástico sobre a razão entre o número de átomos nos estados fundamental e excitado. De acordo com a Lei de *Boltzmann*, o número de átomos no estado excitado aumenta com o aumento da temperatura. Porém, mesmo às elevadas temperaturas do plasma, representa sempre uma fracção diminuta do número de átomos total. Para que o fenómeno de emissão atómica possa ser utilizado em análise quantitativa, é necessário que a temperatura da fonte de atomização (plasma) e o caudal de aspiração das amostras sejam estáveis, e também

que o aerossol produzido seja de qualidade (uniforme e com partículas de muito pequena dimensão).

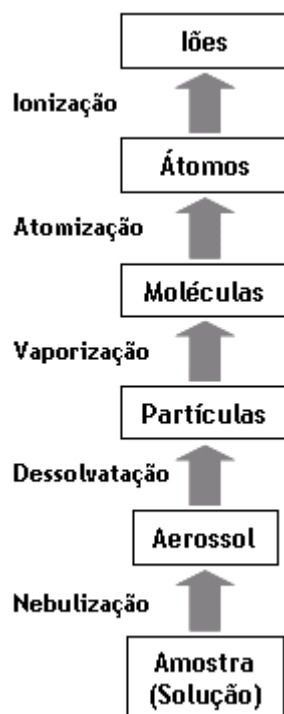


Figura 1.10

Representação esquemática do processo de atomização para uma amostra líquida.

As amostras são introduzidas no centro do plasma sob a forma de um aerossol de gotículas de finas dimensões, habitualmente gerado com um sistema de nebulização pneumática. O aerossol é projectado para uma câmara de nebulização, onde são removidas as partículas de grandes dimensões, que são removidas por um dreno. Só uma pequena fracção do aerossol original (e portanto do total da amostra nebulizada) segue para o plasma, entrando na tocha.

Como já foi referido, no plasma ocorre quase instantaneamente uma sequência de eventos que termina com a atomização e a excitação dos átomos, com posterior emissão de radiação em virtude do retorno das espécies excitadas ao estado fundamental.

Do feixe de radiação emitido pode separar-se o comprimento de onda com interesse, recorrendo a um monocromador. Para fazer uma análise multi-elementar, há que ir regulando o monocromador para, sequencialmente, ir dando passagem aos vários comprimentos de onda em direcção ao detector. Os monocromadores devem ter características especiais em termos de dispersão e resolução, de forma a tornar possível uma selecção de riscas com um mínimo de interferências. Há ainda equipamentos que ao invés de monocromadores possuem policromadores, que são dispositivos capazes de dispersar os vários comprimentos de onda segundo ângulos diferentes, e que permitem assim fazer uma análise multi-elementar verdadeiramente simultânea.

A radiação luminosa seleccionada é convertida em corrente eléctrica através de detectores (tubos fotomultiplicadores e outros), sendo este sinal tratado de modo a ser relacionado com a concentração do analito. A intensidade das riscas e, portanto, a sensibilidade analítica, depende do número de átomos que existe no nível a partir do qual se dá a transição electrónica.

Desde a introdução no mercado dos primeiros equipamentos de ICP-AES, no início dos anos 70, que estes foram sofrendo melhorias significativas, tendo-se aperfeiçoado as suas características analíticas (Rahil-Khazen *et al.*, 2000). Um dos pontos altos dessas melhorias ocorreu no final dos anos 90, com a utilização da tocha de configuração axial (i.e., a tocha é colocada horizontalmente em relação à fenda de entrada do sistema óptico). Relativamente à tocha de configuração radial (i.e., a tocha é colocada verticalmente em relação ao sistema óptico), permite a obtenção de melhores limites de detecção, desde que contornados os acrescidos problemas de interferências causadas por processos de recombinação na região mais fria do plasma, “a cauda” (Trevizan e Nóbrega, 2007).

1.2.2.3.4.1 Interferências em ICP-AES

Em termos gerais, em ICP-AES as interferências podem também ser classificadas em interferências espectrais e interferências de matriz.

A complexidade do espectro de emissão propicia o aparecimento de interferências espectrais, produzindo falsos valores de concentração das espécies em análise. Por vezes, observam-se bandas de emissão provenientes de espécies moleculares gasosas em certas regiões do espectro. Outras vezes, verifica-se ainda a emissão de uma radiação contínua, devida à recombinação de iões de árgon, ou de outros elementos, com os electrões livres que existem no plasma. Existem várias alternativas disponíveis para obviar este tipo de interferências como, por exemplo, a utilização de correcções matemáticas e a selecção de diferentes comprimentos de onda para a determinação do analito.

As interferências de matriz são provocadas por todos os constituintes da amostra, que não o elemento em estudo, podendo ocasionar a supressão ou o aumento do sinal do analito. As interferências de matriz subdividem-se em vários tipos, podendo ser físicas, químicas e de ionização.

As interferências físicas perturbam a fase de introdução da amostra e produção e transporte do aerossol, afectando a eficiência da nebulização. Alteram de forma significativa o desempenho analítico, provocando uma diminuição drástica da intensidade das riscas. Estão associadas a características da amostra como viscosidade, tensão superficial e tensão de vapor (presença de compostos orgânicos). Estas interferências podem ser minimizadas através da utilização de padrões de calibração cuja composição simule a da matriz da amostra.

As interferências químicas ocorrem durante o processo de atomização e dificultam a produção de átomos livres do elemento em análise. São causadas pelo aparecimento de espécies refractárias à dissociação térmica. Em ICP-AES, este tipo de interferência

não tem muita expressão devido à atmosfera inerte em que o processo de atomização ocorre e às temperaturas muito elevadas do plasma.

As interferências de ionização são as que se devem a perturbações no equilíbrio entre átomos e iões do elemento em causa. Este tipo de interferência pode ser minimizado através da adição às amostras e aos padrões de uma quantidade significativa de um sal de um elemento facilmente ionizável (metal alcalino).

1.2.2.3.4.2 Sistemas de fluxo e ICP-AES

Como já foi destacado, qualquer que seja a técnica instrumental, frequentemente é necessário recorrer-se a uma manipulação das amostras, prévia à sua análise. Em ICP-AES essa é também uma necessidade habitual.

Um dos pré-tratamentos da amostra mais comumente efectuados nas determinações por ICP-AES é a pré-concentração do analito a determinar. De facto, a pré-concentração permite não só melhorar a sensibilidade analítica, como também eliminar ou, pelo menos, minimizar as interferências provocadas pela matriz, com consequente melhoria dos limites de detecção. No entanto, as etapas de pré-concentração também apresentam desvantagens, como a diminuição do rendimento analítico e o aumento do risco de contaminação das amostras, resultado da maior manipulação destas. No sentido de obviar a estes inconvenientes, é comum o recurso a sistemas de fluxo para, desse modo, efectuar uma etapa de pré-concentração em linha, o que se reflecte no grande número de publicações científicas nesta área, onde são descritos variados métodos para o efeito (Bahramifar e Yamini, 2005; Cerutti *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 1998; Wuilloud *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004).

1.2.2.3.5 Espectrometria de plasma - massa

Em 1980, Houk e colaboradores demonstraram as vantagens da utilização do ICP como fonte de iões, acoplando-o a um espectrómetro de massa, o que lhes permitiu identificar e quantificar as espécies iónicas geradas no plasma. Demonstraram ainda que operando deste modo se obtinha um espectro muito mais simples do que o resultante da emissão atómica em plasma (ICP-AES). Para além disso, era menor o nível de interferências inter-elemento e muito maior a sensibilidade analítica, o que resultava em muito mais baixos limites de detecção (Taylor, 2001). Em 1984, foi comercializado o primeiro equipamento de ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) (Taylor, 2001). À semelhança do que acontece com outros equipamentos igualmente sofisticados, as primeiras versões apresentavam algumas imperfeições que foram sendo corrigidas, em resultado do *input* dos utilizadores. Desde então, a técnica de ICP-MS passou a ser largamente utilizada para a determinação de elementos vestigiais nos mais variados tipos de amostras, o que acabou por motivar a produção de equipamentos cada vez mais versáteis e com melhores desempenhos. De todos os avanços tecnológicos podem salientar-se os que foram efectuados ao nível dos dispositivos de separação dos iões, com a utilização de outros que não o analisador do tipo quadrupolo, o que veio alargar as possibilidades de utilização da técnica de ICP-MS na análise de amostras biológicas, como se pode verificar nos artigos de revisão publicados mais recentemente (Krachler, 2007; Taylor *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2008).

A importância da técnica de ICP-MS na análise de elementos vestigiais em Química Clínica está hoje ainda longe de totalmente explorada, fruto de todas as novas possibilidades que derivam da referida evolução que os equipamentos têm sofrido. Para além das vantagens óbvias associadas com a possibilidade de se efectuar uma análise multi-elementar com muito baixos limites de detecção, que simplificam e expandem as possibilidades do diagnóstico de doenças e a monitorização da

concentração de elementos vestigiais na avaliação do estado nutricional e da exposição ocupacional, há vários exemplos de trabalhos que apenas são possíveis utilizando esta técnica. O acoplamento de equipamento de ICP-MS a um sistema separativo, como seja um sistema de cromatografia líquida, veio facilitar e tornar mais eficientes os processos de especiação. O maior número de aplicações envolve a determinação de arsénio e de selénio, incluindo a identificação de espécies destes elementos produzidas durante o processo metabólico. A diferenciação entre arsénio orgânico e inorgânico está já bastante explorada, mas actualmente existe interesse em determinar metabolitos tóxicos de As(III), intermediários no processo de metabolização e que apresentam um tempo de semi-vida curto. No que respeita ao selénio, o interesse mais actual prende-se com o estudo de diferentes espécies deste elemento que foram encontradas em amostras biológicas, no sentido de entender qual a função que desempenham no processo de metabolização (Taylor, 2006).

Uma importante área de aplicação da técnica de ICP-MS em Química Clínica relaciona-se com a possibilidade de se determinarem isótopos estáveis. Deste modo, é possível substituir a utilização de radioisótopos, habitualmente utilizados como marcadores, pela utilização de um elemento enriquecido num isótopo estável, podendo assim estudar-se com segurança processos relativos à sua farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Além disso, através da determinação da razão isotópica de elementos tóxicos presentes numa amostra é possível por vezes identificar a fonte de exposição/contaminação dessa amostra. Por exemplo, através da determinação da razão isotópica do chumbo no sangue foi possível determinar a fonte de intoxicação por aquele elemento em crianças da Arábia Saudita, tendo-se concluído que a mesma resultava da utilização de “medicamentos étnicos”, e não da ingestão de tintas ou de petróleo como inicialmente se pensara (Al Saleh *et al.*, 1993). A utilização da técnica de ICP-MS para a determinação da razão isotópica de alguns elementos permitiu também dar a conhecer uma característica até então desconhecida do organismo humano.

Nalgumas circunstâncias, o organismo parece tratar de modo diferente diferentes isótopos do mesmo elemento. Na hemocromatose, por exemplo, a razão $^{56}\text{Fe}:^{54}\text{Fe}$ é mais elevada do que a apresentada por indivíduos saudáveis, o que leva a supor que os indivíduos doentes absorvem mais facilmente o isótopo de maior massa do que os indivíduos saudáveis (Krayenbuehl *et al.*, 2005). Noutro estudo, em indivíduos saudáveis, verificou-se que as razões $^{66}\text{Zn}:^{64}\text{Zn}$ e $^{68}\text{Zn}:^{64}\text{Zn}$ no cabelo eram significativamente inferiores relativamente às encontradas nos eritrócitos, constituindo este outro exemplo de um caso de “fraccionação isotópica” no organismo humano (Ohno *et al.*, 2005).

Assim, em resumo, devido ao facto de ter criado novas possibilidades de análise, pode dizer-se que a técnica de ICP-MS veio fomentar o progresso da Química Clínica e a expansão para áreas anteriormente não exploradas. Exemplo de uma nova área de investigação, é a denominada *metalómica*, que visa integrar o conhecimento existente acerca dos biometais. É uma área científica que deve ser estudada em conjunto com a área de *genómica* e de *proteómica*, uma vez que a síntese e as funções dos genes e das proteínas requerem em grande medida o envolvimento de vários metais e metaloenzimas. Uma vez que a identificação dos *metalomas* (i.e., das metaloenzimas, metaloproteínas e de outras biomoléculas que contenham metais) e o conhecimento das suas funções nos sistemas biológicos é o principal objectivo de investigação na área de *metalómica*, a sua especificação é muito importante na medida em que permite identificar especificamente os *metalomas* bioactivos (Haraguchi, 2004).

Relativamente ao modo de funcionamento do equipamento de ICP-MS, em termos gerais, a amostra, geralmente sob a forma de uma solução aquosa, é transformada num aerossol, através de um processo mais ou menos convencional de nebulização, e é transportada para o plasma por uma corrente de árgon, tal como descrito para a técnica de ICP-AES. Uma câmara de nebulização, colocada imediatamente após o nebulizador, tem por função assegurar que apenas as gotículas de aerossol com um

tamanho adequado chegam ao plasma. No plasma, os elementos são atomizados e, seguidamente, ionizados. De seguida, os iões produzidos são representativamente amostrados e extraídos do plasma através de dois orifícios, conhecidos como cone de amostragem e cone selector. Os iões são depois focados por um conjunto de lentes iónicas e enviados para o analisador/filtro de massas que separa os diferentes iões com base no valor da sua relação massa/carga (relação m/z). A corrente iónica assim produzida é encaminhada para um dispositivo do tipo multiplicador de electrões. Por fim, a “cascata” de electrões produzidos ao longo do multiplicador de electrões acaba por atingir o colector que “conta” o número de electrões para cada um dos valores de relação m/z em estudo.

O grande desafio em ICP-MS foi o desenvolvimento de uma interface que permitisse a passagem dos iões do plasma, que se encontra à pressão atmosférica, para o espectrómetro de massa, que se encontra a pressão reduzida (10^{-4} - 10^{-6} Torr).

Na medida em que a técnica de ICP-MS, de todas as referidas nesta dissertação, é a mais recente e foi utilizada num dos trabalhos que se apresentam, o seu modo de funcionamento será objecto de uma descrição mais aprofundada, exposta de seguida, baseada integralmente numa obra de referência (Taylor, 2001).

1.2.2.3.5.1 Introdução da amostra

Há vários sistemas para a introdução de amostras no estado gasoso, sólido e líquido nos equipamentos de ICP-MS. Para utilizar estes sistemas, muitas vezes tem de se proceder ao pré-tratamento das amostras que, por exemplo, pode consistir em dissolução, digestão, filtração ou fusão das mesmas. Durante esta etapa de preparação prévia das amostras, pode ainda ser necessário proceder-se a etapas adicionais de modificação da amostra, tais como a pré-concentração do analito ou a sua separação dos elementos potencialmente interferentes constituintes da amostra.

As amostras no estado gasoso podem ter várias origens, das quais se destacam a geração de vapor (por exemplo, geração de hidretos e geração de vapor de Hg) e a cromatografia gasosa. A introdução directa de amostras em fase gasosa no equipamento de ICP-MS possui vantagens significativas relativamente à introdução de um aerossol líquido. Uma dessas vantagens é o facto da eficiência de transporte de um gás para o plasma ser praticamente de 100%, conseguindo-se assim uma melhor sensibilidade analítica. Além disso, as interferências provocadas pela matriz estão virtualmente ausentes na medida em que durante a passagem à fase de vapor as espécies a determinar são separadas da maioria dos restantes componentes da amostra. Por fim, há ainda a referir o facto de as amostras no estado gasoso dispensarem as etapas de dessolvatação e vaporização da amostra, de modo que a energia do plasma é usada apenas para a atomização e ionização, aumentando também deste modo a sensibilidade analítica.

Contudo, a maior parte das amostras encontra-se no estado líquido ou sólido, pelo que se torna necessária a sua manipulação prévia para as converter ao estado gasoso, o que frequentemente não é fácil. Por outro lado, a possibilidade de se introduzir a amostra directamente no plasma, sem manipulação prévia, evita ou minimiza a contaminação da amostra e possíveis erros associados ao seu pré-tratamento, aumenta o rendimento analítico e diminui os custos associados à análise.

No caso concreto das amostras sólidas, a sua análise “directa”, i.e., sem uma prévia dissolução, é por isso uma estratégia muito atraente. Por esse motivo, os sistemas mais comuns para a introdução de amostras no estado sólido são: i) a ablação por laser, que consiste em fazer incidir um raio laser sobre a superfície da amostra, que é assim parcialmente vaporizada e dirigida para o plasma; e ii) a nebulização de uma suspensão de partículas de amostra de reduzida dimensão (do inglês, *slurry nebulization*), utilizando-se para tal um nebulizador do tipo *Babington*, do qual se falará mais adiante.

A introdução de amostras no estado líquido é, porém, o processo mais comum de as fazer chegar até ao plasma, o que é consequência, entre outros motivos, da elevada exactidão e precisão com que se podem medir volumes, e da facilidade com que amostras líquidas podem ser manuseadas (e em particular diluídas). Neste processo de “transporte até ao plasma”, as amostras são primeiramente convertidas num aerossol muito fino, constituído por pequenas gotículas de amostra suspensas no gás de transporte, por acção de um nebulizador.

Existem diversos tipos de nebulizadores, os quais se abordarão sumariamente mais adiante, numa secção que lhes é dirigida. No entanto, seja qual for o tipo de nebulizador usado, o aerossol formado é sempre uma população heterogénea, com gotículas de diferente diâmetro. Porém, quanto mais pequeno e uniforme for o tamanho das gotículas formadas maior será a sensibilidade (até um certo limite) e a estabilidade do sinal. Para remover as gotículas de maiores dimensões utiliza-se então uma câmara de nebulização. Este dispositivo tem como principal função uniformizar o tamanho das gotículas que seguem em direcção ao plasma, removendo as gotículas de maior tamanho para o esgoto.

Devido à acção das câmaras de nebulização, apenas uma pequena fracção de amostra chega efectivamente ao plasma (por norma, menos de 10%), sendo a maior parte da amostra conduzida para o esgoto.

Câmaras de nebulização

Na Figura 1.11, está esquematicamente representada uma câmara de nebulização dupla, do tipo *Scott*. As câmaras de nebulização deste tipo têm um compartimento interior e outro exterior. O aerossol entra no compartimento interior e é forçado a mudar de direcção em 180°, passando para o compartimento exterior, de onde sai em direcção ao plasma. No compartimento exterior há ainda um dreno que permite a remoção das partículas de solvente condensadas. Há comercialmente disponíveis

muitas variantes deste tipo de câmara de nebulização, destinadas a aplicações especiais.

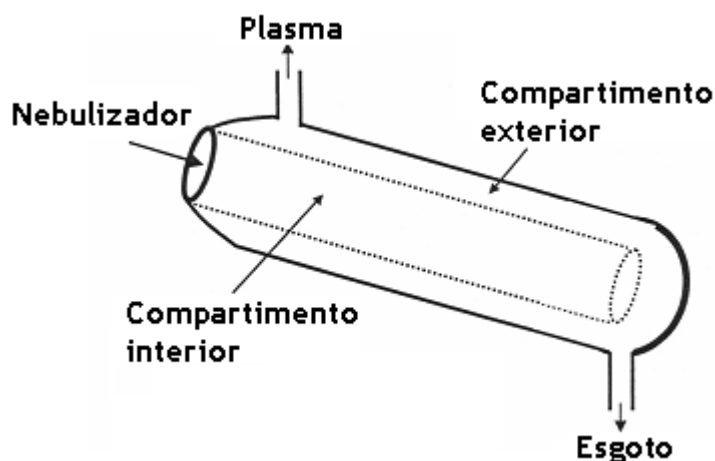


Figura 1.11

Representação esquemática de uma câmara de nebulização dupla, do tipo *Scott*. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

Outro tipo de câmara de nebulização bastante popular é aquele que emprega um fluxo de acção ciclónica reversa (“câmaras ciclónicas”), e que se encontra representado na Figura 1.12. Ao invés de possuírem dois compartimentos como acontecia nas câmaras de nebulização do tipo *Scott*, estas têm um compartimento circular único que obriga a um fluxo de rotação tangencial. A força centrífuga exercida sobre o aerossol, à medida que este se desloca circularmente na câmara de nebulização, força à colisão das gotículas maiores com a parede, que depois caem e seguem em direcção ao esgoto. Por outro lado, as gotículas mais pequenas passam pela câmara de nebulização, e seguem em sentido ascendente em direcção ao plasma. Normalmente o volume interno das “câmaras ciclónicas” é pequeno, sendo por isso menores o tempo necessário para as “lavar” e os efeitos de memória, o que contribui para um melhor rendimento analítico.

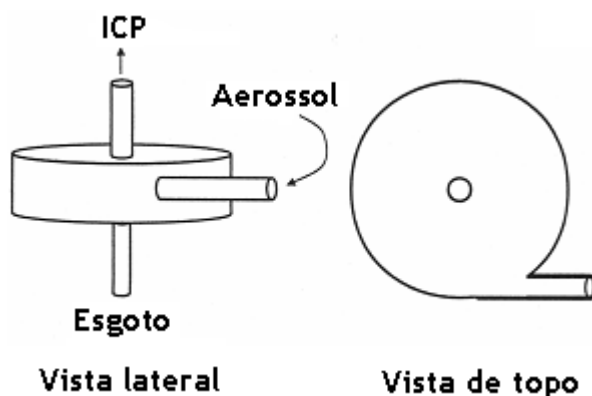


Figura 1.12

Representação esquemática de uma câmara de nebulização “ciclônica”. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

O tamanho das gotículas de aerossol pode ser uniformizado ainda mediante a utilização de uma câmara de nebulização equipada com uma esfera de impacto. Neste caso, as gotículas de aerossol de maior tamanho irão “colidir” com a esfera de impacto, geralmente de vidro ou PTFE, e serão removidas do aerossol para o esgoto, enquanto as gotículas mais pequenas prosseguem em direcção ao plasma.

A remoção da fracção de amostra rejeitada deve ser feita de modo a que na câmara de nebulização se mantenha sempre uma pequena pressão positiva para que o aerossol seja efectivamente arrastado em direcção ao plasma, o que pode ser conseguido através da imersão do tubo de drenagem na solução presente no recipiente de recolha dos desperdícios. Contudo, neste caso, a pressão vai-se alterando à medida que o recipiente vai ficando cada vez mais cheio. Os tubos utilizados para o escoamento da amostra rejeitada devem permitir que a saída da solução da câmara de nebulização ocorra de modo suave. O não escoamento da solução rejeitada da câmara de nebulização provoca mudanças nos valores de pressão no seu interior e, conseqüentemente, origina oscilações no sinal analítico obtido, e conduz ainda a um aumento dos efeitos de memória. Por tudo isto, à semelhança do que acontece no caso da introdução da amostra no nebulizador, a

solução rejeitada é habitualmente bombeada para fora da câmara de nebulização por meio de uma bomba peristáltica.

Para algumas aplicações, a câmara de nebulização, independentemente do seu tipo, pode ser termostatada, por exemplo através de um arrefecimento de tipo *Peltier* (arrefecimento termoeléctrico). Diminuindo a temperatura na câmara de nebulização, reduz-se de modo significativo a pressão de vapor do solvente, havendo um menor aporte deste ao plasma, e por isso, uma redução substancial da formação de espécies potencialmente interferentes e uma melhor estabilidade do sinal, como já anteriormente se referiu. Por exemplo, no caso de o solvente ser a água, ao arrefecer-se a câmara de nebulização, provoca-se a condensação do vapor de água nas suas paredes, o que reduz de modo significativo a formação de óxidos moleculares no plasma. Na medida em que flutuações da temperatura da câmara de nebulização têm um efeito significativo no sinal analítico é, pois, importante manter este dispositivo termostatado.

Nebulizadores

No que respeita aos nebulizadores, o tipo mais comumente utilizado é o nebulizador pneumático, do qual existem diferentes modelos. No entanto, todos os nebulizadores pneumáticos têm uma característica comum, que é o facto de utilizarem a força provocada pelo fluxo de um gás através de um orifício ou de um tubo capilar para produzirem um aerossol, i.e., uma dispersão de pequenas gotículas da solução (as quais são depois transportadas para o plasma pela corrente do próprio gás). Há quatro tipos de nebulizadores pneumáticos: i) de fluxo cruzado; ii) concêntrico ou de *Meinhard*; iii) do tipo *Babington* e iv) de injeção directa ou DIN (do inglês, *Direct Injection Nebulizer*).

O nebulizador de fluxo cruzado (Figura 1.13), consiste em dois tubos capilares, geralmente de vidro ou de quartzo, em que um se encontra colocado

perpendicularmente em relação ao outro (formando um ângulo recto), de modo que o fluxo de gás através de um desses tubos capilares gere uma pressão diferencial na sua extremidade, provocando a aspiração da solução através do outro capilar (caudal tipicamente na ordem dos 3 mL min^{-1}).

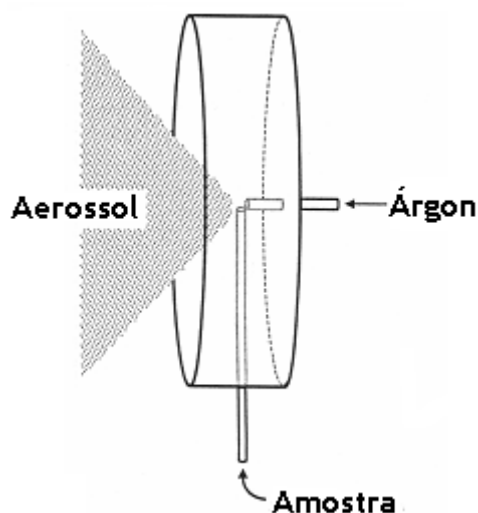


Figura 1.13

Representação esquemática de um nebulizador de fluxo cruzado. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

A eficácia e o desempenho deste tipo de nebulizador estão grandemente dependentes do alinhamento dos dois capilares. O aerossol produzido apresenta geralmente uma grande heterogeneidade em termos do tamanho das gotículas formadas, o que afecta a estabilidade do sinal. Um modo de conseguir melhorar este aspecto é através da utilização de uma bomba peristáltica para “forçar” a entrada da amostra no nebulizador. A utilização da bomba peristáltica para esse efeito minimiza as variações no caudal das amostras devidas a diferenças no valor da viscosidade e tensão superficial, e permite obter maior uniformidade no tamanho das gotículas formadas. Uma vez que a solução tem de passar através de um dos capilares do nebulizador, no caso desta conter partículas em suspensão ou um grande teor de sólidos dissolvidos, pode dar-se a deposição de sólidos na extremidade desse capilar, em resultado da evaporação do solvente. Esta situação origina o bloqueio parcial do

fluxo de amostra, com reflexos na quantidade e na homogeneidade do aerossol formado, e portanto na sensibilidade e estabilidade do sinal. Há um tipo de nebulizador de fluxo cruzado no qual os capilares se encontram numa posição fixa, não ajustável, conhecido por nebulizador de *Meddings-Andersen-Kaiser* (MAK), que permite obter boa precisão.

Um tipo muito comum de nebulizador pneumático é o nebulizador concêntrico ou de *Meinhard*. Este nebulizador, geralmente de vidro, tem um tubo capilar interno colocado de modo concêntrico em relação a um tubo mais externo (Figura 1.14).

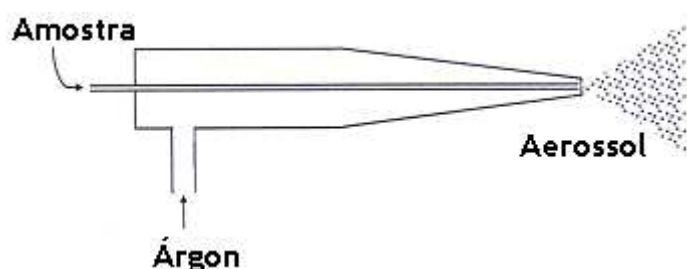


Figura 1.14

Representação esquemática de um nebulizador concêntrico. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

O fluxo de gás no espaço entre os dois tubos resulta na aspiração da solução por uma das extremidades do tubo capilar mais interno (caudal igual a cerca de 0,5 - 1 mL min⁻¹), formando-se o aerossol na extremidade oposta. Tal como no caso dos nebulizadores de fluxo cruzado, os nebulizadores concêntricos também tendem a bloquear no caso da solução conter partículas em suspensão ou um grande teor de sólidos dissolvidos. Há vários tipos de nebulizadores concêntricos, concebidos para situações especiais de utilização. Podem referir-se, a título de exemplo, o nebulizador de alta eficiência (HEN, do inglês, *High Efficiency Nebulizer*) e o nebulizador microconcêntrico. São indicados para situações em que o volume de amostra disponível seja muito baixo, pelo facto de operarem com caudais de solução na ordem das poucas dezenas de microlitros por minuto. Existem versões em material

de plástico inerte, indicadas quando se pretende analisar soluções corrosivas (por exemplo, contendo ácido fluorídrico).

Há variadíssimos nebulizadores do tipo *Babington* (por exemplo, nebulizadores USGS e com ranhura em “V”, entre outros), mas todos eles partilham uma característica: o aerossol é produzido através da passagem do gás por um orifício sobre o qual “escorre” a solução a nebulizar. Devido ao seu modo de funcionamento, este tipo de nebulizadores é muito pouco susceptível de bloquear, mesmo quando usado com soluções que contenham partículas em suspensão ou um grande teor de sólidos dissolvidos.

O nebulizador USGS do tipo *Babington* (Figura 1.15) consiste num tubo de vidro com uma extremidade hemisférica e um orifício com 0,1 mm de diâmetro num dos lados. Este tubo está montado num suporte de PTFE que por sua vez contém outro tubo por onde flui a amostra (a um caudal de cerca de 3 - 5 mL min⁻¹), e que está colocado imediatamente acima do referido tubo de vidro.

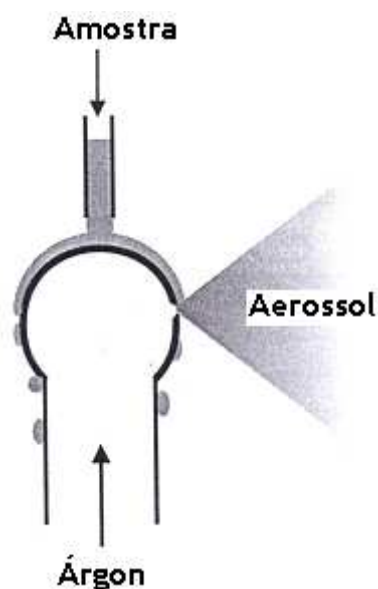


Figura 1.15

Representação esquemática de um nebulizador USGS do tipo *Babington*. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

O caudal usual de árgon neste tipo de nebulizadores é de 600 mL min^{-1} . A principal vantagem deste nebulizador é a sua capacidade para produzir um aerossol praticamente a partir de qualquer líquido, independentemente da sua viscosidade ou da concentração total de sólidos dissolvidos. Em termos de sensibilidade e precisão, este nebulizador apresenta um desempenho semelhante ao dos nebulizadores concêntricos e de fluxo cruzado.

O nebulizador do tipo *Babington* com ranhura em “V” (em inglês, *V-groove*) encontra-se esquematicamente representado na Figura 1.16. Neste tipo de nebulizador a amostra flui por um sulco, de onde sai, pelo orifício que se encontra na extremidade oposta, e recobre o orifício por onde flui o gás, formando-se assim o aerossol. Este tipo de nebulizadores tem sido utilizado com sucesso para valores de caudal de árgon entre $0,4$ e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$.

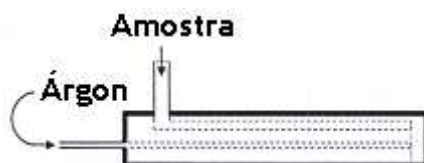


Figura 1.16

Representação esquemática de um nebulizador do tipo *Babington* com ranhura em “V”. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

Outro tipo de nebulizador é o chamado nebulizador de injeção directa, em que a quantidade total de aerossol produzido é injectada directamente no plasma. Não é utilizada qualquer câmara de nebulização para uniformizar o tamanho das gotículas de aerossol que seguem para o plasma. Apesar disso, geralmente consegue-se uma boa precisão, com menores efeitos de memória e tempos de lavagem. Os limites de detecção são semelhantes ou melhores que os conseguidos com outros tipos de nebulizador. Adicionalmente, os nebulizadores de injeção directa são também vantajosos quando o volume de amostra disponível para análise é muito baixo.

Contudo, também apresentam algumas desvantagens. De facto, o solvente injectado directamente no plasma pode conduzir a um maior número de interferências, dependendo da sua composição. Além disso, trata-se também de um nebulizador pouco tolerante à presença de partículas em suspensão.

Para além dos nebulizadores pneumáticos, há ainda o nebulizador ultra-sónico, que é normalmente utilizado quando se pretende aumentar a sensibilidade analítica. Neste tipo de nebulizador, recorre-se aos ultra-sons para “fragmentar” a solução e produzir o aerossol. Comparativamente ao nebulizador pneumático, o nebulizador ultra-sónico apresenta geralmente menor precisão. Devido à alta eficiência de nebulização e ao pequeno tamanho das gotículas de aerossol formadas, normalmente uma grande quantidade de solvente acaba por ser transportada até ao plasma, o que tem um grande impacto sobre os fenómenos de atomização e ionização. De facto, o excesso de solvente pode arrefecer o plasma, reduzindo a sua capacidade para ionizar os analitos, ou mesmo extingui-lo. Adicionalmente, o solvente pode estar na origem de interferências isobáricas. Para obviar este problema, pode-se recorrer a um sistema de dessolvatação, que consiste na passagem do aerossol por uma câmara aquecida onde o solvente é parcialmente evaporado. O aquecimento pode ser conseguido, por exemplo, por meio da utilização de uma lâmpada que emita radiação na zona do infra-vermelho. Imediatamente após a câmara de aquecimento, existe um sistema de condensação, onde o vapor do solvente é condensado e removido para o esgoto. No entanto, a dessolvatação também pode interferir negativamente, dependendo da concentração total de sólidos dissolvidos (geralmente, a concentração máxima tolerada é de 5%).

Para terminar esta questão da introdução das amostras nos equipamentos de ICP-MS, importa referir uma alternativa à utilização de nebulizadores que é a utilização de vaporizadores electrotérmicos. O vaporizador electrotérmico mais utilizado é o tubo de grafite, que é essencialmente idêntico ao tubo de grafite usado em EAA/AE. Quando na amostra estão presentes vários analitos, a vaporização de cada um deles

poderá ocorrer separadamente (a tempos diferentes) dependendo das suas características físico-químicas. Há, por isso, necessidade de ser efectuada uma optimização deste processo para cada tipo de amostra, situação que pode ser contornada através do recurso a modificadores de matriz, tal como acontece em EAA/AE.

A utilização de vaporizadores electrotérmicos, como se compreende, dispensa a utilização de uma câmara de nebulização, e permite obter limites de detecção melhores do que os conseguidos com os nebulizadores pneumáticos. Além disso, como durante o processo de vaporização ocorre a remoção de solvente, a atomização e ionização dos analitos no plasma ocorrerá mais eficazmente e com menor formação de espécies interferentes. Por fim, a utilização de vaporizadores electrotérmicos é ainda vantajosa nos casos em que o volume de amostra disponível para análise seja limitado.

Os inconvenientes da utilização de vaporizadores electrotérmicos são o baixo rendimento analítico, a limitada capacidade para automatização dos procedimentos e a sua relativa baixa precisão, quando comparada com a obtida com outro tipo de dispositivos para a introdução de amostras nos equipamentos de ICP-MS.

1.2.2.3.5.2 Plasma de acoplamento indutivo

O plasma consiste num gás inerte ionizado, e é um meio altamente energético. É a temperatura excepcionalmente elevada (7000-10000 K) do plasma que proporciona boa atomização (i.e., a decomposição de substâncias complexas, constituintes da amostra, em átomos individuais) e também a subsequente excitação atómica e ionização. Esta característica do plasma é a responsável pela sua capacidade para permitir analisar compostos refractários (difíceis de atomizar) e compostos com elevados potenciais de excitação (difíceis de excitar recorrendo-se a outras técnicas

de emissão atômica), tornando-o uma boa fonte de emissão na análise de elementos vestigiais (já referido quando se abordou a técnica de ICP-AES).

Um plasma consiste numa mistura gasosa, electricamente neutra, constituída por catiões e electrões livres. No caso de um plasma de árgon, que é o tipo de plasma mais comum, será uma mistura muito concentrada de iões Ar^+ e electrões. Muito embora, de acordo com o processo de produção, haja vários tipos de plasma (DCP, do inglês *Direct Current Plasma*; MIP, do inglês *Microwave Induced Plasma*, etc.) o plasma de acoplamento indutivo ou ICP (do inglês, *Inductively Coupled Plasma*) é o que parece oferecer maiores vantagens, nomeadamente no que respeita à sensibilidade e à ausência de interferências. Para a formação de um plasma podem utilizar-se gases tais como árgon, hélio, azoto e ar, contudo a utilização de gases inertes revela-se mais vantajosa, devido às suas propriedades de ionização e à sua mais fácil disponibilidade num estado de grande pureza. Os gases inertes, e especificamente o árgon, apresentam ainda uma vantagem adicional, relacionada com a sua pouca reactividade química.

Para a formação do plasma de acoplamento indutivo é utilizado um gerador de altas-frequências que fornece 1 a 5 kW de potência a uma bobina de indução (bobina de Tesla), de cobre, que se encontra enrolada em torno de um tubo, geralmente de quartzo, de 15 a 30 mm de diâmetro, que constitui a chamada tocha (Lagalante, 1999). O plasma é iniciado através de uma faísca produzida pela bobina de Tesla, que fornece electrões ao gás de suporte (ou “gás plasmogénico”). Depois do plasma ter sido iniciado é sustentado por um processo conhecido por acoplamento indutivo. Os electrões inicialmente fornecidos pela faísca produzida pela bobina de Tesla são acelerados pelo campo electromagnético criado por acção do gerador de radiofrequências. Esta aceleração provoca colisão dos electrões com os átomos neutros do gás de suporte, provocando a formação de mais iões e de mais electrões. Este efeito em cascata é o responsável pela sustentabilidade do plasma. Uma vez

ionizado o gás de suporte, a produção do plasma é um processo auto-sustentado, desde que se mantenha a aplicação de radiofrequência à bobina de Tesla.

Como já foi referido, a bobina de Tesla encontra-se enrolada em torno da tocha. A tocha é o local onde se produz o plasma e é responsável pela configuração que este apresenta. Tipicamente, as tochas são feitas de materiais transparentes à radiação de radiofrequência, para assim não atenuarem o campo gerado pela bobina de Tesla. As tochas podem ser feitas de materiais como cerâmica ou nitrato de boro, mas, na sua maioria, são feitas de quartzo, o qual apresenta um ponto de fusão suficientemente elevado para permitir que a tocha mantenha a sua configuração, mesmo quando exposta às temperaturas comumente atingidas com um plasma de árgon. A configuração típica da tocha consiste em três tubos concêntricos (Figura 1.17).

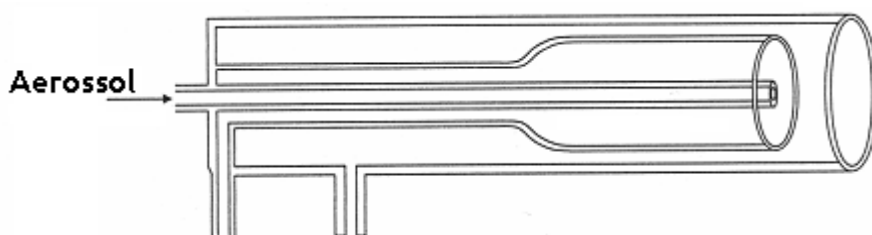


Figura 1.17

Representação esquemática de uma típica tocha de quartzo utilizada em ICP-MS. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

No espaço entre o tubo mais externo e o tubo intermédio circula árgon, que entra tangencialmente em relação ao eixo longitudinal da tocha, e cria um fluxo em espiral. Este fluxo de gás serve dois propósitos: i) impedir que o plasma provoque a fusão do quartzo da parede interna do tubo exterior e ii) proporcionar a formação de um plasma com uma configuração toroidal. Pelo tubo localizado mais interiormente, também designado de tubo injetor, flui o aerossol de amostra, vindo da câmara de nebulização, em direcção ao plasma. No espaço entre o tubo injetor e o tubo

intermédio também flui uma corrente de árgon, denominada de fluxo auxiliar, por auxiliar a formação do plasma. Este fluxo auxiliar também é responsável por proteger a extremidade do tubo central, impedindo a sua fusão por afastamento do plasma. O caudal do gás em cada um dos três espaços criados pelos tubos da tocha varia de acordo com o tamanho e com a configuração da tocha que se está a utilizar. Estes valores de caudal influenciam bastante a configuração do plasma que é formado e consequentemente a temperatura e a eficiência de ionização do mesmo.

A configuração toroidal do plasma permite uma boa sensibilidade analítica, na medida em que no seu centro existe uma espécie de túnel que facilita o transporte do aerossol da amostra, que é introduzido na base do plasma pelo tubo injector (Figura 1.18).

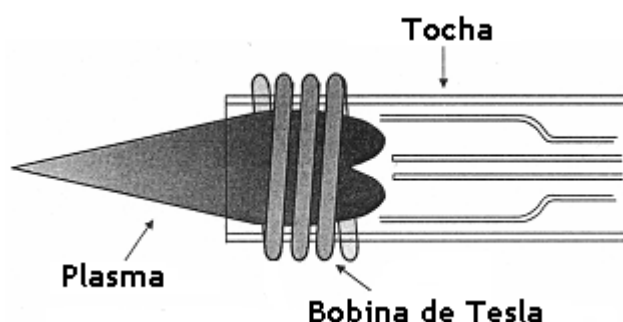


Figura 1.18

Representação esquemática da configuração tipicamente apresentada pelo plasma. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

O plasma apresenta a temperatura mais alta, cerca de 10000 K, na região mais próxima da parede externa da tocha. Por outro lado, a região mais central do plasma, muitas vezes chamada de canal axial (também conhecida por zona de radiação inicial), onde a amostra é introduzida, é a que apresenta uma temperatura mais baixa, entre 5000 e 7000 K. O canal axial, para além do árgon, contém também o analito, outros componentes da amostra e algum solvente. Contudo, contrariamente ao que sucede com os iões do analito, no canal axial encontra-se

menor quantidade de iões de árgon, aparecendo estes em maior quantidade na parte do plasma mais próxima das paredes da tocha. Este efeito resulta do facto da amostra ser “injectada” directamente na região central do plasma e da incapacidade que os iões do analito apresentam para se deslocarem para a região mais exterior deste, devido à configuração que ele apresenta.

No plasma de configuração toroidal é possível identificar quatro regiões com diferentes temperaturas: i) a região com temperatura mais alta, mais próxima da parede externa da tocha; ii) a zona de radiação inicial, localizada no canal axial, alinhada com a bobina de Tesla; ambas já referidas acima, e também iii) a zona analítica normal, localizada imediatamente a seguir à zona de radiação inicial; e iv) a zona de pré-aquecimento, que está localizada no canal axial, antes de chegar ao plasma. Estas zonas estão esquematicamente representadas na Figura 1.19. A vaporização do solvente e a decomposição do aerossol seco em moléculas geralmente ocorre na zona de pré-aquecimento, antes da amostra atingir o plasma. A atomização ou a decomposição da matéria cristalina e a dissociação das moléculas ocorre na zona de radiação inicial. Por fim, na zona analítica normal, ocorre a ionização das espécies atómicas produzidas na zona de radiação inicial.

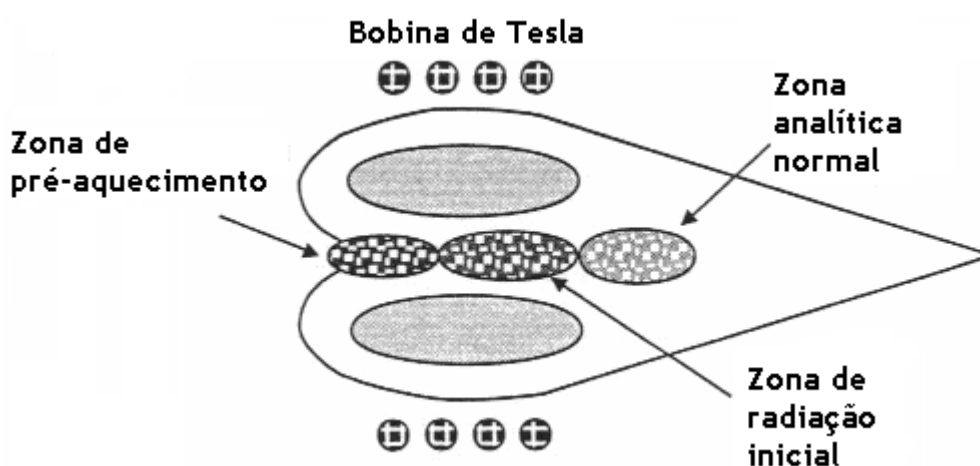


Figura 1.19

Representação esquemática das diferentes zonas de temperatura encontradas no plasma. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

À pressão atmosférica, o árgon apresenta uma energia de ionização de cerca de 15,76 eV e a maioria dos elementos da tabela periódica apresenta um primeiro potencial de ionização abaixo de 16 eV, pelo que o plasma tem a capacidade de produzir iões positivos, monovalentes, para praticamente todos os elementos da tabela periódica. Adicionalmente, como a maioria dos elementos apresenta um segundo potencial de ionização acima do potencial de ionização do árgon, muito poucos iões bivalentes serão formados, com excepção para o estrôncio e para o bário e, em menor extensão, para o chumbo.

1.2.2.3.5.3 Interface ICP – Espectrómetro de massa

A função da interface entre o plasma de acoplamento indutivo (ICP) e o espectrómetro de massa (MS) é extrair uma fracção representativa dos iões produzidos no plasma e transportá-los desde o plasma, que se encontra à pressão atmosférica e onde a temperatura é muito elevada, para o espectrómetro de massa, que se encontra sob pressão reduzida e à temperatura ambiente, no qual esses iões vão ser separados e quantificados (Figura 1.20).

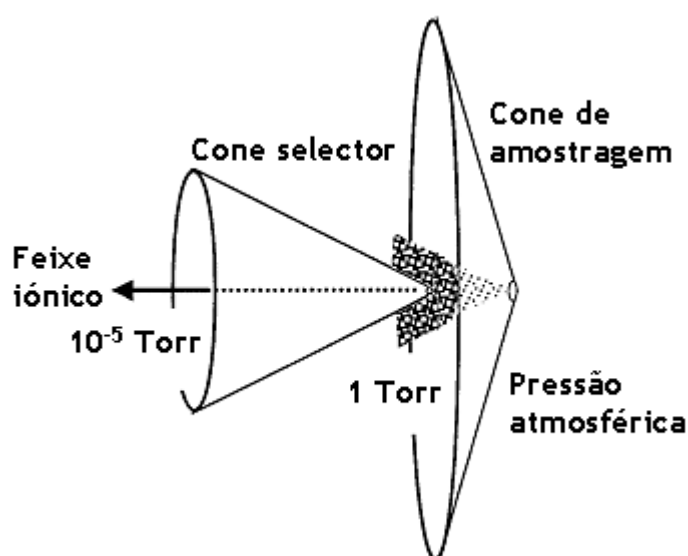


Figura 1.20

Representação esquemática da interface ICP-MS. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

São componentes fundamentais desta interface ICP – MS dois ou mais cones metálicos, geralmente de níquel ou de platina, presos a um suporte metálico refrigerado a água.

O cone mais exterior (mais próximo do plasma) é o cone de amostragem (do inglês, *sampler cone*), estando o seu vértice inserido na zona analítica normal do plasma. Nesse vértice existe um orifício com um diâmetro de aproximadamente 1 mm, por onde passam os iões formados no plasma em direcção ao espectrómetro de massa.

Imediatamente atrás do cone de amostragem está o cone selector (do inglês, *skimmer cone*). Este, tem no seu vértice um orifício de muito menor diâmetro (<0,5 mm).

O valor da pressão no espaço entre os dois cones é de cerca de 1 Torr, o que é conseguido por meio de uma bomba de vácuo mecânica. Na região por detrás do cone selector, o valor de pressão é de 10^{-5} Torr, pressão à qual tipicamente opera um espectrómetro de massa. Este valor de pressão é conseguido através do uso de bombas turbomoleculares ou de difusão de óleo.

No sentido de se conseguir melhorar algumas características analíticas do equipamento, a interface descrita pode sofrer várias alterações, das quais se destacam: i) a utilização de um valor de pressão inferior a 1 Torr no espaço entre os dois cones (i.e., logo na primeira etapa de abaixamento dos valores de pressão), o que melhora a sensibilidade analítica na determinação de alguns elementos; e ii) a utilização de três etapas para a redução dos valores de pressão.

1.2.2.3.5.4 Lentes iónicas

Assim que o feixe de iões passa a interface e entra no espectrómetro de massa, os iões carregados positivamente são atraídos por um eléctrodo de extracção, com carga eléctrica negativa, e enviados para um conjunto de lentes electrostáticas. Através da variação independente dos valores de potencial aplicados a cada uma

destas lentes, o feixe de iões é focado, seguindo assim para análise pelo espectrómetro de massa.

Geralmente o primeiro componente do conjunto de lentes electrostáticas, alinhado com o feixe de iões proveniente do cone selector, é um disco metálico chamado de “barreira fotónica”. O objectivo deste disco é interceptar os fotões e espécies energéticas neutras produzidos no plasma, impedindo-os de atingir o analisador de massas, nas paredes do qual seriam reflectidos, atingindo posteriormente o detector. Assim, por acção da “barreira fotónica” diminui-se o sinal de fundo instrumental (do inglês, *background*) do espectrómetro de massa e, conseqüentemente, conseguem-se limites de detecção mais baixos.

O eléctrodo de extracção acima referido tem como principal função exercer uma atracção electrostática sobre os iões positivos, “puxando-os” através da interface. Com esta acção, melhora-se a transmissão dos iões do plasma para o espectrómetro de massa e, com isso, os limites de detecção dos iões com menor relação m/z (que tendencialmente seriam “empurrados” para fora do feixe pelos iões com maior relação m/z), resultando numa resposta instrumental mais uniforme ao longo de todo o espectro de massas (0-300 *uma*, i.e., 0-300 unidades de massa atómica).

No sentido de melhor se perceber o papel das lentes iónicas no equipamento de ICP-MS, far-se-á uma breve alusão à dinâmica de fluxo do feixe de iões que provém do plasma, passando pela interface em direcção ao espectrómetro de massa. Quando os iões gerados no plasma passam pelo cone selector, em virtude da redução de pressão de cerca de 1 Torr para cerca de 10^{-5} Torr, ocorre o afastamento dos electrões do feixe de iões e simultaneamente uma rápida expansão deste último. De facto, devido ao pequeno tamanho dos electrões (carregados negativamente) relativamente aos dos iões (carregados positivamente), os primeiros afastam-se mais do feixe de iões do que os segundos, resultando um feixe de iões com uma carga positiva. Este é o primeiro passo do processo de separação de cargas. Com isso, a carga positiva do feixe de iões faz com que haja uma tendência natural para os iões se repelirem uns

aos outros. Se esta tendência não fosse contrariada, os iões com uma maior relação m/z situar-se-iam no centro do feixe e forçariam os iões com menor relação m/z a ocupar a parte mais exterior. Este efeito é tão mais evidente quanto maior for a densidade iónica. Chama-se *efeito espaço-carga* e depende muito da magnitude da população de iões com uma determinada relação m/z relativamente à população total de iões do feixe, na qual aquela população de iões está incluída. Esta situação permite explicar muitos dos “efeitos de matriz” que ocorrem em ICP-MS, uma vez que uma pequena alteração na corrente iónica total, por exemplo por adição de elementos da matriz, pode mudar a fracção de analito que passa através das lentes. Regra geral, o transporte dos iões do analito é suprimido em maior extensão por matrizes com iões de elevada massa, e os iões de um analito de massa elevada são menos afectados do que iões de um analito de menor massa. Por tudo isto, o grau de perda durante a “transmissão” dos iões para o espectrómetro de massa iria depender da energia cinética dos iões: os iões com maior energia cinética (ou seja, aqueles de maior massa) seriam transmitidos preferencialmente em relação aos iões com energia cinética média ou baixa. Assim, o segundo passo do processo de separação de cargas é a colocação dos iões correspondentes aos analitos que se pretendem determinar no centro do feixe de iões, por meio de aplicação de um potencial num ou mais dos componentes do conjunto de lentes electrostáticas. O valor de potencial “óptimo”, com o qual é conseguida a máxima sensibilidade analítica, vai depender da massa do elemento que se pretende determinar, pelo que no caso de se estar a efectuar uma análise multi-elementar tem de se encontrar uma solução de compromisso, que será tanto maior quanto maior for a diferença de massa entre os vários analitos.

O processo de separação de cargas acima descrito apenas é possível se o potencial na zona de interface se mantiver igual a zero, i.e., se não houver interacção electrostática significativa entre o feixe de iões e o cone e entre os vários iões do feixe, sendo a expansão dos iões através do cone selector controlada por efeito da normal dinâmica do gás e não da electrodinâmica, pois só assim todos os iões

apresentam um valor de velocidade semelhante, ficando a sua energia cinética dependente apenas do valor da sua massa ($E_c = \frac{1}{2} m \times v^2$).

Depois de optimizado o valor de potencial aplicado a cada uma das lentes electrostáticas, caso a composição das amostras difira significativamente da composição dos padrões de calibração, ou entre amostras, irá ocorrer o fenómeno que se denomina de “viés” ou *discriminação de massas* (do inglês, *mass bias*). Este é principalmente devido ao efeito *espaço-carga* que, como já foi referido, induz a concentração dos iões de maior massa no centro do feixe (com afastamento dos iões de massa menor). Na realidade, o *viés das massas* (*mass bias*) é dependente do tipo de instrumento utilizado, mas é principalmente influenciado pelo valor absoluto da massa do analito, pela sua energia cinética e pela densidade iónica e repulsão entre os diferentes iões (efeito *espaço-carga*). Na medida em que a massa e, em menor extensão, a energia cinética de um determinado analito se mantêm constantes durante a análise, a diferença verificada entre sucessivas determinações do mesmo analito devida ao *viés das massas* é grandemente determinada pelo efeito *espaço-carga* (Batey *et al.*, 2005). Assim, mais uma vez se salienta a necessidade da amostra ter uma composição semelhante à dos padrões de calibração, uma vez que a presença de elementos diferentes na composição da matriz pode afectar de modo muito significativo o sinal analítico obtido. Isto é particularmente verdade para determinações efectuadas recorrendo ao chamado “plasma frio”, na medida em que neste caso os iões do analito representam a fracção de iões dominante relativamente à população total de iões, contrariamente ao que acontece em condições de “plasma quente” em que os iões Ar^+ são as espécies proporcionalmente dominantes no feixe iónico.

Para contornar esta possível causa de erro analítico, é comum recorrer-se à adição de um padrão interno ou então à análise isotópica, ambas referidas adiante.

1.2.2.3.5.5 Espectrómetro de massa

O espectrómetro de massa é essencialmente um “filtro” de massas, que permite isolar uma população de iões com uma determinada relação m/z da população total de iões. Depois de separados, os feixes iónicos individuais (ou seja, os feixes correspondentes à população de iões com um determinado valor de m/z) são sequencialmente (ou simultaneamente, no caso dos espectrómetros multi-colectores) encaminhados para um detector que mede as correntes iónicas correspondentes.

Há vários tipos de espectrómetros de massa, cada um apresentando características e vantagens específicas. O mais comumente utilizado é o espectrómetro com analisador de massas do tipo quadrupolo. Este dispositivo caracteriza-se por grande simplicidade de operação, boa estabilidade e um custo de produção relativamente baixo. Contudo, apresenta um poder de resolução limitado (cerca de 1 *uma*) relativamente a outro tipo de espectrómetros, como seja os que empregam campos magnéticos para dispersar os feixes iónicos, que permitem resoluções muito mais elevadas (poder de resolução de cerca de 1 parte em 10000). Estes últimos, requerem electromagnetos altamente estáveis, os quais dificilmente são capazes de fazer um varrimento tão rápido do espectro de massas e, além disso, apresentam um custo de produção muito superior ao dos espectrómetros de massa com analisador do tipo quadrupolo.

Há também espectrómetros que recorrem a outros princípios para efectuarem a separação de massas, como os espectrómetros de tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*) e os espectrómetros de captura iónica (do inglês, *ion-trap*).

Os diferentes tipos de espectrómetros de massa acima referidos irão ser descritos mais pormenorizadamente no contexto desta dissertação. Contudo, convém primeiro referir os dois parâmetros que permitem determinar o desempenho de um espectrómetro de massa no que respeita à sua capacidade para separar o sinal do analito de um sinal adjacente, por exemplo o correspondente a uma interferência

espectral. São eles o poder de resolução e a “*abundance sensitivity*”. A exposição destes dois parâmetros será efectuada de um modo mais dirigido à realidade dos espectrómetros de massa com analisador do tipo quadrupolo, uma vez que foi esse o equipamento utilizado no âmbito desta dissertação.

Poder de resolução

A resolução de um espectrómetro de massa é definida como a medida da sua capacidade para separar regiões contíguas do espectro de massas (i.e., regiões com um valor de massa adjacente). Se considerarmos dois sinais analíticos (picos com um valor de massa M_1 e M_2) adjacentes no espectro de massas, a sua separação é considerada resolvida se a magnitude do vale entre os dois picos (X_{vale} , altura medida desde a linha de base) for inferior a 10% da magnitude média desses dois picos (X_{med} , altura média) (Figura 1.21), ou seja, $X_{\text{med}} = (X_1 + X_2) / 2 > 0,1X_{\text{vale}}$.

Dividindo a massa média dos dois picos [$M_{\text{med}} = (M_1 + M_2) / 2$] pela diferença de massas entre eles ($M_1 - M_2 = \Delta M$) obtém-se o valor de R , que representa o *poder de resolução* ($R = M_{\text{med}} / \Delta M$) (Batey *et al.*, 2005; Thomas, 2003).

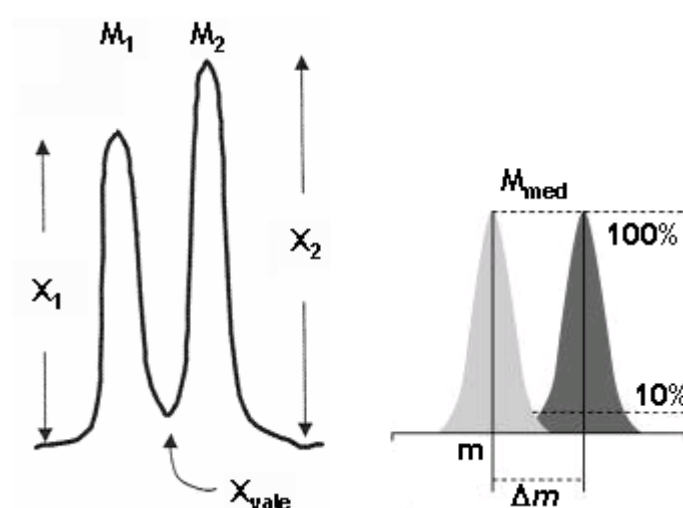


Figura 1.21

Representação esquemática de dois sinais analíticos contíguos no espectro de massas, resolvidos. Imagem adaptada (Batey *et al.*, 2005; Taylor, 2001).

A maioria dos espectrómetros de massa com analisador do tipo quadrupolo tem um poder de resolução de cerca de 300, i.e., teoricamente este equipamento é capaz de resolver sinais com uma diferença de massa entre cerca de 0,03 *uma* (para analitos com relação m/z mais próxima de 10) e 1 *uma* (para analitos com relação m/z mais próxima de 300). Na figura 1.22 é ilustrada, para um valor de $R = 300$, a variação da capacidade do espectrómetro para resolver dois sinais contíguos, quando localizados em diferentes regiões do espectro de massas. Na maioria das situações o poder de resolução do quadrupolo é suficiente. Contudo, para resolver interferências isobáricas (i.e., espécies com um valor de massa coincidente ao nível das unidades) é necessário um poder de resolução superior a 3,000. Na impossibilidade de se utilizar um espectrómetro de massa com um poder de resolução superior, pode-se recorrer à aplicação de correcções matemáticas ou à separação prévia dos elementos interferentes.

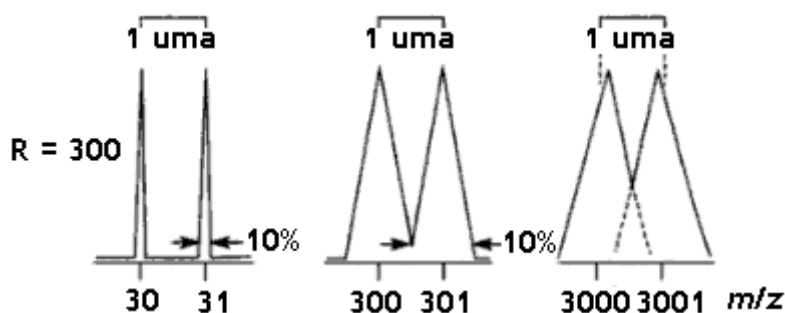


Figura 1.22

Representação esquemática da variação da capacidade para resolver dois sinais contíguos localizados em diferentes regiões do espectro de massas, para um valor de $R = 300$.

“Abundance sensitivity”

Como já foi referido acima, em espectrometria de massa é também muito importante o conceito de “*abundance sensitivity*”. Esta é definida pela IUPAC como a razão entre o valor máximo de corrente electrónica, medido na massa m , e o valor da corrente electrónica do mesmo elemento medida numa massa adjacente: $m \pm 1$. Quanto maior for esta razão, melhor será o desempenho do espectrómetro de massa.

A medida da “*abundance sensitivity*” permite determinar a capacidade do equipamento quantificar analitos que existam na amostra em muito baixa concentração, quando simultaneamente existam outros analitos, ou componentes da amostra, em concentração muito elevada. Na prática, as diferenças na “*abundance sensitivity*” reflectem-se na forma/perfil do sinal analítico, particularmente no arrastamento, i.e., na cauda (do inglês, *peak tailing*), que ocorre principalmente na “zona ascendente” do pico (do inglês, *low mass side*) (Thomas, 2003).

A “*abundance sensitivity*” de um equipamento de ICP-MS com analisador do tipo quadrupolo é geralmente de 10^6 (*low mass side*) ou superior (10^7 a 10^8 - *high mass side*).

Espectrómetros de massa

Os espectrómetros de massa com analisador do tipo quadrupolo consistem em quatro barras cilíndricas dispostas paralelamente umas às outras (Figura 1.23). Estas barras são construídas com um metal altamente polido ou, alternativamente, com cerâmica revestida com uma camada de metal. O “canal” central formado pela disposição perfeitamente simétrica das quatro barras cilíndricas está alinhado com o feixe de iões proveniente das lentes iónicas. Em determinadas condições, da mistura de iões com diferentes valores de m/z que passa pelo “canal” central do analisador de massas, numa trajectória paralela às barras, apenas uma população de iões, com um determinado valor de m/z , atravessa livremente esse canal e sai pelo extremo oposto. Todos os outros iões, com uma relação m/z diferente, são “rejeitados” pelo quadrupolo. Esta operação do quadrupolo envolve a aplicação de um determinado potencial combinado, eléctrico e de radiofrequência, aos dois pares de barras. À medida que o potencial eléctrico vai sendo alterado, gera um campo electromagnético que interage com as várias populações de iões. Todos os iões serão desviados numa trajectória em espiral e chocarão com as barras cilíndricas do

quadrupolo, à excepção dos iões com um determinado valor de m/z que seguirão em direcção ao detector.

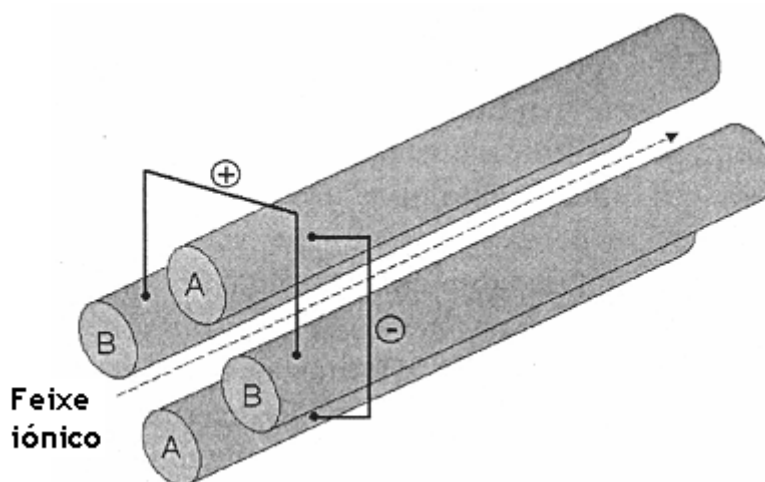


Figura 1.23

Representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

A capacidade que um espectrómetro de massa com analisador do tipo quadrupolo apresenta para separar iões com diferentes valores de m/z é determinada por uma combinação de factores, incluindo, entre outros, a forma, o diâmetro e o comprimento das barras cilíndricas, as características do vácuo formado, o potencial eléctrico e de radiofrequência aplicados e a energia cinética dos iões (quando entram e quando saem do quadrupolo) (Thomas, 2003). Apesar deste último factor afectar de modo particularmente significativo a “*abundance sensitivity*”, todos eles influenciam a estabilidade dos iões à medida que estes se deslocam ao longo do canal central do analisador de massas e, desse modo, a capacidade deste dispositivo para separar iões com diferentes valores de m/z (Thomas, 2003).

Como foi referido, fazendo variar o campo electromagnético criado pelas barras do quadrupolo, iões com diferentes valores de m/z podem ser sucessiva e selectivamente transportados através do analisador para o detector. Este campo pode ser modificado, quer por alteração do potencial eléctrico quer por alteração do potencial de radiofrequência. Assim, fazendo variar continuamente o potencial

aplicado às barras ao longo do tempo, iões com diferentes valores de m/z vão passando sequencialmente em direcção ao detector, o que resulta no que vulgarmente se designa por “varrimento de massas”.

Esta variação do potencial aplicado às barras é controlada por computador. Geralmente, são possíveis varrimentos a um ritmo de $3,000 \text{ uma s}^{-1}$, o que significa que é possível obter-se um espectro completo (0 - 300 *uma*) em apenas cerca de 0,1s e, consequentemente, é também possível quantificar sinais analíticos transientes com grande precisão.

Para além da análise quantitativa, o “varrimento de massas” permite ainda efectuar de um modo rápido análises multi-elementares qualitativas ou semi-quantitativas.

O “varrimento de massas” pode ser feito em todo o espectro (geralmente, ${}^6\text{Li} - {}^{238}\text{U}$) ou apenas nalgumas regiões pré-determinadas, por serem as que contêm os elementos com interesse analítico. Além disso, esta estratégia é ainda conveniente naqueles casos em que se pretende evitar que cheguem ao detector os iões de elementos que existam em grande quantidade no feixe iónico, como é o caso do ${}^{40}\text{Ar}$. Também no intuito de proteger o detector, devem ser evitadas as regiões do espectro entre 13 e 22 m/z , que contêm picos originados pelo N, O e H_2O , e entre 32 e 42 m/z , que contêm picos originados pelo O_2 e pelo Ar.

Outro modo de funcionamento do analisador de massas é o modo de *peak jumping* ou de *peak hopping*. Este permite obter grande precisão e sensibilidade e é o modo recomendado para análise quantitativa.

O modo de *peak jumping* consiste em aplicar, através de controlo por computador, determinados valores de potencial às barras do quadrupolo de modo que apenas alguns iões com um determinado valor de m/z (analitos) possam ser quantificados. O valor da corrente iónica para cada valor de m/z é integrado num período de tempo específico, o que acontece sequencialmente para cada analito de interesse, seleccionado antes da análise. Podem utilizar-se diferentes tempos de integração para isótopos com diferentes valores de m/z , seleccionados de acordo com a

abundância relativa de cada um deles. Deste modo, é possível conseguir-se uma precisão e sensibilidade analíticas semelhantes para todos os analitos que estão a ser determinados.

Os espectrómetros de massa com analisador de massas de sector magnético empregam o seguinte princípio: uma partícula com carga, ao passar por um campo magnético, é desviada, fazendo um determinado ângulo que é proporcional à sua massa e à sua carga. O raio da curvatura definida aquando do desvio está dependente do valor de m/z do ião e da força exercida pelo campo magnético.

A principal vantagem dos analisadores de massas de sector magnético é o seu elevado poder de resolução, pelo que são capazes de efectuar determinações virtualmente livres de interferências isobáricas. Além disso, devido à sua grande sensibilidade analítica e baixo ruído instrumental, permitem obter limites de detecção muito baixos.

Existem dois tipos de analisadores de massas de sector magnético: o *single focusing* e o *double focusing* ou *double sector*. O analisador de massas de sector magnético do tipo *double focusing* utiliza dois sectores independentes. Para além do sector magnético (que separa os iões de acordo com o valor da sua m/z), utiliza também um analisador electrostático, que “filtra” os iões de acordo com a sua energia cinética, independentemente do seu valor de m/z . A utilização de dois sectores aumenta muito o poder de resolução conseguido.

Um espectrómetro de tempo de voo não depende de um campo magnético, electrostático ou de radiofrequências para dispersar ou filtrar iões com um determinado valor de m/z . O feixe de iões é acelerado num dispositivo chamado *drift tube*; cada população de iões com um determinado valor m/z adquire uma velocidade característica, de modo que os iões mais leves chegam ao detector antes dos iões de massa maior. Esta diferença nas velocidades é utilizada para discriminar os diferentes analitos. Aumentar o percurso ao longo do *drift tube* melhora o poder de resolução. Para este processo é necessário que o fluxo de iões ao longo do *drift*

tube seja pulsado o que limita a integração do sinal analítico e também provoca um aumento do ruído instrumental.

Uma das vantagens dos espectrómetros de tempo de voo é a possibilidade que apresentam de monitorizar em simultâneo todos os iões do espectro de massas, característica particularmente vantajosa nos casos em que se obtêm sinais transientes.

As características de funcionamento dos espectrómetros de captura iónica são semelhantes às dos espectrómetros com analisador de massas do tipo quadrupolo. Ao invés das barras cilíndricas dispostas simetricamente características do quadrupolo, os espectrómetros de captura iónica têm um eléctrodo em formato de anel (tipo *donut*) e dois eléctrodos adicionais, simetricamente dispostos. É aplicada uma determinada radiofrequência ao eléctrodo em forma de anel, que oscila a uma frequência suficiente para reter todos os iões, excepto aqueles com um determinado valor de m/z .

A utilização de apenas um analisador de massas de captura iónica apresenta problemas relacionados com a colisão e desvio de iões devido à presença abundante de espécies de árgon, provenientes do plasma. Por esse motivo, tem-se tentado aplicar este tipo de analisadores conjuntamente com outros.

1.2.2.3.5.6 *Detector*

O detector tem por função medir a corrente iónica correspondente a um dado analito, com um determinado valor m/z , previamente separado (“filtrado”) pelo analisador.

Os detectores mais utilizados são os do tipo multiplicador: dínodo multiplicador de electrões contínuo, dínodo multiplicador de electrões discreto e a gaiola de *Faraday* (em inglês, *Faraday cup*).

O dínodo multiplicador de electrões contínuo é um dispositivo capaz de converter uma corrente iónica numa corrente eléctrica mensurável. Esta conversão é conseguida através da colisão dos iões do feixe iónico com a superfície do detector, a qual está revestida por um óxido metálico. Por cada colisão, é libertado um ou mais electrões, os quais são depois multiplicados através de sucessivas colisões, à medida que os electrões libertados são acelerados ao longo do seu percurso pelo detector. O detector é em forma de tubo curvado e afunilado, o que leva os electrões libertados a colidir na parede oposta, provocando a libertação de mais electrões, e assim sucessivamente (Figura 1.24). Na extremidade do detector mais próxima do analisador é aplicado um potencial elevado, negativo, para desse modo atrair os iões positivos. Por outro lado, ao longo do tubo o potencial positivo vai aumentando, para acelerar os electrões carregados negativamente. Por fim, os electrões atingem o colector onde é medido o sinal.

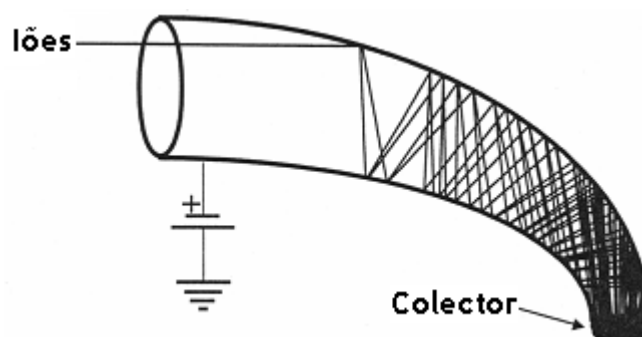


Figura 1.24

Representação esquemática de um detector do tipo dínodo multiplicador de electrões contínuo. Imagem adaptada (Taylor, 2001).

O modo mais comum de operação do dínodo multiplicador de electrões contínuo é o modo de “contagem de pulsos” (do inglês, *pulse-counting mode*). Neste modo, é aplicado um potencial com um valor suficientemente alto para que o sinal seja muito amplificado, o que pode conduzir o detector a rapidamente entrar em saturação. Com este modo de operar pode conseguir-se uma amplificação na ordem das 10^8

vezes. Quando se está a utilizar o modo de “contagem de pulsos”, se um ião colidir com o detector antes deste produzir o pulso correspondente ao ião que lhe precedeu, o detector não será capaz de o medir, situação que deve ser corrigida. Isto acontece devido ao chamado “tempo morto” (do inglês, *dead time*), que é o tempo mínimo que deve existir entre dois eventos de modo a serem detectados dois pulsos separados, um pulso por cada evento.

Outro modo de funcionamento do dínodo multiplicador de electrões contínuo é o modo analógico (do inglês, *analog mode*). Neste modo é aplicado um potencial mais baixo ao detector, reduzindo a amplificação de sinal para 10^3 ou menos, não sendo necessárias correcções devidas ao “tempo morto”, uma vez que o detector não está a funcionar num modo em que seja capaz de saturar.

A grande desvantagem do dínodo multiplicador de electrões contínuo é o seu limitado tempo de vida. De facto, deteriora-se mesmo não sendo usado, pelo que não há hipótese de manter em reserva um detector sobressalente por longos períodos de tempo. Adicionalmente, é um detector particularmente susceptível a danos quando utilizado para medir feixes iónicos de elevada intensidade.

O dínodo multiplicador de electrões discreto é um dispositivo constituído por uma série de placas individuais (dínodos) revestidas por um óxido metálico, dispostas de modo a que os electrões libertados numa placa são acelerados e vão colidir com a placa seguinte, onde provocam a libertação de mais electrões, e assim sucessivamente, durante 15 ou 16 vezes, até finalmente atingirem o colector. Com estes detectores consegue-se uma amplificação de sinal de cerca de 10^6 vezes. O tempo de vida de um detector do tipo dínodo multiplicador de electrões discreto, a funcionar normalmente, é de cerca de 1 a 2 anos.

Os detectores do tipo gaiola de *Faraday* são utilizados quando se tem uma corrente de iões de cerca de 10^6 iões s^{-1} , uma vez que neste caso os detectores de tipo multiplicador de electrões não são capazes de dar uma resposta linear. A gaiola de *Faraday* é um detector analógico, que consiste numa gaiola metálica que colhe o

feixe de iões. O sinal originado pela colisão dos iões na gaiola de *Faraday* é depois amplificado.

A vantagem dos detectores do tipo gaiola de *Faraday* é a sua estabilidade, podendo estes ser utilizados para medir grandes correntes de iões sem que isso os danifique. Adicionalmente, podem ser ainda utilizados em análises nas quais se recorra ao método do cálculo da razão isotópica, na medida em que não estão sujeitos ao fenómeno de *viés das massas*, o que resulta numa boa exactidão dos resultados obtidos. Contudo, este tipo de detectores não é adequado para a quantificação de elementos vestigiais, pois não amplifica suficientemente o sinal. No sentido de contornar esta desvantagem apresentada pelos detectores do tipo gaiola de *Faraday*, hoje os equipamentos comercializados muitas vezes empregam já uma combinação de detectores: um detector do tipo gaiola de *Faraday* e um detector do tipo multiplicador de electrões, sendo assim adequados quer para a determinação de analitos que existam em grande quantidade na amostra, quer para a determinação de elementos vestigiais.

1.2.2.3.5.7 Interferências e padrão interno em ICP-MS

No Capítulo 6 da presente dissertação é apresentada uma descrição detalhada do tipo de interferências que são características das determinações por ICP-MS, sendo inclusivamente apresentados alguns exemplos directamente relacionados com o trabalho apresentado nesse Capítulo, pelo que este assunto não será aqui abordado. Também a referência à utilização de padrões internos, elementos normalmente utilizados para monitorizar e corrigir problemas relacionados com a variação da sensibilidade do equipamento ao longo da análise, e os critérios que devem ser seguidos na sua selecção, são discutidos nesse mesmo Capítulo.

1.2.2.3.5.8 Diluição isotópica e razão isotópica

O equipamento de ICP-MS possui a capacidade única, já anteriormente referida, de permitir a quantificação na amostra de isótopos estáveis do mesmo analito. Esta possibilidade permite que se recorram a métodos quantitativos de análise impossíveis de utilizar com outras técnicas. Assim, além dos métodos usuais de quantificação (método da curva de calibração e método da adição de padrão), em ICP-MS é ainda possível a quantificação do analito recorrendo aos métodos de diluição isotópica e do cálculo da razão isotópica.

A quantificação com base no método de diluição isotópica permite determinar de um modo muito preciso e exacto a concentração de vários analitos presentes na amostra, sem requerer a utilização de amostras de referência certificadas. Este é o modo de se obterem resultados com maior precisão e exactidão. A abundância relativa dos vários isótopos de um elemento é conhecida. O princípio da diluição isotópica envolve a adição de uma quantidade conhecida de um isótopo estável do analito à amostra, determinando-se de seguida a concentração na amostra desse isótopo enriquecido e de um outro igualmente estável. A concentração do analito na amostra é depois obtida por meio de um cálculo que envolve uma expressão matemática conhecida, utilizada especificamente para esse efeito. É, contudo, muito demorado, pelo que normalmente não é utilizado em análise de rotina, antes sendo reservado como método de referência. Além disso, apresenta ainda outros inconvenientes, como seja o facto de apenas ser aplicável a elementos que tenham mais de um isótopo; de requer a utilização de padrões certificados enriquecidos num isótopo (usualmente caros) e também de não permitir corrigir interferências espectrais (muito embora permita corrigir interferências com base no aumento ou na supressão do sinal) (Thomas, 2003).

A quantificação do analito recorrendo ao método do cálculo da razão isotópica assenta no mesmo princípio da quantificação por diluição isotópica: determinação

exacta da razão de dois isótopos de um mesmo elemento na amostra. Nesse sentido, o isótopo com interesse analítico é comparado com um isótopo de referência do mesmo elemento. Pode-se comparar apenas a concentração entre dois isótopos (por exemplo, ^{204}Pb com ^{206}Pb); ou então, entre um isótopo e todos os restantes (de referência) de um elemento (por exemplo, a razão entre ^{204}Pb e ^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{208}Pb). A razão isotópica é o quociente entre a intensidade do isótopo de interesse e a intensidade do isótopo de referência. Uma vez que uma única determinação (“leitura”) da amostra permite calcular esta razão, normalmente dispensa-se a calibração externa clássica. Contudo, no caso da concentração (i.e., a abundância relativa) dos dois isótopos ser significativamente diferente, é preferível calcular também a razão isotópica de um padrão de composição isotópica conhecida, para assim se poder comparar o valor de razão isotópica obtido com o valor teórico, e aplicar uma correcção matemática capaz de compensar eventuais diferenças. De facto, ao utilizar um padrão de composição isotópica conhecida é possível verificar se o isótopo de concentração superior não está a provocar a supressão do sinal do isótopo de concentração inferior, enviesando os resultados. Este efeito de *viés das massas* não é muito significativo no caso de os isótopos apresentarem uma concentração semelhante como, por exemplo, ^{107}Ag (51,839%) e ^{109}Ag (48,161%). Contudo, pode ser problemático se houver uma diferença acentuada na concentração dos dois isótopos como, por exemplo, ^{235}U (0,72%) e ^{238}U (99,275%).

1.2.2.3.5.9 Sistemas de fluxo e ICP-MS

O recurso ao acoplamento de sistemas de fluxo a equipamento de ICP-MS, no fundo, tal como acontece com as outras técnicas analíticas já referidas, visa e permite tirar maior partido das potencialidades da instrumentação.

Recorrendo a estratégias de fluxo, ao invés de se introduzir a amostra de um modo contínuo, podem introduzir-se volumes discretos (pequenos segmentos) de amostra, de forma repetida, num transportador que flui continuamente, podendo este ser um

gás ou um líquido, sendo a última situação a mais comum. Quando a amostra chega ao nebulizador, este produz um aerossol que contém quantidades discretas de amostra, de uma forma repetida. Quando estas parcelas de aerossol de amostra atingem o plasma, produzem-se iões que vão depois dar origem a um sinal analítico transiente. Este modo de proceder permite a análise de pequenos volumes de amostra, pois não há necessidade de se obter um sinal estacionário, como acontece no modo de introdução contínua de amostra (Todolí e Mermet, 2006). Além disso, permite também a análise directa de amostras com um elevado teor de sólidos dissolvidos, uma vez que apenas uma quantidade muito pequena de amostra é introduzida no plasma, imediatamente seguida de um transportador, o que minimiza os efeitos da matriz, uma vez que os diferentes componentes do equipamento de ICP-MS não estão continuamente a ser expostos ao elevado teor de sólidos, mas sim de um modo intermitente (Fujimori *et al.*, 1996).

Também a adição de reagentes, sejam eles o padrão interno ou outros como, por exemplo, os necessários para gerar a forma volátil de um determinado analito, pode ser efectuada em linha, diminuindo-se assim a possibilidade de contaminação da amostra.

No caso de amostras muito concentradas, é possível acoplar ao equipamento de ICP-MS um sistema de fluxo para que a diluição dessas amostras seja efectuada em linha. Por outro lado, nos casos em que a amostra requeira pré-concentração (quer com o intuito de melhorar os limites de detecção, quer com o intuito de eliminar interferências provenientes da matriz), também esta etapa pode ser efectuada em linha. Exemplo disso é precisamente o trabalho apresentado no Capítulo 6 da presente dissertação, no qual se apresentam os resultados obtidos com um sistema de fluxo do tipo SIA na determinação de platina, paládio e ródio em amostras de urina por ICP-MS.

No que respeita a amostras biológicas, que são tipicamente de composição complexa, de facto o que é mais comum aquando da sua análise por ICP-MS é recorrer-se a

sistemas de fluxo que permitam reduzir as interferências provocadas pela matriz, separando/pré-concentrando o analito dos restantes componentes da amostra, (Beauchemin, 2004; Falta *et al.*, 2007; Larivière *et al.*, 2008; Rudolph *et al.*, 2006; Wang e Hansen, 2003a).

1.3. Enquadramento e objectivos gerais do trabalho

Em termos históricos, a EAA/chama foi a técnica analítica que teve o maior impacto em Química Clínica, ao viabilizar o estudo alargado dos elementos vestigiais. Esta, devido às vantagens que apresenta, é ainda hoje muito utilizada. O trabalho pioneiro efectuado com esta técnica foi continuado e mais aprofundado com o aparecimento da EAA/AE. Mais recentemente, devido às suas potencialidades, a técnica de ICP-MS veio introduzir novos tópicos de interesse nesta área, que estão a ser explorados e que muito poderão contribuir para o conhecimento da patogénese de algumas doenças e, desse modo, para um tratamento mais eficaz das mesmas.

O acoplamento de sistemas de fluxo, em termos gerais, permite expandir as potencialidades analíticas das diferentes técnicas de espectrometria. De facto, como tem sido amplamente evidenciado, os sistemas de fluxo tornam possível o aumento do rendimento analítico, a redução do consumo de amostra e de reagentes (e consequentemente também da produção de efluentes), a melhoria das características analíticas da técnica (nomeadamente, aumento da precisão, melhoria dos limites de detecção, maior selectividade), a redução do risco de contaminação da amostra e a automatização de procedimentos, entre outras vantagens já discutidas.

Neste contexto, o objectivo geral do trabalho realizado no âmbito desta dissertação foi a construção de sistemas de fluxo que pudessem expandir as potencialidades das várias técnicas espectrométricas usadas e facilitar a resposta a algumas solicitações

correntes no âmbito da Química Clínica. Para tal, foram exploradas diferentes estratégias de fluxo, que permitiam efectuar em linha diferentes tipos de pré-tratamento da amostra, muito comuns na análise laboratorial.

Assim, no trabalho apresentado no Capítulo 3 (determinação de rubídio por espectrofotometria atómica), é descrito um sistema de fluxo com multicomutação, no qual é também explorada a estratégia de diluição por amostragem de zonas, que permitia não só uma diluição muito elevada das soluções em análise, como também ajustava automaticamente o factor de diluição à concentração do analito na amostra.

No trabalho descrito no Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos no estudo da influência exercida por um fluxo pulsado, característico dos sistemas de fluxo com multi-impulsão, sobre os processos de aspiração, nebulização e atomização próprios do equipamento de espectrofotometria atómica. Para tal, foram estudados diferentes sistemas de fluxo com multi-impulsão de configuração muito simples. Por fim, para demonstrar a aplicabilidade analítica de alguns desses sistemas de fluxo, procedeu-se à determinação de cálcio e de magnésio em digestos de amostras de cabelo por EAA/chama e à determinação de sódio em amostras de urina por fotometria de chama. Em ambos os casos, os sistemas de fluxo utilizados permitiam efectuar diluições em linha através da introdução de microvolumes de amostra e da sua posterior dispersão num transportador adequado durante o percurso para o detector. Adicionalmente, o sistema utilizado para a análise dos digestos de amostras de cabelo permitia também a adição em linha de um “agente libertador”.

No Capítulo 5 descreve-se um sistema de fluxo composto por dois módulos com funcionamento independente que, actuando em simultâneo, permitiam a determinação de cobre em amostras de soro e de urina. Assim, recorrendo às estratégias de fluxo/amostragem: i) multicomutação/amostragem binária, era feita a diluição das amostras de soro, num dos módulos; e ii) multi-impulsão/*merging zones*, era feita a pré-concentração das amostras de urina, no outro módulo. Por fim, no

Capítulo 6 é apresentado um sistema de SIA que foi acoplado a um equipamento de ICP-MS. Este sistema permitia a pré-concentração/separação de ródio, paládio e platina a partir de amostras de urina e sua posterior determinação por ICP-MS, análise que é reconhecidamente sujeita a interferências espectrais e não espectrais, particularmente quando se utiliza um analisador do tipo quadrupolo.

1.4. Bibliografia

- Al Saleh, I.A., Fellows, C., Delves, H.T. e Taylor, A. (1993). Identification of sources of lead exposure among children in Arar, Saudi Arabia. *Annals of Clinical Biochemistry*. **30**: 142-145.
- Alfrey, A.C., LeGendre, G. R. e Kaehny, W.D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminium intoxication. *The New England Journal of Medicine*. **294**: 184-188.
- Almendral, M.J., Alonso, A., Porras, M.J., García, M.A. e Curto, Y. (2004). Determination of iron in tap and waste water using liquid-liquid extraction in a flow-injection system. *Microchimica Acta*. **147**: 117-123.
- Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F. e Zagatto, E.A.G. (1995). Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. *Analytica Chimica Acta*. **310**: 447-452.
- Bahramifar, N. e Yamini, Y. (2005). On-line preconcentration of some rare earth elements in water samples using C18-cartridge modified with l-(2-pyridylazo) 2-naphtol (PAN) prior to simultaneous determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *Analytica Chimica Acta*. **540**: 325-332.
- Batey, J.H., Prohaska, T., Horstwood, M.S.A., Nowell, G.M., Goenhaga-Infante, H. e Heiden, G.C. (2005). Mass spectrometers. In: Simon Nelms (ed.), Inductively coupled plasma-mass spectrometry handbook. 1ª edição, Blackwell Publishing. Oxford.
- Beaty, R.D. e Kerber, J.D. (2002). Control of graphite furnace interferences. In: PerkinElmer, Inc. (ed.), Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. PerkinElmer Inc.. Shelton.
- Beauchemin, D. (2004). Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. **76**: 3395-3416.
- Bolann, B.J., Rahil-Khazen, R., Henriksen, H., Isrenn, R. e Ulvik, R.J. (2007). Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **67**: 353-366.
- Burguera, J.L. e Burguera, M. (1998). On-line sample pre-treatment systems interfaced to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*. **123**: 561-569.
- Burguera, J.L. e Burguera, M. (2001). Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry configurations: recent developments and trends. *Spectrochimica Acta Part B*. **56**: 1801-1829.

- Burguera, M. e Burguera, J.L. (2007). On-line electrothermal atomic absorption spectrometry configurations: recent developments and trends. *Spectrochimica Acta Part B*. **62**: 884- 896.
- Carroll, A.D., Scampavia, L., Luo, D., Lernmark, A. E Ruzicka, J. (2003). Bead injection ELISA for the determination of antibodies implicated in type 1 diabetes mellitus. *Analyst*. **128**: 1157-1162.
- Cerdà, V., Estela, J.M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P. e Sitjar, P. (1999). Flow techniques in water analysis. *Talanta*. **50**: 695-705.
- Cerutti, S., Salonia, J.A., Gásquez, J.A., Olsina, R.A. e Martinez, L.D. Determination of scandium in river water by ICP-OES with flow-injection on-line preconcentration using knotted reactor and ultrasonic nebulization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **18**: 1198-1201.
- Costa, R.C.C., Almeida, A.A., Araújo, A.N. e Silva, V.L. (2002). Sequential preconcentration for the ETAAS determination of Pd in human urine. *Atomic Spectroscopy*. **23**: 17-23.
- Bolann, B.J., Rahil-Khazen, R., Henriksen, H., Isrenn, R. e Ulvik, R.J. (2007). Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **67**: 353-366.
- Dadfarnia, S., Assadollahi, T. e Haji Shabani, A.M. (2007). Speciation and determination of thallium by on-line microcolumn separation/preconcentration by flow injection-flame atomic absorption spectrometry using immobilized oxine as sorbent. *Journal of Hazardous Materials*. **148**: 446-452.
- Delves, H. T. (1970). A microsampling method for the rapid determination of lead in blood by atomic absorption spectrophotometry. *Analyst*. **95**: 431-438.
- Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*. **24**: 416-425.
- Falta, T., Limbeck, A., Stingeder, G. e Hann, S. (2007). Ultra-trace determination of palladium in human urine samples via flow injection coupled with ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*. **28**: 81-89.
- Fang, Z.L. (1998). Trends and potentials in flow injection on-line separation and preconcentration techniques for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. **53**: 1371-1379.

Fernandes, S.M.V., Rangel, O.A.S.S. e Lima, J.L.F.C. (1997). Flow injection determination of sodium, potassium, calcium, and magnesium in beer by flame emission and atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**: 1269–1272.

Fujimori, E., Wei, R., Sawatari, H., Chiba, K. e Haraguchi, H. (1996). Multielement determination of trace elements in sediment sample by inductively coupled plasma mass spectrometry with microsampling technique. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **69**: 3505-3511.

Geldmacher-von Mallinckrodt, M. e Meissner, D. (1994) General aspects of the role of metals in clinical chemistry. In: H.G. Seiler HG, A. Sigel, H.Sigel (eds.), Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Marcel Dekker Inc., New York.

Giné, M.F., Packer, A.P., Blanco, T. e Reis, B.F. (1996). Flow system based on a binary sampling process for automatic dilutions prior to flame atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **323**: 47-53.

Hansen, E.H., Miró, M., Long, X. e Petersen, R. (2006). Recent developments in automated determinations of trace level concentrations of elements and on-line fractionation schemes exploiting the micro-sequential injection–lab-on-valve approach. *Analytical Letters*. **39**: 1243-1259.

Haraguchi, H. (2004). Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **19**: 5-14.

Johnson, R.A., Baker, S.S. e Fallon, J.T. (1981). An occidental case of cardiomyopathy and selenium deficiency. *The New England Journal of Medicine*. **304**: 1210-1212.

Krachler, M. (2007). Environmental applications of single collector high resolution ICP-MS. *Journal of Environmental Monitoring*. **9**: 790-804.

Krayenbuehl, P.A., Walczyk, T., Schoenberg, R., von Blanckenburg, F. e Schulthess, G. (2005). Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood*. **105**: 3812-3816.

Kronka, E.A.M., Reis, B.F, Korn, M. e Bergamin F°, H. (1996). Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*. **334**: 287-293.

Lagalante, A.F. (1999). Atomic emission spectroscopy: a tutorial review. *Applied Spectroscopy Reviews*. **34**: 191-207.

Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F. e Santos, J.L.M. (1998). Continuous sample recirculation in an opened-loop multicommutated flow system. *Analytica Chimica Acta*. **377**: 103-110.

Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F., Santos, J.L.M. e Zagatto, E.A.G. (2002). Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta*. **466**: 125-132.

Larivière, D., Cumming, T.A., Kiser, S., Li, C. e Cornett, R.J. (2008). Automated flow injection system using extraction chromatography for the determination of plutonium in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **23**: 352-360.

Lima, J.L.F.C., Santos, J.L.M., Dias, A.C.B., Ribeiro, M.F.T. e Zagatto, E.A.G. (2004). Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta*. **64**: 1091-1098.

Martelli, P.B., Reis, B.F., Kronka, E.A.M., Image, H.B., Korn, M., Zagatto, E.A.G, Lima, J.L.F.C. e Araújo, A.N. (1995). Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys. *Analytica Chimica Acta*. **308**: 397-405.

Miranda, C.E.S, Reis, B.F., Baccan, N., Packer, A.P. e Giné, M.F. (2002). Automated flow analysis system based on Multicommutation for Cd, Ni and Pb on-line pre-concentration in a cationic exchange resin with determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **453**: 301-310.

Miró, M., Cerdà e Estela, J.M. (2002). Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in Analytical Chemistry*. **21**: 199-209.

Mirowitz, S.A., Westrich, T.J. (1992). Basal ganglial signal intensity alterations: reversal after discontinuation of parenteral manganese administration. *Radiology*. **185**: 535-536.

Moynahan, E. J. (1974). Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc deficiency disorder. *Lancet*. **2**: 399-400.

Moyano, S., Wuilloud, R.G., Olsina, R.A., Gásquez, J.A. e Martinez. (2001). On-line preconcentration system for bismuth determination in urine by flow injection hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. **54**: 211-219.

Ohno, T., Shinohara, A., Chiba, M., e Hirata, T. (2005). Precise Zn isotope ratio measurements of human red blood cells and hair samples by multiple collector ICP mass spectrometry. *Analytical Sciences*. **21**: 425-428.

Ortega, C., Gomez, M.R., Olsina, R.A., Silva, M.F. e Martinez, L.D. (2002). On-line cloud point preconcentration and determination of gadolinium in urine using flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **17**: 530-533.

Pacheco, P.H., Olsina, R.A., Smichowski, P. e Martinez, L.D. (2008). On-line preconcentration and speciation analysis of inorganic vanadium in urine using l-methionine immobilised on controlled pore glass. *Talanta*. **74**: 593-598.

Patriarca, M., Menditto, A., Di Felice, G., Petrucci, F., Caroli, S., Merli, M. e Valente, C. (1998). Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis, and treatment of diseases. *Microchemical Journal*. **59**: 194-202.

Plamboeck, C., Westtoft, H.C., Pedersen, S.A. e Andersen, J.E.T. (2003). Filterless preconcentration by co-precipitation by formation of crystalline precipitate in the analysis of barium by FIA-FAES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **18**: 49-53.

Prasad, A.S., Miale, A., Farid, Z., Schulert, A. e Sandstead, H.H. (1963). Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anaemia hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **61**: 537-547.

Rahil-Khazen, R., Henriksen, H., Bolann, B.J. e Ulvik, R.J. (2000). Validation of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) for multi-element analysis of trace elements in human serum. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **60**: 677-686.

Reis, B.F., Giné, M.F., Zagatto, E.A.G, Lima, J.L.F.C. e Lapa, R.A. (1994). Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta*. **293**: 129-138.

Ribeiro, A.S., Arruda, M.A.Z e Cadore, S. (2002). Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio: uma revisão crítica. *Química Nova*. **25**: 396-405.

Ribeiro, M.F.T, Santos, J.L.M. e Lima, J.L.F.C. (2007). Piezoelectric pumping in flow analysis: application to the spectrophotometric determination of gabapentin. *Analytica Chimica Acta*. **600**: 14-20.

Rudolph, E., Limbeck, A. e Hann, S. (2006). Novel matrix separation—on-line preconcentration procedure for accurate quantification of palladium in environmental samples by isotope dilution inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **21**: 1287-1293.

- Ruzicka, J. (1995). Flow injection-renewable surface techniques. *Analytica Chimica Acta*. **308**: 14-19.
- Ruzicka, J. (2000). Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst*. **125**: 1053-1060.
- Ruzicka, J. e Hansen, E.H. (1975). Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*. **78**: 145-157.
- Ruzicka, J. e Marshall, G.D. (1990). Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*. **237**: 329-343.
- Segundo, M.A. e Magalhães, L.M. (2006). Multisyringe flow injection analysis: state-of-the-art and perspectives. *Analytical Sciences*. **22**: 3-8.
- Skeggs, L.T. (1957). An automatic method for calorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. **28**: 311-322.
- Solich, P., Polásek, M., Klimundová, J. e Ruzicka, J. (2003). Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. **22**: 116-126.
- Taylor, A. (1996). Detection and monitoring for disorders of essential trace elements. *Annals of Clinical Biochemistry*. **33**: 486-510.
- Taylor, A. (2006). Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **21**: 381-383.
- Taylor, A., Branch, S., Day, M., Patriarca, M. e White, M. (2006). Atomic spectrometry update: clinical and biological materials, foods and beverages. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **21**: 439-491.
- Taylor, A., Branch, S., Day, M.P., Patriarca, M. e White, M. (2008). Atomic spectrometry update: clinical and biological materials, foods and beverages. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **23**: 595-646.
- Taylor, A. e Brown, A. A. (1983). Simple and rapid procedure for the determination of lead in whole blood by use of a slotted tube and discrete nebulisation flame atomic-absorption spectrometry. *Analyst*. **108**: 1159-1161.
- Taylor, A., King, L. J. e Marks, V. (1987). The effect of sodium aurothiomalate (Myochrysin) on the distribution of calcium, magnesium, copper, zinc and iron in the rat. *Toxicology*. **47**: 339-350.
- Taylor, H.E. (2001). Inductively coupled plasma-mass spectrometry. Practice and techniques. 1ª edição, Academic Press. San Diego.

thinXXS Microtechnology AG. Disponível em: <http://www.thinxxs.com/main/download.html> (acedido em 02 de Março de 2008).

Thomas, R. (2003). Mass analysers: quadrupole technology. In: Practical guide to ICP-MS. 1ª edição, Marcel Dekker Inc.. New York.

Todolí, J.L. e Mermet, J.M. (2006). Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B*. **61**: 239-283.

Trevizan, L.C. e Nóbrega, J.A. (2007). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **18**: 678-690.

Tyson, J.F. (1999). FIA techniques and strategies expand the potential of atomic spectrometry. In: A. Sanz-Medel (ed.), Flow analysis with atomic spectrometric detectors. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Van Staden, J.F. e Hattingh, C.J. (1995). Preconcentration of an analyte dialysate in a flow injection system. *Analytica Chimica Acta*. **308**: 214-221.

Vicente, O., Masi, A., Martinez, L., Olsina, R. e Marchevsky, E. (1998). On-line preconcentration system for lanthanum determination in urine using FI-ICP-AES. *Analytica Chimica Acta*. **366**: 201-207.

Wabner, C.L. e Sears, D.C. (1996). Determination of urinary Ca, Mg, and Li using flow injection with flame AAS. *Atomic Spectroscopy*. **17**: 119-121.

Wang, J. e Hansen, E.H. (2000). Coupling on-line preconcentration by ion-exchange with ETAAS: a novel flow injection approach based on the use of a renewable microcolumn as demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples. *Analytica Chimica Acta*. **424**: 223-232.

Wang, J. e Hansen, E.H. (2001). Interfacing sequential injection on-line preconcentration using a renewable micro-column incorporated in a 'lab-on-valve' system with direct injection nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **16**: 1349-1355.

Wang, J. e Hansen, E.H. (2003a). On-line sample-pre-treatment schemes for trace-level determinations of metals by coupling flow injection or sequential injection with ICP-MS. *Trends in Analytical Chemistry*. **22**: 836-846.

Wang, J. e Hansen, E.H. (2003b). Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. **22**: 225-231.

Willis, J.B. (1999). The early days of atomic absorption spectrometry in clinical chemistry. *Spectrochimica Acta Part B*. **54**: 1971-1975.

Wuilloud, R.J., Wuilloud, J.C., Olsina, R.A. e Martinez, L.D. (2001). Speciation and preconcentration of vanadium(V) and vanadium(IV) in water samples by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry and ultrasonic nebulization. *Analyst*. **126**: 715-719.

Xiang, Y., Chen, X., Li, G., Hu, Z., Zhao, Z. e Hooper, M. (2000). On-line microwave FIA technique and its application to determination of rhodium and sequential determination of palladium and rhodium. *Laboratory Robotics and Automation*. **12**: 91-96.

Xu, S., Sperling, M. e Welz, B. (1992). Flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium and copper in biological reference materials using on-line sorbent extraction preconcentration. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **344**: 535-540.

Yang, L. Hu, B., Jiang, Z. e Pan, H. (2004). On-line separation and preconcentration of trace metals in biological samples using a microcolumn loaded with PAN-modified nanometer-sized titanium dioxide and their determination by ICP-AES. *Microchimica Acta*. **144**: 227-231.

Zagatto, E.A.G., Reis, B.F., Oliveira, C.C., Sartini, R.P. Arruda, M.A.Z. (1999). Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. *Analytica Chimica Acta*. **400**: 249-256.

A decorative graphic consisting of several overlapping squares in shades of gray and black, positioned to the left of the chapter title.

Capítulo

2

Parte experimental

Aspectos gerais

2. Parte experimental: aspectos gerais

2.1. Introdução

A parte experimental dos trabalhos descritos nos Capítulos seguintes apresenta alguns aspectos em comum. Por isso, e de modo a eliminar descrições redundantes, os aspectos comuns mais relevantes são apresentados neste Capítulo. Os aspectos particulares de cada um dos trabalhos serão apresentados nos Capítulos correspondentes.

Para além dos aspectos comuns a todos os trabalhos, referir-se-ão ainda neste Capítulo outros aspectos que, embora comuns a apenas alguns dos trabalhos (por exemplo, digestão ácida em forno de microondas), justificam uma exposição mais detalhada, nomeadamente no que se refere à descrição do equipamento utilizado.

Assim, neste Capítulo serão focados os seguintes temas:

- Reagentes e soluções;
- Material de laboratório de uso corrente;
- Instrumentação;
- Componentes básicos dos sistemas de fluxo;
- Optimização do funcionamento dos sistemas de fluxo;
- Avaliação das metodologias analíticas desenvolvidas.

2.2. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados em espectrofotometria atómica (EA) eram geralmente de qualidade *GR for analysis* (designação Merck) ou equivalente. Os reagentes utilizados em ICP-MS eram de qualidade *Suprapur*[®] (Merck) ou equivalente. Em nenhum caso se recorreu a qualquer tratamento de purificação adicional.

A água utilizada na preparação de todas as soluções foi obtida por passagem directa da água da rede de abastecimento público através de resinas de leitos separados, uma coluna contendo uma resina catiónica e outra coluna contendo uma resina aniónica (etapa de desionização). De seguida, esta água desionizada passava também através de uma coluna com uma resina de troca iónica de leito misto, incorporada num sistema Milli-Q[®] da marca Millipore, produzindo-se assim a água ultrapura (resistividade igual a 18,2 MΩ cm, a 25 °C) que era posteriormente utilizada.

Nas determinações por EA, as soluções de elementos metálicos foram sempre preparadas por diluição de soluções comerciais da BDH (Spectrosol[®]) ou Merck (CertiPUR[®]), com uma concentração nominal de 1000 mg L⁻¹. Nos casos em que foram necessárias soluções padrão de concentração superior estas foram obtidas por dissolução em solvente apropriado de uma massa rigorosamente pesada de um sólido. Nas determinações por ICP-MS foram utilizadas soluções multi-elemento da AccuStandard, Inc. (AccuTrace[™]) para efectuar a calibração do equipamento (por exemplo, o ajuste da posição da tocha em relação ao cone de amostragem, o potencial aplicado às lentes iónicas e a calibração de massas) e avaliar o seu desempenho (sensibilidade e estabilidade a curto e a longo prazo, sempre que se justificava).

Nos sistemas de fluxo que envolvem uma etapa de pré-concentração das amostras em linha utilizou-se uma resina quelante produzida por imobilização de um ligando do tipo pentamina (a tetraetilenopentamina) num polímero orgânico (poliacrilamida reticulada) - a Metalfix[™] Chelamine[™] - comercializada pela Fluka sob a forma de partículas com 40 a 80 µm de diâmetro.

2.3. Material de laboratório de uso corrente

O material de laboratório utilizado era de polipropileno (Kartell) e era sempre lavado de acordo com o mesmo procedimento. Esse procedimento incluía várias etapas: i)

lavagem do material com uma corrente de água ultrapura; ii) imersão do material numa solução de ácido nítrico 10% (v/v), pelo menos durante 24 horas; iii) lavagem abundante com uma corrente de água ultrapura. Quando o material não era necessário de imediato, era mergulhado numa solução de ácido nítrico 1% (v/v), e assim mantido até à sua utilização.

As soluções de calibração eram obtidas por diluição rigorosa da solução padrão-mãe, utilizando-se para tal pipetas automáticas e balões volumétricos de volume adequado ao propósito em causa.

As pipetas automáticas utilizadas para a medição de pequenos volumes (até 5 mL) eram da marca Gilson®, modelos Pipetman® P20, P100, P200, P1000 e P5000, que permitiam a medição de um volume máximo de 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL e 5000 µL, respectivamente. A precisão e a exactidão dos volumes dispensados pelas pipetas automáticas eram regularmente verificadas através da medição de um determinado volume de água com a pipeta a testar e posterior pesagem desse mesmo volume em balança analítica.

A balança analítica utilizada nas diferentes pesagens era da marca Mettler-Toledo, modelo AG285 (sensibilidade = 0,00001 g).

Sempre que foi necessário determinar o pH das soluções utilizou-se um pH-metro da marca Crison, modelo GLP 22, equipado com potenciómetro e com um eléctrodo de pH, modelo 52-02, ambos da mesma marca. O eléctrodo de pH era constituído por um eléctrodo de membrana de vidro combinado com um eléctrodo de referência de AgCl/Ag recoberto com uma solução de electrólito Crisolyt A (KCl 3 mol L⁻¹ saturado com AgCl), também da marca Crison. A calibração do pH-metro foi efectuada com soluções tampão da marca Crison, com pH 4,01 (ref^a 94 60); pH 7,00 (ref^a 94 61) e pH 9,21 (ref^a 94 62).

2.4. Instrumentação

Neste ponto descrevem-se os equipamentos de grande porte que foram utilizados no decorrer do trabalho experimental que deu origem a esta dissertação. Serão abordados quer os equipamentos que funcionaram como detectores dos sistemas de fluxo desenvolvidos, quer outros equipamentos, como por exemplo o forno de microondas utilizado no pré-tratamento (digestão ácida) de amostras.

2.4.1. Espectrofotómetros de absorção atómica

Três dos trabalhos experimentais que se apresentam nesta dissertação (Capítulos 3 a 5) envolveram a utilização da técnica de espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama (EAA/Chama). Para tal, utilizou-se um espectrofotómetro com atomizador de chama da marca PerkinElmer®, modelo 5000 (câmara de nebulização com *flow spoiler*). No trabalho apresentado no Capítulo 4, em que se procedeu ao acoplamento de sistemas de fluxo incorporando micro-bombas solenóides a equipamento de EA, utilizou-se também um espectrofotómetro com atomizador de chama da marca Pye Unicam, modelo SP9 (câmara de nebulização com esfera de impacto).

Ambos os equipamentos eram diariamente optimizados de forma a se obter máxima sensibilidade com o mínimo de ruído instrumental. Isso era efectuado através do ajuste: i) da posição do queimador em relação ao feixe de luz emitido pela fonte de radiação, ii) da relação entre o caudal do comburente e o caudal do combustível e iii) do caudal de aspiração das soluções para análise.

A chama utilizada em ambos os equipamentos era de ar/acetileno.

Como fonte de radiação utilizaram-se sempre lâmpadas de cátodo oco da marca Cathodeon Ltd.

2.4.2. Fotómetros

No trabalho apresentado no Capítulo 4 (acoplamento de sistema de fluxo baseado em micro-bombas solenóides a equipamento de EA), utilizou-se ainda um fotómetro de chama da marca Buck Scientific, modelo PFP-7. A chama utilizada era de ar/butano. O equipamento era diariamente optimizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.4.3. Equipamento de ICP-MS

O equipamento de ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) utilizado era da marca VG Elemental, modelo PlasmaQuad® 3, e estava equipado com: i) um nebulizador pneumático concêntrico, de quartzo, da marca Meinhard®, tipo A; ii) uma câmara de nebulização de quartzo, com esfera de impacto; iii) uma tocha de quartzo; e iv) um cone de amostragem de iões e um cone selector, ambos de níquel, constituindo a chamada interface de amostragem. Quer a câmara de nebulização quer a interface de amostragem eram refrigeradas, por circulação de água. A unidade responsável pela refrigeração era da marca Applied Thermal Control, da série K, e permitia a refrigeração com água em circuito fechado, mantendo-a a uma temperatura de 10 ± 3 °C.

O plasma de árgon era da marca Alphagaz 2™, de 99,9999% de pureza, fornecido pela Air Liquide. O analisador de massas era do tipo quadrupolo e o detector do tipo dínodo multiplicador de electrões.

O equipamento de ICP-MS era optimizado diariamente para a máxima sensibilidade e estabilidade do sinal a curto prazo (do inglês, *short term stability*). Os testes de estabilidade a curto prazo foram efectuados de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante, i.e., o equipamento de ICP-MS era deixado estabilizar por 15 minutos e de seguida efectuava-se o teste, com uma duração nunca inferior a 10 minutos.

Tanto o controlo do equipamento de ICP-MS como a aquisição de dados eram efectuados utilizando o *software* PlasmaLab® (da ThermoElemental).

2.4.4. Forno de microondas

Para efectuar a digestão ácida (ou por via húmida) das amostras utilizou-se um forno de microondas da marca Milestone, modelo MLS-1200 mega, equipado com um rotor do tipo HPR-1000/10 S (designação do fabricante). A unidade em causa possuía um magnetrão capaz de gerar uma potência total de 1200 W, dos quais 1000 W eram direccionados para o interior do forno, e apresentava um rotor segmentado, num total de 10 vasos de digestão, sendo os vasos capazes de suportar uma pressão elevada (HPR - *High Pressure Rotor*). Os vasos eram de tetrafluormetaxilo® (TFM, Hoechst) e apresentavam uma capacidade máxima de 100 mL.

Para facilitar o desenvolvimento de novos métodos de digestão, a unidade dispunha da possibilidade de controlar a temperatura e a pressão interna de um dos vasos (limites: 250 °C e 55 bar, respectivamente) através de sondas apropriadas.

A lavagem dos vasos de digestão era efectuada de acordo com o recomendado pelo fabricante do forno de microondas (i.e., adicionava-se 5 mL de HNO₃ a cada um dos vasos e colocavam-se no forno a uma potência de 500 W durante 5 minutos; depois lavavam-se abundantemente com água ultrapura; no caso de não se utilizarem de imediato, eram mantidos hermeticamente fechados até à sua utilização).

2.5. Componentes básicos das montagens de fluxo

O desenvolvimento dos sistemas de fluxo apresentados nesta dissertação tinha por objectivo a automatização de determinados procedimentos típicos da rotina laboratorial analítica, como, por exemplo, a diluição ou a pré-concentração, numa área específica da Química Analítica - a Química Clínica. Para tal, recorreu-se a

sistemas de fluxo construídos com base em diferentes estratégias, nomeadamente a multicomutação, a multi-impulsão e a análise por injeção sequencial (SIA, do inglês, *Sequential Injection Analysis*), seleccionadas de acordo com os objectivos de cada um dos trabalhos e com as vantagens específicas de cada uma dessas estratégias de fluxo. Por isso, foram vários os dispositivos utilizados. De seguida, far-se-á uma breve descrição do funcionamento de cada um deles, bem como dos restantes componentes utilizados nos diversos sistemas de fluxo desenvolvidos.

2.5.1. Dispositivos responsáveis pela introdução, pelo transporte e pela definição do trajecto dos líquidos nos sistemas de fluxo

2.5.1.1 Bombas peristálticas

Nos sistemas de fluxo desenvolvidos para efectuar a determinação de rubídio por EA (Capítulo 3) e para estudar o acoplamento de sistemas de fluxo incorporando micro-bombas solenóides a equipamento de EA (Capítulo 4) foi utilizada uma bomba peristáltica da marca Gilson[®], modelo Minipuls[™] 2. O funcionamento deste dispositivo, no que respeita ao início e à paragem do movimento da cabeça rotativa, era controlado através do *software* desenvolvido propositadamente para o controlo de cada um dos sistemas de fluxo. Em ambos os trabalhos, a bomba peristáltica foi equipada com tubos de impulsão de Tygon[®] (cloreto de polivinilo, PVC), com um diâmetro interno de 1,65 mm, fabricados por Saint-Gobain Co.

O sistema de fluxo proposto para efectuar a determinação de PGEs (do inglês, *Platinum Group Elements*) na urina apresentava na sua configuração duas bombas peristálticas da marca Gilson[®], modelo Minipuls[™] 3, equipadas com tubos de impulsão de Tygon[®] de 0,76 mm de diâmetro interno (bomba peristáltica responsável pelo aporte constante de água ao nebulizador do equipamento de ICP-MS: BP_1) e de 2,06 mm de diâmetro interno (bomba peristáltica responsável pela gestão de fluidos no sistema de SIA propriamente dito: BP_2). O *software* desenvolvido para controlar

este sistema de fluxo permitia, para a BP_1, definir o início e a paragem do movimento da bomba peristáltica bem como o sentido de rotação da cabeça rotativa; para a BP_2, permitia ainda controlar a velocidade de rotação da cabeça rotativa.

Para a drenagem da câmara de nebulização do equipamento de ICP-MS utilizou-se uma bomba peristáltica da marca Gilson[®], modelo Minipuls[™] 3, e tubos de impulsão de Tygon[®] de 0,76 mm de diâmetro interno. O controlo da bomba peristáltica, quer em termos de início e paragem do seu funcionamento, quer em termos da velocidade de rotação da cabeça rotativa, era efectuado através do *software* PlasmaLab[®], que, como já se referiu, controlava o equipamento de ICP-MS.

A selecção do diâmetro interno dos tubos de impulsão de Tygon[®] utilizados foi feita de acordo com o caudal pretendido.

2.5.1.2 Bombas de pistão

Em virtude do objectivo do sistema de fluxo proposto para a determinação de rubídio ser a diluição de soluções muito concentradas naquele elemento e do volume de amostra disponível para efectuar a determinação ser reduzido, a estratégia seleccionada para executar aquela tarefa de diluição, pelas características que apresenta e que serão referidas no Capítulo 3, foi a amostragem de zonas. Nestas circunstâncias, é muito importante que o dispositivo responsável pelo transporte das soluções no sistema de fluxo opere de modo reprodutível, motivo pelo qual se utilizou uma bomba de pistão, muitas vezes também designada por bureta automática (marca Crison; modelo Micro BU 2031).

As seringas utilizadas nas bombas de pistão eram da marca Hamilton, e tinham uma capacidade máxima de 5 mL (modelo 1005) ou de 10 mL (modelo 1010).

As bombas de pistão eram activadas por um motor passo-a-passo que efectuava um total de 2500 passos e que era controlado externamente por computador. Como as bombas de pistão podem ser acopladas a seringas de capacidade variável, o volume

por passo varia de acordo com a capacidade da seringa utilizada (2 ou 4 μL para seringas de 5 ou 10 mL, respectivamente). O volume por passo associado ao número total de passos ou à frequência com que estes ocorrem estabelece, respectivamente, os volumes e os caudais dos líquidos propulsionados pelas bombas de pistão.

2.5.1.3 Micro-bombas solenóides

Nos sistemas de fluxo desenvolvidos para estudar o acoplamento de micro-bombas solenóides a equipamento de EA (Capítulo 4) e para a determinação de Cu na urina por EAA/Chama (Capítulo 5) utilizaram-se micro-bombas solenóides da marca Bio-Chem™ Valve Inc., modelos 090SP (volume interno de 8 μL) e 120SP (volume interno mínimo = 10 μL ; volume interno máximo = 60 μL), calibradas pelo fabricante para debitarem um volume fixo de 25 μL e 50 μL por cada pulso. Utilizaram-se ainda micro-bombas solenóides que debitavam um volume fixo por pulso de 3 μL e de 5 μL comercializadas igualmente pela Bio-Chem™ Valve Inc..

As micro-bombas solenóides são dispositivos de dimensões reduzidas e de forma cilíndrica, com baixo consumo energético (12 V) e que, numa descrição simples, são internamente constituídas por um diafragma, um solenóide e uma mola (Figura 2.1). O seu funcionamento baseia-se no deslocamento do diafragma por acção da mola, “activada” pelo solenóide. Na posição de repouso, o diafragma encontra-se fechado por acção da mola. Ao aplicar um potencial eléctrico ao solenóide produz-se um campo magnético que fornece energia à mola, a qual se “contraí” provocando a abertura do diafragma e originando a entrada de líquido na câmara da micro-bomba; ao cessar a aplicação do potencial eléctrico a mola perde energia e “distende-se”, forçando o diafragma a voltar à sua posição inicial, expelindo o líquido que se encontra na câmara da micro-bomba. Esta aplicação intermitente de potencial eléctrico ao solenóide é a responsável pela geração dos pulsos que caracterizam o funcionamento das micro-bombas solenóides. Segundo o fabricante, em cada pulso as

micro-bombas debitam um volume de líquido com uma precisão, em termos médios, de $\pm 2\%$. A frequência com que ocorre cada pulso pode ser ajustada até um máximo de 250 pulsos por minuto.

O volume total de líquido que é dispensado é calculado tendo em conta o volume debitado pela micro-bomba em cada pulso e o número total de pulsos. Por sua vez, o caudal é calculado tendo em conta o volume debitado pela micro-bomba em cada pulso e a frequência com que ocorrem os pulsos.

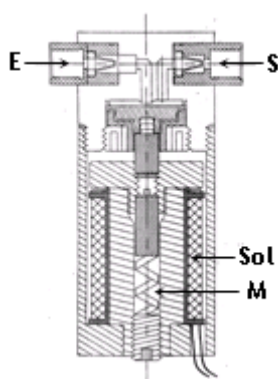


Figura 2.1

Esquema representativo de um corte longitudinal de uma micro-bomba solenóide. Legenda - Sol: solenóide; M: mola; E: entrada de líquido; S: saída de líquido.

2.5.1.4 Válvulas solenóides

Nos trabalhos que se apresentam nos Capítulos 3 a 6 utilizaram-se sempre válvulas solenóides de 3-vias (uma entrada e duas saídas ou uma saída e duas entradas) da marca NResearch[®] Inc., modelo 161T031. No sistema de fluxo utilizado para determinar sódio na urina por fotometria de chama (Capítulo 4) utilizou-se ainda uma válvula solenóide do tipo “*pinch*” (uma entrada e uma saída) da mesma marca, modelo 161P011 (posição normal: fechada).

As válvulas solenóides de 3-vias são dispositivos de forma cilíndrica e de pequenas dimensões (altura = 2,9 cm; diâmetro = 1,9 cm), com um baixo consumo de energia (12 V), e constituídas internamente por duas membranas de Teflon[®].

(politetrafluroetileno, da DuPont®) simetricamente colocadas, um solenóide e uma mola (Figura 2.2). Ao activar-se o núcleo do solenóide, a mola faz as membranas de Teflon® deslocarem-se num determinado sentido, estabelecendo um dos percursos; quando se deixa de aplicar o potencial eléctrico a mola recoloca as membranas na posição inicial estabelecendo o outro percurso. De acordo com o descrito pelo fabricante, as válvulas solenóides de 3-vias apresentam um volume interno reduzido (cerca de 27 μL) e um tempo de resposta curto (tempo de activação: 5 a 20 ms).

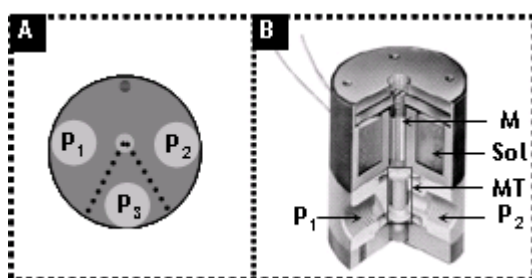


Figura 2.2

Representação esquemática de uma válvula solenóide de 3-vias vista de topo (A) com a indicação da zona do corte longitudinal (representado em B). Legenda - P_1 , P_2 e P_3 : portas de entrada/saída de líquidos; Sol: solenóide; M: mola; MT: membranas de Teflon® simetricamente colocadas.

As válvulas solenóides do tipo “*pinch*” são dispositivos de forma cilíndrica e de pequenas dimensões (altura = 2,9 cm; diâmetro = 1,9 cm), com um baixo consumo de energia (12 V), constituídas por um solenóide, uma mola, uma membrana de Teflon® e um tubo de silicone (Figura 2.3).

No caso das válvulas cuja posição normal é a fechada, a membrana de Teflon®, por acção da mola, comprime o tubo de silicone (impedindo a passagem de líquidos) até que se faça variar o potencial eléctrico aplicado ao solenóide; nesse caso, a membrana deixa de exercer pressão sobre o tubo de silicone permitindo a passagem de líquidos. De acordo com o descrito pelo fabricante, as válvulas solenóides do tipo “*pinch*” têm um tempo de resposta rápido (no máximo, 20 ms) e um volume interno reduzido (19,7 μL).

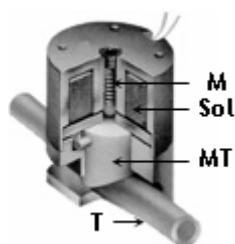


Figura 2.3

Corte longitudinal de uma válvula solenóide do tipo “pinch”. Legenda - Sol: solenóide; M: mola; MT: membrana de Teflon®; T: tubo de silicone.

2.5.1.5 Válvulas multi-posição selectoras de fluidos

No trabalho apresentado no Capítulo 6 (determinação de PGEs em amostras de urina) utilizou-se um equipamento da marca Crison, modelo VA 2 SN, que incorporava uma válvula multi-posição selectora de fluidos com 8 portas e uma válvula de injeção de 6 portas. Para a realização do referido trabalho apenas se utilizou a válvula multi-posição selectora de fluidos. No entanto, uma vez que na fase de concepção do sistema de fluxo apresentado se pensou vir a ser necessário proceder ao tamponamento das amostras, e se pretendia que esse fosse um passo executado em linha, era importante dispor de uma válvula multi-posição selectora de fluidos que fosse capaz de rodar nos dois sentidos, no intuito de diminuir o tempo necessário para analisar cada amostra; por esse motivo optou-se pelo equipamento acima descrito. Depois, embora se tenha verificado não ser necessário efectuar o tamponamento das amostras, prosseguiu-se o trabalho com aquele equipamento.

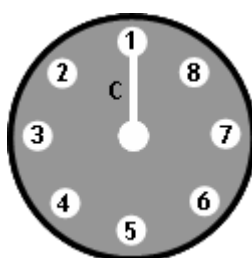


Figura 2.4

Representação esquemática da cabeça da válvula multi-posição selectora de fluidos. Legenda - 1 a 8: portas periféricas; C: canal interno móvel.

A válvula multi-posição selectora de fluidos era do tipo rotativo, i.e, era constituída por um rotor bidireccional na superfície do qual estava talhado um canal que estabelecia sequencialmente o contacto entre o orifício central e as portas periféricas (Figura 2.4).

2.5.2. Tubagem e outros componentes dos sistemas de fluxo

Os diferentes dispositivos utilizados nos sistemas de fluxo desenvolvidos eram ligados entre si por tubos de Teflon®, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm. Esta tubagem, doravante, nesta dissertação, designada de “reactores” para simplificar a linguagem, embora no seu interior na maioria das vezes não ocorresse qualquer reacção, apresentava uma geometria linear em praticamente todos os sistemas de fluxo desenvolvidos.

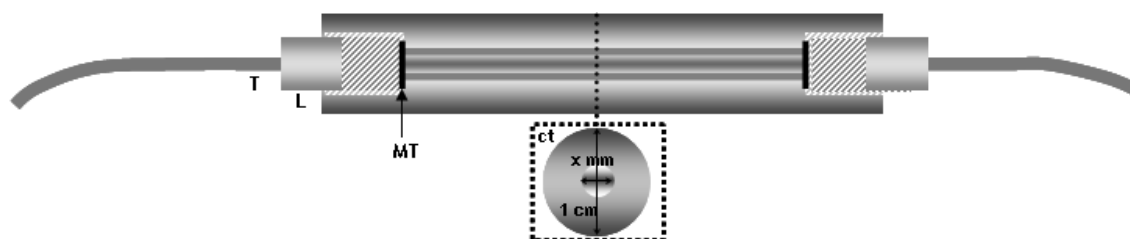


Figura 2.5

Representação esquemática de uma coluna de pré-concentração. Legenda: - T: tubo de Teflon®; L: ligador roscado; MT: membrana de Teflon®; ct: representação esquemática do corte transversal de uma coluna de pré-concentração; x mm: diâmetro interno; 1 cm: diâmetro da coluna).

As colunas de pré-concentração utilizadas eram de construção laboratorial (Almeida *et al.*, 2000), fabricadas em Perspex® (Lucite®) e estavam disponíveis com diferentes comprimentos e diâmetros internos. Em cada uma das extremidades das colunas era colocado um filtro de Teflon®, da marca MoBiTec, com poros de 35 µm de diâmetro. Ambas as extremidades da coluna possuíam um rosqueamento que permitia a ligação ao sistema de fluxo através de um ligador roscado convencional (Figura 2.5).

As confluências utilizadas eram também de construção laboratorial e fabricadas em Perspex® (Alegret *et al.*, 1987). Estavam disponíveis com configurações diversas, i.e., configurações que permitiam que os líquidos confluíssem em diferentes ângulos, e que, de aqui em diante, passarão a ser referidas de acordo com a codificação apresentada na Figura 2.6.



Figura 2.6

Representação esquemática dos ângulos de confluência de líquidos utilizados. Confluência em... A: “duplo-T”; B: “duplo-Y”; C: “Y”; D: “V”; E: “T”.

Nos trabalhos descritos nos Capítulos 3, 4 e 5 a aquisição do sinal analítico foi assegurada por um registador da marca Metrohm AG, modelo E 586 Labograph. No trabalho descrito no Capítulo 6 a aquisição foi efectuada por meio do programa de controlo do próprio equipamento de detecção (*software* PlasmaLab® do equipamento de ICP-MS).

2.6. Optimização do funcionamento dos sistemas de fluxo

O funcionamento dos sistemas de fluxo desenvolvidos foi optimizado tendo em consideração vários parâmetros de desempenho, com destaque para a precisão, sensibilidade/limite de detecção e rendimento analítico.

Todos os estudos realizados com vista à optimização do funcionamento dos sistemas de fluxo apresentados foram efectuados de acordo com o método univariado (variação de um único factor de cada vez). Este é um método de optimização clássico, em que se fixam num determinado nível todos os factores que estão a ser avaliados, excepto um deles. Este é então feito variar até que se encontre a melhor

resposta, passando esta condição a ser fixada e um novo factor a sofrer variação. O processo repete-se até que todos os factores tenham sido adequados para fornecerem a melhor resposta.

2.7. Avaliação das metodologias analíticas desenvolvidas

2.7.1. Métodos estatísticos de avaliação

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas tem tipicamente como objectivos subjacentes: i) permitir a determinação de uma nova espécie (analito) ou melhorar as características (exactidão, precisão, limite de detecção, etc.) de metodologias pré-existent; e ii) permitir ou aumentar o grau de automatização e reduzir os custos laboratoriais (nomeadamente em termos de consumo de reagentes e envolvimento de pessoal). O processo de desenvolvimento de novas metodologias analíticas inclui obrigatoriamente a verificação experimental do seu desempenho (precisão, exactidão, limite de detecção, etc.). Uma vez que se trata de um aspecto comum aos vários trabalhos efectuados, descrevem-se aqui os conceitos e os métodos de análise estatística adoptados (Miller e Miller, 2000).

A precisão de uma dada metodologia analítica é avaliada através do cálculo do desvio padrão dos resultados obtidos de modo independente quando se aplica “n” vezes essa mesma metodologia. É afectada pelos erros aleatórios, e podem ser avaliados dois componentes da precisão: a repetibilidade e a reprodutibilidade. A repetibilidade é obtida por comparação de resultados independentes obtidos com a aplicação da mesma metodologia à mesma amostra nas mesmas condições (i.e., mantendo-se o operador, o equipamento, o laboratório), e em intervalos de tempo curtos. A reprodutibilidade é obtida por comparação de resultados independentes obtidos com a aplicação da mesma metodologia à mesma amostra, mas em condições diferentes

(i.e., modificando-se o operador, o equipamento, o laboratório e/ou após diferentes intervalos de tempo, sendo estes mais longos). Nos trabalhos apresentados nos Capítulos seguintes a precisão (repetibilidade e/ou reprodutibilidade) foi sempre avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV), calculado do seguinte modo: $CV = (\sigma/\mu) * 100$, em que σ representa o desvio padrão e μ a média aritmética do conjunto de resultados obtidos.

A exactidão é afectada quer pelos erros aleatórios quer pelos erros sistemáticos e mede a concordância entre o resultado obtido e o valor verdadeiro. Com excepção do trabalho apresentado no Capítulo 6, a avaliação da exactidão das metodologias analíticas desenvolvidas foi sempre feita através da comparação dos resultados obtidos na análise de um conjunto de amostras utilizando a metodologia desenvolvida e uma outra metodologia alternativa, considerada adequadamente exacta e precisa, designada de metodologia de referência ou de metodologia de comparação. Os dois conjuntos de resultados eram depois comparados utilizando o teste t de Student emparelhado bicaudal e a análise por regressão linear.

O teste t de Student emparelhado é feito com base na expressão $t = \bar{d} * \sqrt{N} / \sigma$, em que $\bar{d}$ é a média aritmética da diferença entre cada par de valores (o valor obtido para uma determinada amostra usando a metodologia desenvolvida e o obtido usando a metodologia de referência), σ o desvio padrão dessas diferenças e N é o número de pares de resultados. O valor obtido da equação anterior deve ser comparado com um valor teórico, o chamado t crítico, que depende do número de graus de liberdade e do nível de confiança pretendido. No caso dos trabalhos apresentados nos Capítulos seguintes foi sempre utilizado um nível de confiança de 95%. Quando o valor calculado não excede o valor de t crítico, aceita-se a hipótese nula, i.e., considera-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois pares de valores. Este teste, utilizado para comparar médias, permite detectar o erro sistemático. No entanto, é também importante ter em consideração o erro

aleatório e logo, comparar também os desvios padrão. De facto, como se depreende da equação anterior, pode obter-se um baixo valor de t mesmo existindo uma grande diferença entre as médias ($\bar{d}$) se, simultaneamente, o desvio padrão das diferenças entre os pares de resultados (σ) também for elevado. Assim, o teste t de Student só é válido no caso de se verificar previamente que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os desvios padrão (σ) dos dois conjuntos de resultados, o que pode ser feito recorrendo ao teste de F . O teste de F é feito com base na expressão $F = \sigma_{d1}^2 / \sigma_{d2}^2$, em que σ_{d1}^2 e σ_{d2}^2 são as variâncias, i.e., o quadrado dos desvios padrão de cada conjunto de resultados, colocadas na fórmula de modo a que o valor de F seja sempre superior ou igual a 1. O valor de F é calculado e depois comparado com um valor teórico, o F crítico, que depende do número de graus de liberdade e do nível de confiança pretendido (no caso dos trabalhos apresentados, sempre um nível de confiança de 95%). Quando o valor de F calculado não excede o valor crítico, aceita-se a hipótese nula, i.e., considera-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre as duas variâncias.

No cálculo da expressão de regressão linear $y = a * x + b$, y correspondia aos valores obtidos utilizando a nova metodologia analítica, x aos valores obtidos com a metodologia de comparação, a ao declive da recta e b à sua ordenada na origem. Neste tipo de análise, a perfeita concordância entre os dois conjuntos de valores é indicada por um valor de $b = 0$ (ausência de erro sistemático constante) e um valor de $a = 1$ (ausência de erro sistemático proporcional). O coeficiente de correlação de *Pearson* (r) é o parâmetro estatístico que mede a distribuição dos valores em torno da recta de regressão linear estimada e idealmente deve ter um valor igual a 1. No sentido de se testar a hipótese nula e verificar a concordância dos resultados obtidos pelas duas metodologias foram calculados os limites de confiança da ordenada na origem e do declive, para um nível de confiança de 95%.

No trabalho descrito no Capítulo 6 (determinação de PGE em amostras de urina),

perante a impossibilidade de analisar as amostras por uma metodologia de comparação, a avaliação da exactidão foi efectuada através da realização de ensaios de recuperação. Para o efeito, as amostras foram analisadas antes e após a adição de uma quantidade conhecida das espécies em análise, tendo esta adição sido feita em dois níveis de concentração diferentes. O índice de recuperação (R) foi calculado com base na expressão $R = (C_f - C_o) / C_a * 100$, em que C_f é a concentração final, C_o é a concentração original e C_a a concentração resultante da adição de analito efectuada.

Outro parâmetro caracterizador das metodologias analíticas apresentado ao longo desta dissertação é o limite de detecção. O limite de detecção (LD), expresso em concentração, é derivado do sinal mais baixo que pode se detectar com razoável certeza, com uma dada metodologia analítica. De acordo com a IUPAC (*Compendium of Chemical Terminology, Electronic version*), o valor do LD é dado por $LD = k * \sigma_b / S$, onde k é um factor numérico escolhido de acordo com o nível de confiança pretendido, σ_b é o desvio padrão de sucessivas leituras do branco e S a sensibilidade (tomada como o declive da curva de calibração). O limite de detecção foi calculado a partir de 10 leituras consecutivas do branco e considerando $k = 3$ (que corresponde a um nível de confiança de cerca de 90%).

2.8. Outras avaliações e informações relevantes

Nalgumas das metodologias analíticas desenvolvidas (Capítulos 4 e 5), a exactidão foi também comprovada através da análise de amostras de referência certificadas, por comparação do valor de concentração obtido com o valor certificado. Foram utilizadas amostras de referência certificadas de soro: *Seronorm™ Trace Elements Serum, level 1, lote MI0181* e *Seronorm™ Trace Elements Serum, level 2, lote NO0371*; urina: *Seronorm™ Trace Elements Urine, lote NO2525*, em ambos os casos

fornecidas pela Sero As; e de cabelo: *IAEA-086, Btl No. 81*, fornecida pela IAEA (*International Atomic Energy Agency*).

O rendimento analítico, expresso em número de determinações por hora, foi calculado tendo em conta o tempo necessário para a realização de um ciclo analítico completo.

As curvas de calibração eram obtidas através da determinação do sinal analítico de soluções de concentração crescente na espécie a determinar e do traçado da recta de regressão linear (modelo matemático que representa a regressão linear entre as duas variáveis: magnitude do sinal analítico vs. concentração), cujos coeficientes eram obtidos pelo método dos mínimos quadrados. O intervalo de concentrações com resposta linear era estabelecido tendo em consideração o valor do coeficiente de correlação de *Pearson* (r) obtido para cada caso. Com excepção para o trabalho apresentado no Capítulo 6, o valor da concentração das espécies nas amostras em análise era obtido através da interpolação do valor médio do sinal analítico (altura do pico; tomado como a média aritmética dos valores resultantes da análise repetida da mesma amostra) na curva de calibração correspondente. Por sua vez, no trabalho apresentado no Capítulo 6, a concentração das espécies era obtida através da interpolação do valor da área do pico na curva de calibração correspondente.

Como unidade central de aquisição e processamento de dados e de controlo dos dispositivos dos diversos sistemas de fluxo desenvolvidos foi utilizado um computador equipado com um microprocessador Pentium III. A comunicação entre o computador e os diversos componentes de cada sistema de fluxo (válvulas solenóides, micro-bombas, bombas de pistão, bombas peristálticas) era efectuada através do envio de sinais TTL derivados da utilização de uma interface activa da marca Advantech[®], modelo PC-LABCard[™] PCL-711B. No caso das válvulas solenóides e das micro-bombas, recorreu-se também a um circuito de potência baseado num circuito CoolDrive[™], fornecido pela NResearch[®] Inc., ou a um circuito integrado ULN2003, de construção própria (Lapa *et al.*, 1997). As bombas de pistão eram controladas por comunicação

através da porta de série RS-232C. A bomba peristáltica era controlada por duas saídas digitais com o mesmo potencial eléctrico, que definiam o início e a paragem do seu funcionamento, bem assim como o sentido de rotação da cabeça rotativa. A velocidade de rotação da bomba peristáltica era controlada por uma saída analógica, de modo a que os sinais enviados pelo computador variassem entre 0 e 5 V, correspondendo, respectivamente, à velocidade mínima e à velocidade máxima de rotação.

O controlo da posição da válvula multi-posição selectora de fluidos era efectuado por desactivação, em combinações predefinidas, de 6 saídas digitais de 5 V.

O *software* que permitia o controlo dos dispositivos dos diversos sistemas de fluxo e a aquisição e o tratamento dos dados foi desenvolvido recorrendo a instruções em linguagem BASIC, utilizando para tal o programa Microsoft QuickBASIC® 4.5 implementado em ambiente DOS.

2.9. Referências bibliográficas

Alegret, S., Alonso, J., Bartrolí, J., Machado, A.A.S.C., Lima, J.L.F.C. e Paulis, J.M. (1987). Construction of equipment for potentiometric determinations in flow injection analysis. *Quimica Analitica*. **6**: 278-292.

Almeida, A.A., Jun, X. e Lima, J.L.F.C. (2000). Flame AAS determination of copper in urine using a flow injection on-line preconcentration system based on a polyamine chelating ion exchange resin. *Atomic Spectroscopy*. **21**: 187-193.

Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F., Reis, B.F., Santos, J.L.M. e Zagatto, E.A.G. (1997). Photochemical-fluorimetric determination of folic acid in a multicommutated flow system. *Analytica Chimica Acta*. **351**: 223-228.

Nic, M., Jirat, J. e Kosata, B. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version. Acedido em 17 de Agosto de 2007, em: <http://goldbook.iupac.org/L03540.html>.

Miller, J.N. e Miller, J.C. (2000). *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. 4ª edição. Prentice Hall. Great Britain.

A decorative graphic consisting of several overlapping squares in shades of gray and black, positioned to the left of the chapter title.

Capítulo

3

Determinação de Rb por espectrofotometria atômica

3. Determinação de Rb por espectrofotometria atômica

3.1. Introdução

Os progressos que se têm verificado nas áreas da Química, da Biologia Celular e da Biologia Molecular, têm aberto à indústria farmacêutica novos caminhos para o desenvolvimento de moléculas farmacologicamente activas (fármacos), com alvos e mecanismos de acção diferentes.

O desenvolvimento de novos fármacos tem custos muito elevados, nem sempre existindo uma relação directa entre o investimento efectuado e o número de novas moléculas que chegam ao mercado, uma vez que muitas acabam por mostrar não possuírem todas as características (farmacocinéticas, de eficácia e segurança, etc.) necessárias para o efeito. Os custos da investigação justificam a necessidade de se proceder a uma rápida avaliação prévia das moléculas em estudo. Por esse motivo, têm surgido novas abordagens para atempadamente se avaliarem as características de potenciais novos fármacos.

Um estudo efectuado por Ford *et al.* mostra que os fármacos conhecidos na altura actuavam sobre cerca de 500 “alvos” (“receptores”) distintos, dos quais 5% eram canais iónicos (Ford *et al.*, 2002). Em 2005, já 7% de todos os fármacos comercializados tinham como alvo canais iónicos. O crescente recurso a este importante grupo de alvos celulares deve-se essencialmente aos desenvolvimentos da Química Farmacêutica e Medicinal e aos avanços na automatização laboratorial, o que tem permitido empregar novas estratégias no desenvolvimento e na avaliação de novos fármacos e, ao mesmo tempo, aumentar o rendimento no *screening* de fármacos potencialmente úteis (Ford *et al.*, 2002; Terstappen, 2005).

A percentagem de fármacos que actuam em canais iónicos continua a ser baixa; contudo, tendo em conta os grupos terapêuticos a que esses fármacos genericamente

pertencem, essa pequena percentagem acaba por representar uma fracção significativa do volume de negócio gerado pelo total de medicamentos comercializados (Thermoelemental, 2002). De facto, os canais iónicos são alvos para fármacos pertencentes a grupos terapêuticos que têm manifestamente um impacto muito grande nos gastos com a saúde, tais como, medicamentos com acção a nível do aparelho cardiovascular e sistema nervoso e medicamentos usados no tratamento de doenças endócrinas (Thermoelemental, 2002).

Os canais iónicos são proteínas transmembranares que permitem a troca de iões, como, por exemplo, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , entre os meios intra e extracelular, mantendo a vitalidade celular e contribuindo para a manutenção da homeostasia do organismo (Kazic *et al.*, 1999). Anomalias nos canais iónicos parecem estar implicadas na patogénese de um considerável e variado número de doenças, como, por exemplo, a fibrose quística, a diabetes *mellitus*, a doença de *Alzheimer*, a disfunção eréctil ou o cancro (Falconer *et al.*, 2002; Kazic *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1998).

Os canais iónicos são geralmente classificados de acordo com a selectividade preferencial que apresentam para determinado ião, isto é, de acordo com o ião que preferencialmente “transportam” (por exemplo, canais de sódio, canais de potássio, etc.), e de acordo com o modo como são activados (podendo, basicamente, ser activados por acção de um ligando ou através de uma alteração no potencial da membrana) (Kazic *et al.*, 1999; Terstappen, 1999).

Nos últimos anos a investigação farmacêutica na área dos canais iónicos tem incidido particularmente sobre a modulação dos canais de potássio. Os moduladores dos canais de potássio têm sido utilizados principalmente como vasodilatadores e anti-hipertensores. Contudo, a rápida evolução nesta área de investigação promete o desenvolvimento de novos fármacos para outras doenças, para além das doenças cardiovasculares (Kazic *et al.*, 1999). Os canais de potássio representam o maior e o mais diversificado grupo de canais iónicos. Dividem-se em dois sub-grupos distintos:

canais activados através de uma alteração no potencial da membrana e canais activados por acção de um ligando, e são permeáveis também a outros catiões monovalentes, tais como Rb^+ e Tl^+ (Kazic *et al.*, 1999; Terstappen, 1999). Embora o papel desempenhado por estes canais ainda esteja longe de ser totalmente conhecido, alguns deles estão já amplamente estudados e sabe-se que têm uma função importante na manutenção do potencial de repouso e na repolarização da membrana das células no músculo cardíaco, no músculo liso e nas glândulas endócrinas (células β do pâncreas) (Kazic *et al.*, 1999). O interesse nesta questão tem-se reflectido num grande número de publicações (Falconer *et al.*, 2002; Jilkina *et al.*, 2003; Kazic *et al.*, 1999; Kemmel *et al.*, 2003; Marks *et al.*, 1999; Numann e Negulescu, 2001; Parihar *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1998; Terstappen, 1999; Wilson *et al.*, 2004).

As técnicas utilizadas na avaliação do efeito de potenciais novos fármacos sobre os canais iónicos têm de ser capazes de dar uma resposta rápida. Esta exigência é imposta não só pelos aspectos de natureza económica já referidos, mas também pela própria instabilidade dos sistemas biológicos (culturas celulares) utilizados nestes estudos (Marks *et al.*, 1999). São diversas as técnicas disponíveis para avaliar a acção dos fármacos nos canais iónicos: i) técnicas electrofisiológicas (Wilson *et al.*, 2004) - medem diferenças de potencial - que são precisas mas lentas; ii) fluorimetria directa ou indirecta (Falconer *et al.*, 2002) - recorrem a compostos fluorescentes - que são lentas, muito sujeitas a interferências e têm intervalos de resposta muito estreitos; iii) técnicas radioactivas (Kemmel *et al.*, 2003; Marks *et al.*, 1999; Parihar *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1998) - medem o efluxo de um radioisótopo de rubídio (^{86}Rb) utilizado como marcador - que são caras e pouco seguras e iv) técnicas que também se baseiam na medida do efluxo de isótopos, mas recorrendo a isótopos não radioactivos (Scott *et al.*, 2003; Terstappen, 1999). Nestas últimas, procede-se à determinação do efluxo de um isótopo não radioactivo de Rb^+ recorrendo a técnicas de espectrofotometria atômica. Ambas as técnicas baseadas no efluxo de Rb^+

(radioactivo ou não-radioactivo) assentam no facto deste elemento não existir naturalmente nas células e de ser capaz de substituir o potássio nos processos biológicos em que este último intervém, estando já provado que o efluxo de Rb^+ é um indicador fiável da actividade dos canais de potássio e de canais não selectivos (Scott *et al.*, 2003; Terstappen, 2004).

As técnicas que se baseiam na medida do efluxo de isótopos não radioactivos de Rb^+ aparecem como resposta às desvantagens evidenciadas pelas técnicas anteriormente disponíveis, possibilitando a análise funcional de uma vasta gama de canais iónicos de forma mais simples e segura. O procedimento descrito para o estudo dos canais iónicos consiste em: i) incubação das células numa solução tampão contendo RbCl (RbCl 5,4 mmol L^{-1} ; NaCl 150 mmol L^{-1} ; CaCl_2 2 mmol L^{-1} ; NaH_2PO_4 0,8 mmol L^{-1} ; MgCl_2 1 mmol L^{-1} ; glucose 5 mmol L^{-1} e Hepes 25 mmol L^{-1} , pH = 7,4), por um período de 4 horas a uma temperatura de 37°C, dando-se a entrada de Rb^+ nas células; ii) rápida lavagem das células com uma solução tampão de composição semelhante à primeira, mas em que há substituição do RbCl por KCl (5,4 mmol L^{-1} de KCl), para remover o Rb^+ extracelular; iii) activação dos canais iónicos (nos canais iónicos activados por uma alteração no potencial de membrana: adição de uma solução contendo 50 mmol L^{-1} de KCl , que tem uma acção despolarizante; nos canais iónicos activados por acção de um ligando: adição do ligando apropriado); iv) novo período de incubação das células, por 10 minutos, no mesmo meio que permite a activação dos canais iónicos (i.e., num meio com 50 mmol L^{-1} de KCl ou com o ligando apropriado); v) separação do líquido extracelular (“sobrenadante”) e vi) adição de uma solução de Triton X-100 1% às células, para as lisar. O fármaco em estudo é geralmente adicionado na fase final do primeiro período de incubação. Assim, é durante o primeiro período de incubação que se dá a entrada de Rb^+ e do fármaco em estudo na célula cujos canais iónicos vão posteriormente ser activados. Diz-se que o fármaco exerce um efeito inibidor sobre o transporte de iões quando a concentração de Rb^+ no lisado celular é mais elevada que no líquido extracelular. Pelo contrário, diz-se que o fármaco

exerce um efeito activador sobre o transporte de iões quando a concentração de Rb^+ é superior no líquido extracelular.

Na determinação de Rb^+ por EAA/chama, como este elemento apresenta baixa energia de ionização e a sua concentração nas soluções em estudo excede largamente o limite superior do intervalo de resposta instrumental linear, há necessidade de se efectuar uma diluição e de se adicionar um “tampão de ionização”. No procedimento descrito por Terstappen, esta diluição era efectuada manualmente com uma solução de CsCl 0,1% (m/v) preparada em HNO_3 1% (v/v) (tampão de ionização) (Terstappen, 1999). Esta diluição manual acaba por constituir a etapa mais crítica do procedimento, na medida em que é passível de introduzir erros e prejudica o rendimento analítico. Empresas fabricantes de equipamento analítico procuraram responder a esta necessidade da indústria farmacêutica propondo um sistema robotizado concebido exclusivamente para as determinações de Rb^+ , composto por um auto-amostrador e vários espectrofotómetros de absorção atómica, tudo controlado por meio de computadores (ThermoElemental, 2002). Apesar de possibilitar uma avaliação rápida dos fármacos em estudo, esta proposta apresenta um custo elevado, rigidez de utilização (podendo considerar-se como sendo um sistema praticamente dedicado) e o intervalo de resposta linear é estabelecido mediante ajuste da posição do queimador. O facto do grau de rotação do queimador ter de ser ajustado de acordo com a concentração das soluções conduz à necessidade de se efectuarem diferentes calibrações do equipamento para cada uma das posições do queimador (Frary, 1998).

Neste Capítulo descreve-se um sistema de fluxo simples e económico, que permite efectuar a diluição das soluções em análise ajustando automaticamente o factor de diluição à concentração de Rb^+ a determinar, sem necessidade de se proceder a uma reconfiguração física do mesmo. Estas características estão directamente associadas quer à versatilidade da estratégia de diluição seleccionada (“amostragem de zonas”,

do inglês *zone sampling*), quer às características do tipo de sistema de fluxo utilizado (“fluxo multicomutado”).

As estratégias a que se pode recorrer para efectuar diluições em linha são diversas (Tyson, 1991), passando, entre outras, pela utilização de: i) câmaras de diluição (Stewart e Rosenfeld, 1982); ii) unidades de diálise (Lima *et al.*, 1991); iii) confluência da amostra com um transportador/diluyente que flui a um caudal superior - *merging zones* (Zagatto *et al.*, 1987a); vi) dispersão de um volume muito pequeno de amostra, na ordem dos microlitros, num transportador (Fang *et al.*, 1993; García *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 2003). Nos casos em que se pretende um factor de diluição superior, pode ainda recorrer-se a uma combinação de várias estratégias (Whitman e Christian, 1989). A estratégia de diluição utilizada - diluição por amostragem de zonas (Reis *et al.*, 1981) - cujo princípio de funcionamento se encontra ilustrado na Figura 3.1, assenta no corte da parte frontal do segmento de amostra dispersa no transportador antes da sua chegada ao detector (i.e., faz-se a amostragem temporizada - reamostragem - da porção mais terminal e mais dispersa do segmento de amostra, rejeitando-se o restante). Esta estratégia é mais eficiente e permite obter resultados mais reprodutíveis do que, por exemplo, a diluição por inserção de um microvolume de amostra ou a diluição por utilização de “reactores” mais compridos (aumento da dispersão da amostra) (Reis *et al.*, 1981); é ainda dotada de grande versatilidade, facilidade de automatização e controlo por parte do analista, mostrando-se muito útil na implementação de sistemas de diluição automática. Recorrendo a esta estratégia consegue-se obter um intervalo alargado de factores de diluição apenas com base na amostragem temporizada sem ter de se recorrer a uma reconfiguração física do sistema de fluxo.

Os sistemas de fluxo com multicomutação são baseados na utilização de válvulas solenóides e tiram partido da facilidade com que estes dispositivos injectores/monocomutadores, apenas através de controlo electrónico, permitem o redireccionamento do fluxo (Rocha *et al.*, 2002). O recurso a este tipo de sistemas de

fluxo para se implementar a estratégia de diluição por amostragem de zonas apresenta reconhecidas vantagens quando se pretende efectuar diluições em linha (Araújo *et al.*, 1995), pois resulta em sistemas muito simples, versáteis, de elevada precisão analítica e facilidade de automatização a custos reduzidos, e que permitem alargar o intervalo de resposta instrumental linear apenas através da modificação do segmento de amostra que é enviado para o detector.

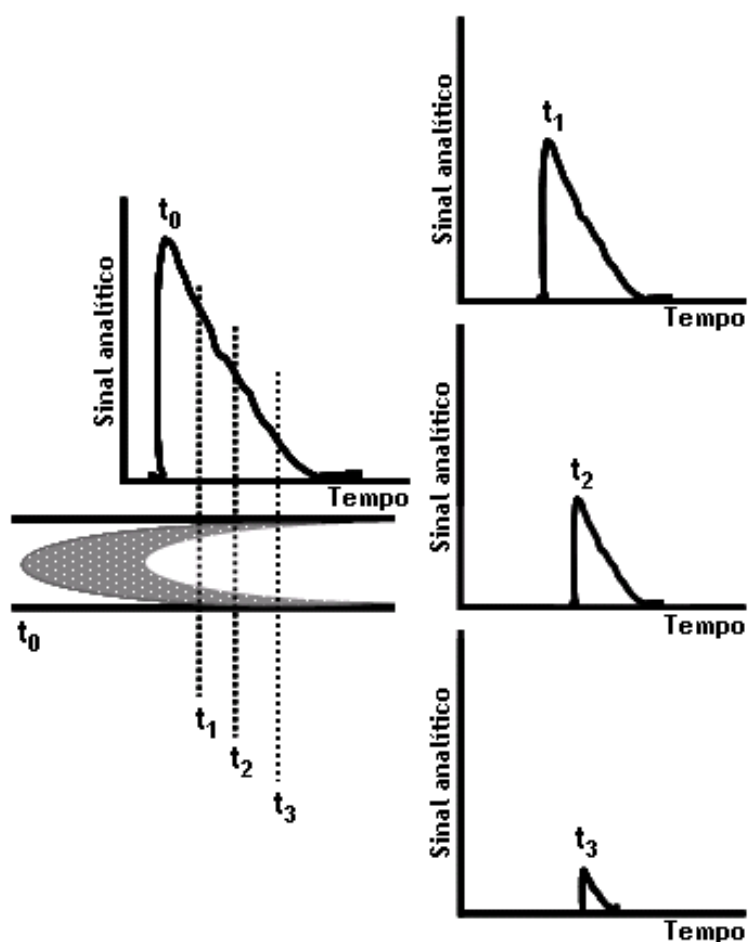


Figura 3.1

Ilustração do modo de funcionamento da estratégia de diluição por amostragem de zonas, com indicação do corte do segmento de amostra após três intervalos de tempo distintos e a correspondente repercussão no sinal analítico obtido (t: tempo).

O sistema de fluxo desenvolvido foi acoplado a um espectrofotômetro de absorção atômica, e o seu funcionamento foi testado utilizando o equipamento tanto no modo de emissão (EEA/chama) e como no modo de absorção (EAA/chama).

3.2. Parte experimental

3.2.1. Instrumentação

Para a determinação de Rb por espectrofotometria atômica utilizou-se um espectrofotômetro com atomização em chama, da marca PerkinElmer®, modelo 5000, ligado a um registrador da marca Metrohm AG, modelo E 586 Labograph. A chama era de ar-acetileno. Como fonte de radiação nas determinações por EAA/chama utilizou-se uma lâmpada de cátodo oco da marca Cathodeon Ltd.

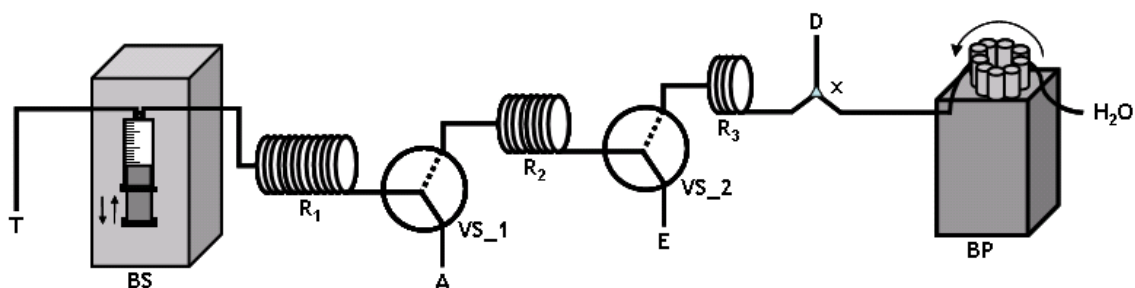


Figura 3.2

Representação esquemática do sistema de fluxo multicomutado. Legenda - T: transportador/tampão de ionização; BS: bomba de pistão; R₁ - R₃: reactores; A: amostra; VS_1 - VS_2: válvulas solenóides de 3-vias (linha contínua: solenóide activado - posição 1; linha tracejada: solenóide desactivado - posição 0); E: esgoto; BP: bomba peristáltica; H₂O: água ultrapura; X: confluência em “V”; D: detector.

O sistema de fluxo desenvolvido (Figura 3.2) era constituído por uma bomba de pistão da marca Crison, modelo Micro BU 2031, equipada com uma seringa de 5 mL de capacidade, da marca Hamilton; 2 válvulas solenóides de 3-vias NResearch® Inc., modelo 161T031; 1 bomba peristáltica da marca Gilson®, modelo Minipuls™ 2,

equipada com um tubo de impulsão, da mesma marca, com um diâmetro interno de 1,65 mm; tubos de Teflon®, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm; ligadores e 1 confluência em “V”, de construção laboratorial. O controlo do sistema, bem como a aquisição e processamento de dados, foi efectuado por intermédio de um computador pessoal.

3.2.2. Material e Reagentes

Na preparação de todas as soluções utilizou-se sempre água ultrapura.

Com excepção do HNO₃, que era de qualidade *Suprapur*® (designação Merck), todos os reagentes eram de qualidade *GR for analysis* (designação Merck) ou equivalente.

As soluções de calibração foram preparadas por diluição adequada de uma solução padrão comercial de Rb (Sigma; concentração 1000 mg L⁻¹) com uma solução de HNO₃ 0,2% (v/v).

O tampão de ionização utilizado — CsCl 0,1% (m/v) — foi preparado por dissolução adequada de CsCl (Sigma) numa solução de HNO₃ 1% (v/v).

Para a preparação de todas as soluções de HNO₃ utilizadas partiu-se de uma solução de HNO₃ 65% (m/m), comercializada pela Merck.

Para fazer a simulação da matriz da amostra preparou-se uma solução contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl (Merck); 2 mmol L⁻¹ de CaCl₂ (Merck); 5,4 mmol L⁻¹ de KCl (Pronalab), 1 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Merck); 0,8 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ (Merck), 5 mmol L⁻¹ de glucose (Riedel-de-Haen), 25 mmol L⁻¹ de Hepes (Sigma) e 1% (m/v) de Triton® X-100 (Merck).

3.2.3. Sistema de fluxo

O desenvolvimento do sistema de fluxo apresentado na Figura 3.2 foi conduzido com dois propósitos fundamentais: i) obter um sistema de fluxo com uma configuração simples, versátil e de fácil controlo; e ii) obter um sistema de fluxo que apresentasse

um bom desempenho analítico na determinação de Rb em amostras muito concentradas. O objectivo final em obter um sistema de fluxo que constituísse uma alternativa vantajosa de resposta a uma necessidade muito actual: a análise de amostras resultantes dos ensaios efectuados no âmbito da avaliação do efeito exercido por novos fármacos sobre os canais iónicos. O desempenho analítico do sistema foi avaliado recorrendo a simulação da matriz das amostras reais.

A simplicidade do sistema de fluxo está bem evidente no facto de utilizar apenas uma bomba de pistão que, simultaneamente, era responsável pela aspiração e pela propulsão quer da amostra quer do tampão de ionização, funcionando este último também como solução transportadora da amostra.

O ciclo analítico iniciava-se com o enchimento da seringa da bomba de pistão com a solução tampão de ionização (T). De seguida, com as válvulas solenóides de 3-vias (VS_1 e VS_2) na posição 0 (solenóide desactivado), aquela solução era empurrada através dos “reactores” R₁, R₂ e R₃ em direcção ao detector (D), estabelecendo-se deste modo a linha de base.

A introdução da amostra no sistema de fluxo ocorria por activação do solenóide da válvula VS_1 (posição 1) por um período de 2,25 s (“tempo de amostragem”) a um caudal de 0,8 mL min⁻¹, permitindo assim a aspiração do volume de amostra pretendido para o reactor R₁. O tempo de amostragem (2,25 s) e o caudal a que a amostra era aspirada (0,8 mL min⁻¹) definiam o volume de amostra introduzido no sistema (30 µL, neste caso). O reactor R₁ tinha o comprimento suficiente para impedir que a amostra chegasse até à seringa.

De seguida, comutando a posição das válvulas VS_1 (para a posição 0) e VS_2 (para a posição 1), a amostra era propulsionada através de R₂ para o esgoto (E) a um caudal de 1,2 mL min⁻¹ durante um determinado tempo (“tempo de reamostragem”, i.e., tempo durante o qual se rejeitava a zona frontal do segmento de amostra dispersa no transportador). Findo o tempo de reamostragem, comutando VS_2 novamente para a sua posição inicial (posição 0), redireccionava-se para o detector, ao mesmo caudal

(1,2 mL min⁻¹), a porção mais terminal e mais dispersa do segmento de amostra (i.e., a porção de amostra que ainda permanecia em R₂ após o tempo de reamostragem).

Durante todo o ciclo analítico, a bomba peristáltica (BP) introduzia continuamente água ultrapura através do ponto de confluência X, a um caudal de 3,25 mL min⁻¹, de modo a compensar o efeito exercido pelo caudal de aspiração do nebulizador, que estava regulado para 3 mL min⁻¹.

Um aspecto importante relacionado com o desempenho deste sistema era o facto de, se necessário, ele ser capaz de efectuar a repetição automática da análise utilizando um tempo de reamostragem diferente, de acordo com o valor de absorvência anteriormente obtido. Assim, se o sinal obtido num ciclo analítico fosse superior ao limite superior de resposta instrumental linear, a análise da amostra era repetida utilizando um tempo de reamostragem superior, de modo a que fosse obtido um factor de diluição mais elevado. Por outro lado, quando o sinal tinha um valor próximo ou abaixo do limite inferior de resposta instrumental linear, a análise era repetida com um tempo de reamostragem menor, de modo a diminuir o grau de diluição.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Desenvolvimento do sistema de fluxo

Em espectrofotometria atômica com atomização em chama a amostra é introduzida no sistema de atomização do equipamento por aspiração através de um tubo capilar de reduzidas dimensões, denominado nebulizador. O caudal de aspiração resulta da redução de pressão que se estabelece na extremidade do capilar posicionada no interior da câmara de nebulização, devido à entrada do gás comburente (ar comprimido) sobre pressão (efeito de Venturi). Assim, o recurso a instrumentação

deste tipo como unidade de detecção em sistemas de fluxo dispensa a utilização de dispositivos propulsores. No entanto, há trabalhos que referem que a utilização de um dispositivo capaz de “empurrar” as soluções para o nebulizador (i.e., um dispositivo de propulsão) resulta num aumento da precisão (Tyson, 1985). Segundo os autores, tal será devido quer à minimização do efeito provocado pelas características físicas da matriz, quer ao menor risco de gaseificação das soluções por entrada de ar através dos pontos de união da tubagem.

A aplicação pretendida para o sistema de fluxo desenvolvido - determinação de Rb em amostras de líquido extracelular e lisados celulares, no contexto do chamado “ensaio de efluxo de Rb⁺” - impunha limitações à escolha do tipo de dispositivo responsável pela propulsão da amostra, dado que o volume de amostra disponível é geralmente baixo - tipicamente 100 µL (Terstappen, 1999). Adicionalmente, e uma vez que a amostragem e a reamostragem eram efectuadas numa base de tempo, o dispositivo seleccionado teria ainda de garantir um caudal constante, de modo a assegurar a precisão do sinal analítico.

Na altura em que o trabalho foi desenvolvido estava já bem documentada a utilização de diversos dispositivos de introdução e propulsão de soluções em sistemas de fluxo acoplados a espectrofotómetros com atomização em chama, sendo os mais comuns as bombas peristálticas e as bombas de pistão. Alguns autores estudaram o desempenho destes dispositivos quando incorporados num sistema de fluxo destinado a efectuar diluições em linha e acoplado a um espectrofotómetro com atomização em chama (Fang *et al.*, 1992). Os autores concluíram que, nas mesmas condições experimentais, os resultados obtidos apresentavam precisão semelhante quando se utilizavam bombas peristálticas ou bombas de pistão (CV = 2%). Contudo, as bombas peristálticas possuem limitações reconhecidas, relacionadas sobretudo com oscilações não controladas do fluxo gerado, muitas vezes erradamente designadas por fluxo pulsado (Francis *et al.*, 2002; López-García *et al.*, 1995; Prados-Rosales *et al.*, 2002). De facto, o funcionamento das bombas peristálticas é influenciado pelo

seu modo de operação (i.e., pelo sentido de rotação da cabeça rotativa da bomba peristáltica - aspiração ou propulsão das soluções) e pelo desgaste/perda de elasticidade dos tubos de impulsão, o que pode resultar na introdução de bolhas de ar no sistema e/ou no aparecimento de pulsos não controlados, sobretudo nos casos em que os períodos de aspiração/propulsão são curtos e/ou se pretendem caudais baixos, uma vez que a diminuição da velocidade de rotação da cabeça rotativa da bomba peristáltica é acompanhada por um aumento do efeito do ruído provocado pelos seus rolamentos. López-García *et al.* tentaram obviar a estes inconvenientes apresentados pelas bombas peristálticas, tendo sugerido um sistema de diluição automático em que, para a medida da absorvência, se utilizavam intervalos de tempo cujo valor era sempre um múltiplo do período de tempo entre cada pulso dos rolamentos da cabeça rotativa (López-García *et al.*, 1998). O principal inconveniente desta proposta é que, ao utilizarem-se dois tubos de impulsão de diâmetros diferentes e baseando-se o cálculo da concentração na expressão $A = K \times C \times \omega \times r^2$ (A = valor de absorvência; K = constante que depende da sensibilidade de cada analito; C = concentração; ω = velocidade de rotação da bomba peristáltica e r^2 = diâmetro interno do tubo de impulsão), torna-se necessário saber o diâmetro interno real dos tubos de impulsão utilizados para se poder calcular a concentração da amostra (López-García *et al.*, 1998).

Por seu lado, as bombas de pistão são dispositivos que permitem a construção de sistemas de fluxo simples, versáteis, robustos e de elevada precisão analítica mesmo quando se pretende trabalhar apenas com microvolumes de amostra (Prior *et al.*, 2003) tendo, por isso, sido seleccionadas para este trabalho. Como se pode verificar na Figura 3.2, era utilizado apenas um dispositivo para aspirar a amostra e o tampão de ionização, resultando num sistema de configuração muito simples - “configuração linear”. As bombas de pistão são activadas por um motor “passo-a-passo” que efectua sempre um total de 2500 passos, e podem ser equipadas com seringas de capacidade variável. Assim, o volume debitado em cada passo varia de acordo com a

capacidade da seringa utilizada, sendo de 2 μL com seringas de 5 mL ou de 4 μL com seringas de 10 mL (Prior *et al.*, 2003). O volume debitado em cada passo e o número total de passos definem o volume total de solução introduzido no sistema de fluxo. O volume debitado em cada passo e a frequência com que os passos se sucedem definem o caudal da solução (Prior *et al.*, 2003). Mantendo constantes o comprimento do reactor R_2 (70 cm) e o volume de amostra introduzido no sistema (30 μL) e variando a capacidade da seringa e a frequência dos passos, verificou-se que, para a mesma frequência de passo, os resultados eram mais precisos quando a bomba de pistão estava equipada com a seringa de 5 mL. Tal estaria provavelmente relacionado com o facto de esta seringa dispensar um volume por passo inferior, deste modo promovendo uma melhor mistura da amostra com o tampão de ionização e uma maior dispersão da mesma. Criava-se assim uma “zona de corte” com um gradiente de concentrações menos pronunciado, o que aumentava a precisão analítica.

Apesar da precisão conseguida na introdução de microvolumes de amostra com as bombas de pistão permitir a construção de sistemas de fluxo para efectuar diluições em linha dotados de elevada robustez e fiabilidade, o seu acoplamento a espectrofotómetros com atomização em chama é desaconselhado. De facto, estes dispositivos têm algumas limitações, de que se destaca: i) o baixo caudal-máximo que são capazes de produzir, levando a que o caudal das soluções no sistema de fluxo acabe por ser condicionado pelo efeito de aspiração do nebulizador e não pela operação da bomba de pistão nos casos em que o caudal da solução propulsada pela bomba de pistão é inferior ao valor nominal do caudal de aspiração do nebulizador; ii) necessitarem de uma paragem periódica para reenchimento da seringa, o que tem influência na precisão dos resultados, entre outros (Fang *et al.*, 1992). Estas evidências motivaram a inclusão no sistema de fluxo de um canal paralelo que permitisse compensar o efeito de aspiração exercido pelo nebulizador. Com efeito, na literatura encontram-se descritas as vantagens da utilização de uma

confluência colocada perto do nebulizador do espectrofotômetro que permita compensar a diferença entre o caudal da solução propulsada e o valor nominal do caudal de aspiração do nebulizador (Tyson, 1991). O canal confluyente pode funcionar de modo passivo, i.e., só há entrada de solução através dele quando o caudal da solução propulsada é inferior ao caudal de aspiração do nebulizador, ou pode proporcionar a entrada da solução que faz a compensação dos caudais sobre pressão, se nele existir também um dispositivo propulsor como, por exemplo, uma bomba peristáltica. Segundo alguns autores, se esta confluência de caudais originar um caudal total pelo menos 1 mL min^{-1} superior ao caudal de aspiração do nebulizador obtém-se um aumento da sensibilidade e da precisão dos resultados, uma vez que o efeito de diluição provocado é compensado por um aumento da eficiência de nebulização (Brown e Ruzicka, 1984).

Numa configuração do sistema de fluxo inicialmente avaliada, o ponto de confluência X permitia simplesmente a livre aspiração de água ultrapura pelo nebulizador. No entanto, verificou-se que a precisão aumentava quando se colocava uma bomba peristáltica a propulsar a água ultrapura.

3.3.2. Optimização dos parâmetros experimentais

O caudal de água ultrapura que era introduzida no sistema de fluxo pela bomba peristáltica foi um dos parâmetros optimizados. Para tal, uma solução padrão de Rb 100 mg L^{-1} era propulsada continuamente pela bomba de pistão, a um caudal de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Esta solução confluía no ponto X com a água ultrapura propulsada pela bomba peristáltica. Fez-se variar o caudal de água ultrapura entre $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $4,25 \text{ mL min}^{-1}$. A precisão do sinal analítico obtido para cada valor de caudal testado foi o critério utilizado na selecção do valor de $3,25 \text{ mL min}^{-1}$ para as experiências posteriores.

Como já anteriormente foi referido, o volume de amostra disponível é frequentemente um aspecto que tem de ser tido em conta aquando do desenvolvimento de novas metodologias analíticas. O baixo volume de amostra geralmente disponível no caso da aplicação pretendida para o sistema de fluxo que foi desenvolvido condicionou a optimização do caudal a que a amostra era aspirada pela bomba de pistão (i.e., o caudal de introdução da amostra no sistema de fluxo) e o tempo de amostragem, de modo a conseguir-se efectuar múltiplas determinações. O valor do caudal foi feito variar entre $0,40 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,20 \text{ mL min}^{-1}$. Para cada valor testado analisou-se uma solução padrão de Rb 100 mg L^{-1} ($n = 5$), interpolando-se o valor do sinal analítico obtido numa curva de calibração com 4 pontos ($0 - 200 \text{ mg L}^{-1}$), obtida nas mesmas condições experimentais (i.e., mantendo-se o tempo de amostragem, o caudal do transportador que propulsionava a amostra para o detector e o caudal debitado pela bomba peristáltica). O tempo de amostragem foi feito variar entre $0,75 \text{ s}$ e $7,5 \text{ s}$. O sinal analítico obtido com a mesma solução padrão de Rb ($n = 5$) para cada valor de tempo de amostragem testado era interpolado numa curva de calibração, também ela com 4 pontos ($0 - 200 \text{ mg L}^{-1}$), obtida nas mesmas condições experimentais (i.e., mantendo-se o caudal a que a amostra era aspirada, o caudal do transportador que propulsionava a amostra para o detector e o caudal debitado pela bomba peristáltica). Num compromisso entre precisão, exactidão e rendimento analítico, seleccionou-se um tempo de amostragem de $2,25 \text{ s}$ e um caudal de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, a que corresponde um volume de amostra de cerca de $30 \text{ }\mu\text{L}$. A estratégia de diluição por amostragem de zonas (Figura 3.1) assenta na determinação da concentração utilizando apenas uma porção final do segmento de amostra que é introduzido no sistema, após este ter sofrido uma maior ou menor dispersão ao longo de um reactor (“reactor de diluição”; na Figura 3.2 representado por R_2) durante um determinado tempo (“tempo de reamostragem”). O comprimento do reactor R_2 e o caudal utilizado durante o tempo de reamostragem influenciam quer o rendimento analítico, quer a precisão dos resultados, como aparece referido

na literatura (Blanco *et al.*, 1992; Lapa *et al.*, 1996; Zagatto *et al.*, 1987b). De facto, reactores longos resultam num aumento da pressão hidrodinâmica e caudais baixos prejudicam o rendimento analítico. Por outro lado, reactores curtos e/ou caudais elevados resultam numa diminuição da dispersão da amostra no transportador, originando um gradiente de concentrações mais pronunciado na zona de corte. Tal poderá afectar a precisão, uma vez que pequenas variações nas condições experimentais provocarão diferenças muito significativas nos valores do sinal analítico obtido (Lapa *et al.*, 1996).

Utilizaram-se três reactores R_2 de comprimento diferente (50, 70 e 140 cm) e, para cada um deles, determinaram-se os factores de diluição, o intervalo de resposta linear (sinal *versus* concentração, avaliado com base no valor obtido para o coeficiente de correlação de Pearson - r), a precisão e o rendimento analítico alcançados. Para o efeito, utilizaram-se soluções de calibração de Rb com concentrações entre $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 1000 mg L^{-1} e testaram-se diferentes tempos de reamostragem. A cada tempo de reamostragem correspondia um diferente intervalo de resposta instrumental linear e um diferente coeficiente de variação médio. Este último era calculado como a média aritmética dos coeficientes de variação obtidos na leitura replicada ($n = 5$) de cada uma das soluções de calibração de Rb do intervalo de resposta linear respectivo. Os resultados apresentados na Tabela 3.1 mostram que o sistema de fluxo tinha melhor desempenho com o reactor R_2 de 70 cm de comprimento, uma vez que era com este reactor que se conseguiam intervalos de resposta linear mais alargados, coeficientes de variação mais baixos e rendimento analítico mais elevado. A precisão obtida com os reactores mais longos (70 e 140 cm) era melhor do que a obtida com o reactor de 50 cm, o que poderá estar relacionado com o facto do gradiente de concentrações formado na zona de corte ser menos pronunciado com os primeiros, acabando pequenas variações na zona de corte da amostra por não originarem variações tão grandes nos valores de sinal obtidos.

Tabela 3.1

Influência do comprimento do reactor de diluição (R_2 na Figura 3.2) no desempenho do sistema de fluxo (dados obtidos por EEA/chama).

Reactor de 50 cm				
Tempo de reamostragem ^a (s)	Intervalo de resposta linear ^b (mg L ⁻¹)	r	Determinações h ⁻¹	CV% médio
0	12,5 - 100	0,9996	130	2,49
15	12,5 - 200	0,9996	85	4,60
17	12,5 - 300	0,9992	81	4,11
19	25 - 1000	0,9983	77	2,34
21	100 - 1000	0,9993	74	2,46
23	250 - 1000	0,9996	71	6,65
25	500 - 1000	0,9975	68	3,02
Reactor de 70 cm				
Tempo de reamostragem ^a (s)	Intervalo de resposta linear ^b (mg L ⁻¹)	r	Determinações h ⁻¹	CV% médio
0	12,5 - 100	0,9994	111	1,81
18	12,5 - 200	0,9992	79	1,24
19	25 - 200	0,9999	77	2,60
22	25 - 300	0,9998	73	1,78
23	25 - 500	0,9995	71	1,72
25	25 - 1000	0,9991	69	2,10
26	50 - 1000	0,9961	67	0,88
28	200 - 1000	0,9995	65	1,10
Reactor de 140 cm				
Tempo de reamostragem ^a (s)	Intervalo de resposta linear ^b (mg L ⁻¹)	r	Determinações h ⁻¹	CV% médio
0	12,5 - 100	0,9998	73	2,84
36	25 - 300	0,9998	49	2,15
38	50 - 300	0,9983	47	2,39
42	100 - 1000	0,9985	45	1,90
44	200 - 1000	0,9999	44	4,84

^aPara além dos tempos de reamostragem apresentados na Tabela foram testados outros tempos (reactor de 50 cm: 0 s e de 13 s a 25 s com incrementos de 2 s; reactor de 70 cm: 0 s e de 13 s a 31 s com incrementos de 1 s; reactor de 140 cm: 0 s e de 32 s a 42 s com incrementos de 2 s) aos quais correspondiam factores de diluição diferentes. No entanto, o intervalo de resposta linear conseguido com esses tempos não diferia dos apresentados na tabela e os coeficientes de correlação eram piores.

^bAs concentrações testadas foram 12,5; 25; 50; 100; 200; 250; 300; 500; 750 e 1000 mg L⁻¹.

Como se pode verificar também na Figura 3.3, para os reactores mais longos, uma pequena variação no tempo de reamostragem reflectia-se numa variação menos abrupta do factor de diluição do que aquela que se observava com o reactor de 50 cm. A comparação gráfica entre os factores de diluição obtidos com o reactor de 50 cm e com o reactor de 70 cm de comprimento para iguais tempos de reamostragem (Figura 3.4) ilustra mais facilmente a observação anterior. Da análise da Figura 3.5 podemos concluir ainda que, para qualquer um dos reactores estudados, aumentando o tempo de reamostragem, o declive da curva de calibração diminuía, indicando menor sensibilidade analítica, ou seja, um maior grau de diluição.

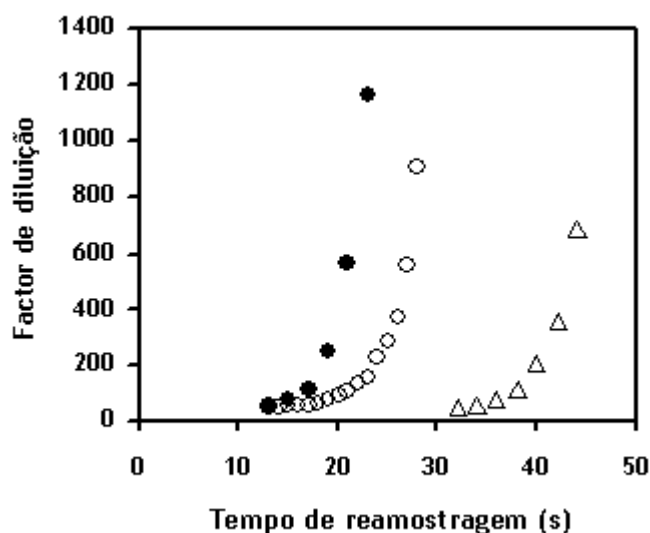


Figura 3.3

Influência do tempo de reamostragem no factor de diluição para reactores R_2 de diferente comprimento:

● = reactor de 50 cm; ○ = reactor de 70 cm; △ = reactor de 140 cm.

Nota: no caso do reactor de 70 cm foram testados outros valores de tempo de reamostragem, correspondendo a factores de diluição superiores (até 11500). No entanto, estes não são apresentados no gráfico de modo a possibilitar uma melhor comparação visual entre os três reactores testados.

O factor de diluição (FD) foi calculado através da equação $FD = C_i / C_d$, sendo C_i a concentração inicial e C_d a concentração após diluição. C_d era calculada por interpolação do valor do sinal analítico obtido após a diluição em linha de uma

solução padrão de Rb numa curva de calibração obtida por leitura directa de 5 soluções de calibração de Rb com concentrações compreendidas entre 0 e 5 mg L⁻¹ (intervalo de resposta linear para a leitura directa por EEA/chama). A equação típica desta curva de calibração era $S = 22,96 C + 1,2$ ($r = 0,9956$), em que S representa a altura do sinal analítico em *unidades*, em que 1 *unidade* corresponde a uma quadrícula do papel de registo e é equivalente a 2,5 mm, e C representa a concentração de Rb (em mg L⁻¹).

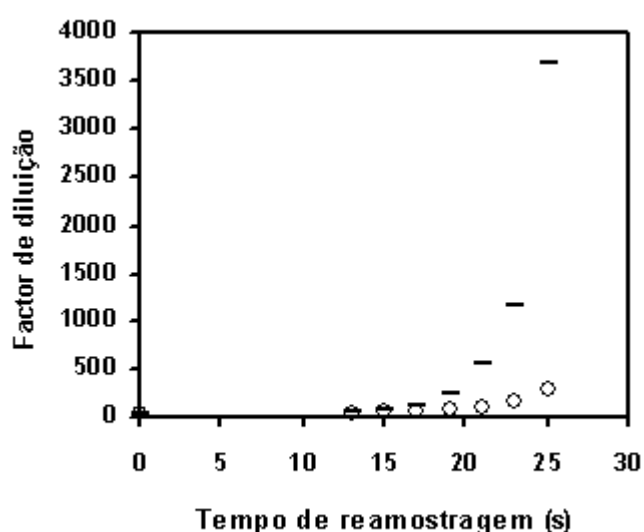


Figura 3.4

Variação do factor de diluição em função do tempo de reamostragem para reactores R₂ de 50 cm (—) e de 70 cm de comprimento (O).

Utilizando o reactor R₂ de 70 cm de comprimento e fazendo variar entre 0,4 e 1,2 mL min⁻¹ o caudal da amostra propulsionada durante o tempo de reamostragem, verificou-se que a precisão não era significativamente afectada (Figura 3.6). Ou seja, independentemente do caudal utilizado, o reactor de 70 cm de comprimento assegurava a adequada dispersão dos 30 µL de amostra introduzidos no sistema de fluxo, permitindo obter um perfil de concentrações adequado na zona de corte, i.e., um gradiente de concentrações pouco pronunciado. No sentido de melhorar o

rendimento analítico, seleccionou-se o caudal de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ – o valor máximo possível utilizando uma seringa de 5 mL.

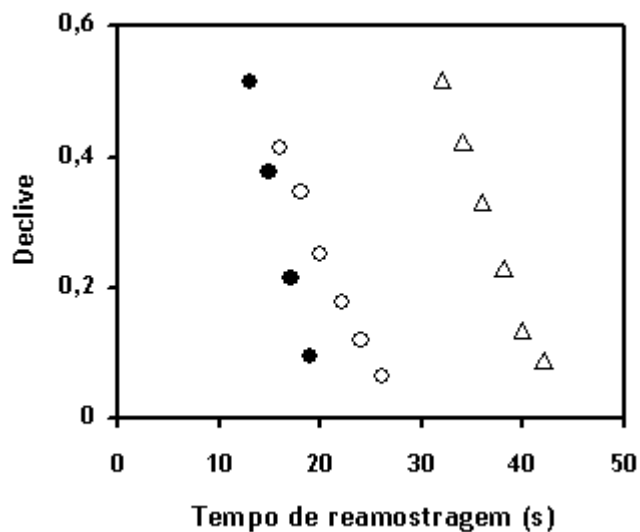


Figura 3.5

Variação do declive das curvas de calibração em função dos tempos de reamostragem para reactores R_2 de diferente comprimento: ● = 50 cm; ○ = 70 cm; △ = 140 cm.

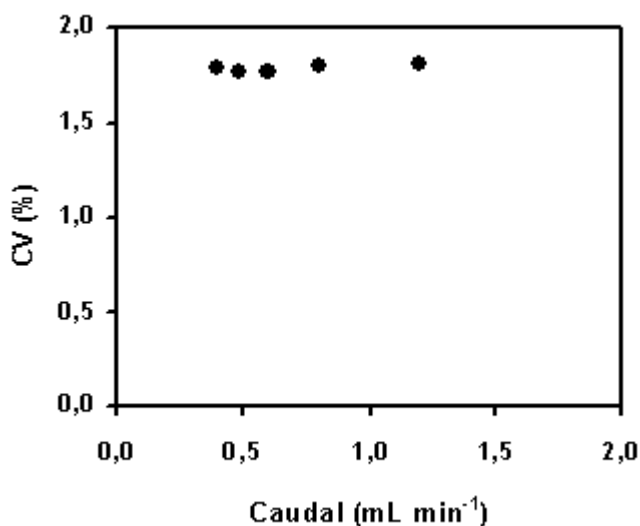


Figura 3.6

Influência exercida pelo caudal utilizado durante o tempo de reamostragem na precisão analítica, traduzida pelo valor do coeficiente de variação obtido na leitura consecutiva ($n = 5$) de uma solução padrão de Rb com uma concentração de 250 mg L^{-1} (comprimento do reactor $R_2 = 70 \text{ cm}$; tempo de reamostragem = 25 s).

Fazendo variar o comprimento do reactor R_3 entre 50 e 150 cm e o caudal após o tempo de reamostragem entre 0,4 e 1,2 mL min⁻¹, não se verificaram diferenças significativas nas características analíticas do sistema. Assim, e de modo a conseguir o melhor rendimento analítico, seleccionou-se o reactor R_3 de menor comprimento (50 cm) e o caudal mais elevado (1,2 mL min⁻¹).

O estudo da influência exercida pela geometria dos reactores R_1 , R_2 e R_3 também foi avaliada e mostrou não interferir significativamente no desempenho analítico do sistema de fluxo desenvolvido.

Tabela 3.2

Parâmetros operacionais do sistema de fluxo desenvolvido.

Parâmetro	Valor óptimo
Volume de amostra	30 µL
Comprimento do reactor R_2	70 cm
Comprimento do reactor R_3	50 cm
Caudal de introdução da amostra	0,8 mL min ⁻¹
Caudal durante o tempo de reamostragem	1,2 mL min ⁻¹
Caudal após o tempo de reamostragem	1,2 mL min ⁻¹
Caudal debitado pela bomba peristáltica	3,2 mL min ⁻¹

3.3.3. Características do sistema de fluxo

Uma vez optimizado (Tabela 3.2), e sem recorrer à estratégia de amostragem de zonas, o sistema de fluxo proporcionava um factor de diluição de cerca de 45, em resultado do efeito provocado pela dispersão da amostra durante o seu transporte até ao detector e pela sua confluência com a água propulsãoada pela bomba peristáltica. O recurso à amostragem de zonas possibilitava aumentar significativamente este factor de diluição de um modo controlado e ainda fazer o ajuste automático desse factor em função da concentração inicial da amostra.

O sistema de fluxo desenvolvido permitia obter vários intervalos de resposta linear, numa gama de concentrações entre 12,5 mg L⁻¹ (concentração mínima testada) e 1000 mg L⁻¹ (concentração máxima testada), com valores de coeficiente de correlação entre 0,9961 e 0,9998 e factores de diluição até 11500. Os valores do coeficiente de variação médio foram sempre inferiores a 2,6%. Na figura 3.7 pode observar-se uma curva de calibração típica obtida por EEA/chama com um tempo de reamostragem de 25 s.

Embora o sistema de fluxo desenvolvido seja aplicável noutras circunstâncias que requeiram uma grande diluição prévia das amostras, ele foi concebido a pensar na determinação de Rb durante os ensaios de efluxo de Rb⁺ realizados no âmbito da avaliação do mecanismo de acção de potenciais novos fármacos. Assim, para avaliar o desempenho do sistema simulou-se a composição das amostras obtidas naqueles ensaios (composição já descrita na secção “Material e reagentes” deste Capítulo).

Tabela 3.3

Influência da matriz no sinal analítico obtido na determinação de Rb por EEA/chama.

Concentração da solução padrão (mg L ⁻¹)	Tempo de reamostragem (s)	Magnitude do sinal analítico ^a (mm)	
		Matriz: solução de HNO ₃ 0,2% (v/v)	Matriz: solução simuladora da matriz da amostra
50	0	26,7 ± 0,6	26,8 ± 0,8
	18	69,7 ± 0,8	70,1 ± 0,3
200	21	34,8 ± 0,3	35,1 ± 0,1
	20	77,5 ± 0,5	77,3 ± 0,2
300	22	49,7 ± 0,2	49,9 ± 0,1

^a Média aritmética de 10 determinações consecutivas.

No sentido de detectar eventuais interferências da matriz, foram preparadas três soluções padrão de Rb (50, 200 e 300 mg L⁻¹) usando como diluente uma solução de

HNO₃ 0,2% (v/v) (soluções de calibração usuais) ou a solução simuladora da matriz das amostras. Estas soluções foram analisadas por EEA/chama nas mesmas condições experimentais e, apesar da sua diferente composição, não se observaram diferenças significativas tanto na magnitude como na precisão (n = 10) dos sinais analíticos obtidos (Tabela 3.3).

A exactidão foi avaliada comparando os resultados obtidos com o sistema de fluxo com os obtidos recorrendo a um procedimento de diluição manual (Tabela 3.4).

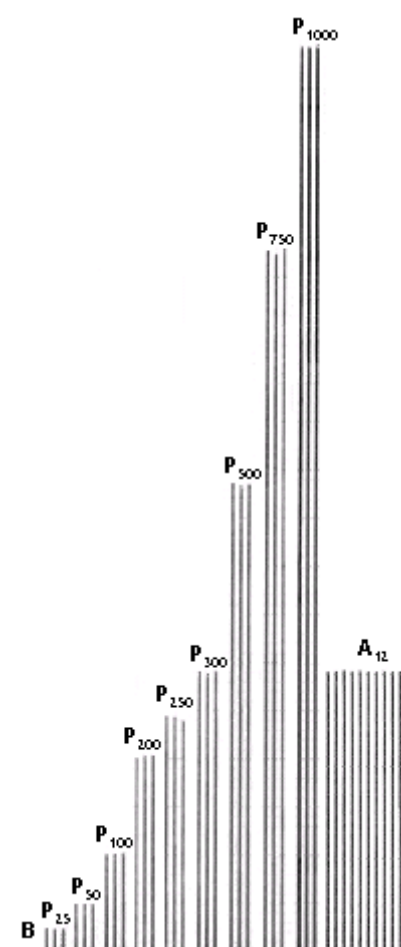


Figura 3.7

Registo gráfico correspondente à obtenção de uma curva de calibração por EEA/chama (tempo de reamostragem: 25 s) e avaliação da precisão analítica (amostra A12; CV% = 1,05; n = 10).

Tabela 3.4

Comparação dos resultados (mg L^{-1} ; $n = 20$) obtidos na determinação de Rb por EEA/chama usando o sistema de fluxo desenvolvido ou o procedimento manual.

Amostra	Sistema de fluxo desenvolvido (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio relativo ^a
1	14,8 $\pm$ 2,0	14,1 $\pm$ 3,1	4,8
2	20,4 $\pm$ 2,0	20,5 $\pm$ 2,9	-0,59
3	29,9 $\pm$ 1,7	31,0 $\pm$ 2,4	-3,7
4	41,9 $\pm$ 2,4	39,5 $\pm$ 2,3	6,1
5	52,0 $\pm$ 2,2	52,0 $\pm$ 3,1	-0,9
6	69,0 $\pm$ 1,9	69,9 $\pm$ 2,4	-1,3
7	88,7 $\pm$ 1,9	91,3 $\pm$ 3,1	-2,8
8	112,0 $\pm$ 2,5	112,0 $\pm$ 2,3	-0,04
9	150,6 $\pm$ 1,6	147,8 $\pm$ 2,7	1,9
10	197,4 $\pm$ 2,6	203,0 $\pm$ 3,5	-2,8
11	249,0 $\pm$ 2,3	248,0 $\pm$ 3,0	0,4
12	299,3 $\pm$ 2,1	304,1 $\pm$ 4,4	-1,6
13	35,4 $\pm$ 2,6	347,0 $\pm$ 3,9	1,5
14	451,5 $\pm$ 2,1	444,9 $\pm$ 5,1	1,5
15	547,7 $\pm$ 2,5	554,2 $\pm$ 4,7	-1,2
16	652,0 $\pm$ 2,2	649,0 $\pm$ 3,5	0,5
17	752,0 $\pm$ 2,4	754,0 $\pm$ 4,2	-0,3
18	801,0 $\pm$ 2,2	797,0 $\pm$ 4,7	0,5
19	897,9 $\pm$ 2,6	905,0 $\pm$ 5,4	-0,8
20	998,0 $\pm$ 2,5	996,6 $\pm$ 4,9	0,1

^aA “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de três determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão calculado de acordo com o descrito no Capítulo 2.

^bO cálculo do desvio relativo, expresso em percentagem, foi feito com base na expressão $[(C_p - C_m)/C_m] \cdot 100$, em que C_p representa a concentração obtida com o sistema de fluxo proposto e C_m a concentração obtida pelo procedimento de diluição manual.

Os dados apresentados na Tabela 3.4 foram obtidos utilizando como base a solução simuladora da matriz da amostra com a qual se prepararam 20 soluções com concentrações de Rb compreendidas entre 15 mg L^{-1} e 1000 mg L^{-1} , as amostras. Os

resultados obtidos mostraram uma boa concordância entre os dois procedimentos, como indicam os valores do desvio relativo (entre -3,70% e +6,10%) bem como os parâmetros da equação de regressão linear $C_p = 0,9995 \times C_m - 0,0302$ ($r = 0,9999$), em que C_p representa a concentração obtida pelo sistema de fluxo proposto (EEA/chama) e C_m a concentração obtida pelo procedimento de diluição manual (EEA/chama). A concordância entre os dois conjuntos de valores foi confirmada ainda pelo teste t de Student emparelhado, sendo o valor de t obtido (0,246) inferior ao valor de t crítico (2,093) para um nível de confiança de 95% ($n.$ º de graus de liberdade = 19).

Como já foi referido anteriormente, a optimização e a caracterização do sistema de fluxo desenvolvido foram efectuadas usando a EEA/chama como técnica instrumental de detecção e quantificação do Rb, pelo facto desta dispensar o recurso a uma fonte de radiação (lâmpada). No entanto, o desempenho do sistema foi também avaliado por EAA/chama, uma vez que esta é a técnica mais comumente utilizada para efectuar a determinação de Rb no contexto dos ensaios de efluxo. Neste caso, com um tempo de reamostragem de 23 s obtinha-se um factor de diluição de 170, uma resposta linear ($r = 0,9978$) entre 25 e 750 mg L⁻¹ ($S = 0,0822 \times C - 1,8309$, em que S representa a altura do sinal analítico em *unidades*, em que 1 *unidade* corresponde a uma quadrícula do papel de registo e é equivalente a 2,5 mm, e C representa a concentração, expressa em mg L⁻¹. O CV médio era de 2,4%. Fez-se também a avaliação de possíveis interferências provocadas pela matriz, recorrendo à mesma estratégia utilizada no caso da EEA/chama (Tabela 3.5).

Também neste caso, e em concordância com os resultados de Terstappen (Terstappen, 1999), não se encontraram diferenças significativas quer na magnitude do sinal, quer na precisão ($n = 10$) para todas as diferentes soluções padrão testadas. Para avaliar a exactidão dos resultados obtidos por EAA/chama analisaram-se amostras com concentração entre 25 e 750 mg L⁻¹, seleccionadas de entre as amostras já anteriormente analisadas por EEA/chama.

Tabela 3.5

Influência exercida pela composição da matriz no sinal analítico obtido na determinação de Rb por EAA/chama (n = 10).

Concentração da solução padrão (mg L ⁻¹)	Tempo de reamostragem (s)	Magnitude do sinal analítico ^a (mm)	
		Matriz: solução de HNO ₃ 0,2% (v/v)	Matriz: solução simuladora da matriz da amostra
50	23	3,4 ± 0,08	3,5 ± 0,10
200		14,2 ± 0,4	14,1 ± 0,3
300		21,3 ± 0,5	21,0 ± 0,4

^a Média aritmética de 10 determinações consecutivas.

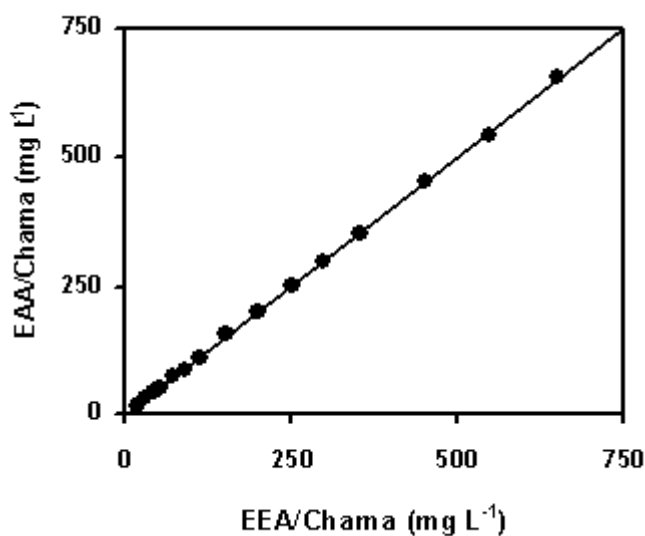


Figura 3.8

Recta de regressão linear entre os resultados obtidos na determinação de Rb (n = 17) por EEA/chama e por EAA/chama ($EEA/chama = 1,0002 \times EAA/chama - 0,3834$; $r = 0,9998$).

Os resultados obtidos com o sistema de fluxo não diferiam significativamente dos resultados obtidos pelo procedimento manual, como indicam os valores obtidos para o DR%: -5,42% - +6,33%. A concordância entre os dois conjuntos de valores era ainda suportada pela equação de regressão linear ($C_p = 0,9995 \times C_m - 0,3091$; $r = 0,9997$,

em que C_p representa a concentração obtida com o sistema de fluxo e C_m a concentração obtida recorrendo ao procedimento de diluição manual) e pelo teste t de Student emparelhado [t calculado = 0,129; t crítico = 2,120, para um nível de confiança de 95% ($n.^o$ de graus de liberdade = 16)].

Recorrendo à análise por regressão linear, fez-se a comparação entre os resultados obtidos por cada uma das técnicas: EEA/chama e EAA/chama (Figura 3.8). Pela equação $\text{EEA/chama} = 1,0002 \times \text{EAA/chama} - 0,3834$ ($r = 0,9998$) pôde concluir-se que não existiam diferenças significativas entre os dois conjuntos de resultados, sendo portanto possível utilizar qualquer uma das duas técnicas.

3.4. Conclusões

O sistema de fluxo desenvolvido era um sistema simples e de baixo custo, mas provou ser robusto, versátil e capaz de fornecer resultados precisos e exactos, utilizando quer a EEA/chama quer a EAA/chama como processo de detecção. Graças à estratégia de diluição utilizada (amostragem de zonas), era possível a determinação de Rb numa gama de concentrações muito ampla sem ser necessário efectuar alterações na configuração física do sistema, no grau de rotação do queimador do espectrofotómetro ou quaisquer outras alterações de carácter instrumental. Para além destes aspectos, importa salientar ainda que o sistema de fluxo também era capaz de determinar automaticamente, através de um mecanismo de controlo por retroacção (*feedback*), se era necessário repetir a análise utilizando um tempo de reamostragem diferente (i.e., um grau de diluição diferente), deste modo aumentando o rendimento analítico e o grau de automatização do sistema (menor intervenção do analista). A estes atributos do sistema desenvolvido deve ainda acrescentar-se a grande acessibilidade dos diferentes dispositivos necessários para a sua construção. Por fim, pode também salientar-se que se trata de um sistema de

fácil operação, compatível com a necessidade de obter um rendimento analítico elevado, e que poderá ser facilmente adaptado a outras determinações em que seja necessário efectuar uma elevada diluição prévia de amostras com concentração inicial bastante variável.

3.5. Bibliografia

- Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F.R. e Zagatto, E.A.G. (1995). Multicommutation in flow analysis - Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. *Analytica Chimica Acta*. **310**: 447-452.
- Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H. Maspoch, S., Rédon, M. e Riba J. (1992). Multi-component analysis of concentrated solutions by flow-injection analysis with zone sampling and partial least-squares resolution. *Analytica Chimica Acta*. **259**: 219-224.
- Brown, M.W e Ruzicka, J. (1984). Parameters affecting sensitivity and precision in the combination of flow injection analysis with flame atomic-absorption spectrometry. *Analyst*. **109**: 1091-1094.
- Falconer, M., Smith, F., Surah-Narwal, S., Congrave, G., Liu, Z., Hayter, P., Ciaramella, G., Keighley, W., Haddock, P., Waldron, G. e Sewing, A. (2002). High-throughput screening for ion channel modulators. *Journal of Biomolecular Screening*. **7**: 460-465.
- Fang, Z., Sperling, M. e Welz, B. (1992). Comparison of three propulsion systems for application in flow-injection zone penetration dilution and sorbent extraction preconcentration for flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **269**: 9-19.
- Fang, Z., Welz, B. e Sperling, M. (1993). Expansion of dynamic range of flame atomic absorption spectrometry by an efficient flow injection dilution system based on dispersion of microliter-volume samples. *Analytical Chemistry*. **65**: 1682-1688.
- Ford, J.W., Stevens, E.B., Treherne, J.M., Packer, J., Bushfield, M. (2002). Potassium channels: gene family, therapeutic relevance, high-throughput screening technologies and drug discovery. *Progress in Drug Research*. **58**: 133-168.
- Francis, P.S., Lewis S.W., Lim K.F., Carlsson K. e Karlberg B. (2002). Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. *Talanta*. **58**: 1029-1042.
- Frary, B.D. (1998). Multipoint calibration from one standard solution and automatic dilution of overrange samples for flame atomic absorption spectrometry. *Analyst*. **123**: 233-237.
- Jilkina, O., Kuzio, B. e Kupriyanov V.V. (2003). Hyposmotic shock: effects on rubidium/potassium efflux in normal and ischemic rat hearts, assessed by ^{87}Rb and ^{31}P NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1637**: 20-30.
- Kazic, T. e Gojkovic-Bukarica, L. (1999). Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators. *The Scientific Journal Facta Universitatis*. **6**: 23-30.

- Kemmel, V., Taleb, O., Andriamampandry, C., Aunis, D. e Maitre, M. (2003). γ -Hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience*. **116**: 1021-1031.
- Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C. e Santos, J.L.M. (1996). Determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in wines by FIA using an automatic zone sampling system. *Food Chemistry*. **55**: 397-402.
- Lima, J.L.F.C., Rangel, A.O.S.S., Rangel e Silva M.M.S.R. (1991). Determination of Ca, Mg, Na, and K in wines by atomic absorption and flame emission spectrometry using a flow injection manifold with a dialysis unit. *Atomic Spectroscopy*. **12**: 204-206.
- López-García, I., Viñas, P., Campillo, N. e Hernández-Córdoba, M. (1995). Use of submicroliter-volume samples for extending the dynamic range of flow-injection flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **308**: 85-95.
- López-García, I., Sánchez-Merlos, M. e Hernández-Córdoba, M. (1998). Automatic dilution system for use in flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **13**: 551-556.
- Marks, M.J., Whiteaker, P., Calcaterra, J., Stitzel, J.A., Bullock, A.E., Grady, S.R., Picciotto, M.R., Changeux, J.P. e Collins, A.C. (1999). Two pharmacologically distinct components of nicotinic receptor-mediated rubidium efflux in mouse brain require the β_2 subunit. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **289**: 1090-1103.
- Numann, R. e Negulescu, P.A. (2001). High-throughput screening strategies for cardiac ion channels. *TCM*. **11**: 54-59.
- Parihar, A.S., Coghlan, M.J., Gopalakrishnan, M. e Shieh C.C. (2003). Effects of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *European Journal of Pharmacology*. **471**: 157-164.
- Prados-Rosales, R.C., Luque-Gracia, J.L. e Castro, M.D.L. (2002). Review - propelling devices: the heart of flow injection approaches. *Analytica Chimica Acta*. **461**: 169-180.
- Prior, J.A.V., Santos, J.L.M. e Lima, J.L.F.C. (2003). Sampling strategies exploiting multi-pumping flow systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **375**: 1234-1239.
- Reis B.F., Jacintho, A.O., Mortatti, J., Krug, F.J., Zagatto, E.A.G., Bergamin F.º, H. e Pessenda, L.C.R. (1981). Zone-sampling processes in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **123**: 229-237.

- Rocha, F.R.P., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Lapa, R.A S. e Santos, J.L.M.S. (2002). Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*. **468**: 119-131.
- Scott, G.W., Wilkins, D.E., Trivedi, S. e Crankshaw, D.J. (2003). A medium-throughput functional assay of KCNQ2 potassium channels using rubidium efflux and atomic absorption spectrometry. *Analytical Biochemistry*. **319**: 251-257.
- Silva, H.A., Aronson, J.K., Grahame-Smith, D.G., Jobst, K.A. e Smith, A.D. (1998). Abnormal function of potassium channels in platelets of patients with Alzheimer's disease. *The Lancet*. **352**: 1-4.
- Stewart, K.K. e Rosenfeld, A.G. (1982). Exponential dilution chambers for scale expansion in flow injection analysis. *Analytical Chemistry*. **54**: 2368-2372.
- Tao, G., Fang, Z., Baasner, J. e Welz, B. (2003). Flow injection on-line dilution for flame atomic absorption spectrometry by micro-sample introduction and dispersion using syringe pumps. *Analytica Chimica Acta*. **481**: 273-281.
- Terstappen, G.C. (1999). Functional analysis of native and recombinant ion channels using a high-capacity nonradioactive rubidium efflux assay. *Analytical Biochemistry*. **272**: 149-155.
- Terstappen, G.C. (2005). Ion channel screening technologies today. *Drug Discovery Today: Technologies*. **2**: 133-140.
- ThermoElemental. (2002). *Application notes: drug discovery, ion channels and the Rb efflux method*. ThermoElemental. Winsford Cheshire.
- Tyson, J.F. (1985). Flow injection analysis techniques for atomic absorption spectrometry - a review. *Analyst*. **110**: 419-429.
- Tyson, J.F. (1991). Flow injection atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta Rev.* **14**: 169-233.
- Whitman, D.A. e Christian, G.D. (1989). Cascade system for rapid on-line dilutions in flow-injection analysis. *Talanta*. **36**: 205-211.
- Wilson, J.R., Duncan, N.A., Giles, W.R. e Clark, R.B. (2004). A voltage-dependent K⁺ current contributes to membrane potential of acutely isolated canine articular chondrocytes. *The Journal of Physiology*. **557**: 93-104.
- Zagatto, E.A.G., Reis, B.F., Martinelli, M., Krug, F.J., Bergamin F.º, H. e Giné, M.F. (1987a). Confluent streams in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **198**: 153-163.

Zagatto, E.A.G., Bahia F.º, O. e Bergamin F.º, H. (1987b). Recording the real sample distribution and concentration/time functions in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **193**: 309-314.

A decorative graphic consisting of several overlapping squares in shades of gray and black, positioned to the left of the chapter title.

Capítulo

4

**Fluxo pulsado e EA com atomização em
chama: estudos preliminares e aplicação analítica**

4. Fluxo pulsado e espectrofotometria atômica com atomização em chama: estudos preliminares e aplicação analítica

4.1. Introdução

Na introdução a este Capítulo discutir-se-ão, em primeiro lugar, as razões que motivaram o estudo da influência exercida por um fluxo pulsado sobre o processo global de aspiração, nebulização e atomização das soluções, próprio do equipamento de espectrofotometria atômica. Posteriormente, far-se-á uma breve abordagem à importância das determinações escolhidas para demonstrar a aplicabilidade analítica dos sistemas de fluxo de diferente configuração que foram estudados: cálcio e magnésio em digestos de amostras de cabelo e sódio em amostras de urina.

4.1.1. Fluxo pulsado e espectrofotometria atômica com atomização em chama: estudos preliminares

Os sistemas de fluxo com multi-impulsão (SFMI), descritos em 2002 por Lapa *et al.* constituem uma inovação relativamente recente na área da análise em fluxo (Lapa *et al.*, 2002). Como já foi referido no Capítulo de Introdução a esta dissertação, os SFMI assentam na utilização de micro-bombas solenóides (mBS) como dispositivos responsáveis pela introdução e propulsão das soluções, de que resulta serem sistemas com um fluxo tipicamente pulsado. Relativamente ao fluxo laminar, característico da generalidade dos outros sistemas de fluxo, o fluxo pulsado resultante da actuação das mBS, ao promover o movimento caótico das soluções em todas as direcções dentro da tubagem do sistema, facilita o processo de mistura, mesmo em condições de dispersão limitada, como acontece, por exemplo, quando se utilizam reactores de pequena dimensão. As vantagens apresentadas pelo fluxo pulsado (Lima *et al.*, 2004) estiveram na origem da rápida aceitação dos SFMI como alternativa aos sistemas de

fluxo laminar, tendo surgido, imediatamente após a apresentação deste tipo de sistemas de fluxo, um crescente número de publicações científicas em que era referido o seu acoplamento a diversos tipos de detectores, nomeadamente, espectrofotómetros de absorção molecular (Carneiro *et al.*, 2005), fluorímetros (Pinto *et al.*, 2005) e luminómetros (Marques *et al.*, 2005). Por outro lado, porém, a aplicabilidade e as potencialidades do acoplamento dos SFMI a equipamento de espectrofotometria atómica (EA), nomeadamente a espectrofotómetros de absorção atómica com atomização em chama e a fotómetros de chama (neste contexto também considerados como equipamento de EA), eram ainda desconhecidas, tendo, por esse motivo, constituído o objecto de estudo do trabalho que se apresenta neste Capítulo.

O equipamento de EA é capaz de autonomamente aspirar as soluções que se pretendem analisar (dispensando, por isso, dispositivos adicionais de introdução de amostra). Além disso, promove a nebulização prévia dessas mesmas soluções, como forma de as fazer chegar ao sistema de atomização (queimador de chama) propriamente dito. Assim, para se poder concluir acerca da viabilidade do acoplamento de SFMI a equipamento de EA, interessava saber que tipo de influência exerceria o fluxo pulsado sobre os processos de aspiração, nebulização e atomização característicos daquele equipamento, e finalmente, em reflexo disso, sobre o sinal analítico obtido.

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver um conjunto de sistemas de fluxo de configuração simples, tendo em comum a utilização de fluxo pulsado, com detecção por fotometria de chama (FC) ou por espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama (EAA/chama). Neste último caso, consideraram-se também diferentes tipos de câmaras de nebulização (câmaras de nebulização com *flow spoiler* ou com esfera de impacto). Depois, para demonstrar a aplicabilidade deste tipo de sistemas, e nomeadamente para avaliar a precisão e a exactidão com eles conseguidas, procedeu-se à determinação de cálcio (Ca) e de magnésio (Mg) em

digestos de amostras de cabelo por EAA/chama (o que requer não só uma diluição prévia das amostras, como também a sua eficiente mistura com um “agente libertador” - solução de lantânio (La) -, para controlar as interferências químicas) e à determinação de sódio (Na) em amostras de urina por FC, o que requer uma diluição prévia, muito elevada, das mesmas. Em ambos os casos, os sistemas de fluxo utilizados permitiam efectuar diluições em linha através da introdução de microvolumes de amostra e da sua posterior dispersão num transportador adequado durante o percurso para o detector.

4.1.2. Fluxo pulsado e espectrofotometria atómica com atomização em chama: aplicação analítica

4.1.2.1 Determinação de Ca e Mg em digestos de amostras de cabelo

Apesar de a primeira referência à análise de cabelo datar de 1858, ainda hoje a utilização deste tipo de amostra para fins analíticos se mantém controversa (Pozebon *et al.*, 1999).

Os defensores da utilização do cabelo como material de análise realçam as suas vantagens relativamente aos outros materiais biológicos como, por exemplo, o sangue ou a urina, aos quais o cabelo geralmente constitui uma alternativa para a monitorização da exposição ambiental e ocupacional, e para a avaliação do estado nutricional e toxicológico do organismo. De facto, sendo um órgão excretor de diversas substâncias, e nomeadamente de elementos metálicos vestigiais, o cabelo humano pode servir como amostra biológica para a detecção de intoxicações sistémicas. Acresce ainda o facto de a análise do cabelo poder permitir obter informação sobre episódios de exposição mais remotos, uma vez que, por exemplo, enquanto o sangue e a urina são apenas repositórios mais ou menos temporários dos metais vestigiais (sendo, desse modo, amostras indicadas para a detecção de

intoxicações mais ou menos recentes), o cabelo pode funcionar como local de acumulação (Kubová *et al.*, 1997).

Depois, de um ponto de vista prático, a análise de cabelo apresenta também diversas vantagens, relacionadas com a simplicidade da matriz e com a facilidade de colheita (não invasiva), de transporte e de armazenamento/conservação das amostras (não requer adição de substâncias conservantes; não necessita de condições especiais de conservação, como seja a refrigeração) (Kubová *et al.*, 1997). Finalmente, a análise do cabelo apresenta ainda uma vantagem adicional, esta do ponto de vista mais estritamente laboratorial, uma vez que, como alguns elementos se concentram grandemente neste tecido (por exemplo, expresso em m/m, o teor de mercúrio no cabelo é cerca de 300 vezes superior ao do sangue), torna-se mais fácil o processo de análise, nomeadamente dispensando o recurso a metodologias de tão grande sensibilidade ou a processos de pré-concentração (Kubová *et al.*, 1997).

Por outro lado, os argumentos daqueles que desaprovam o recurso à análise do cabelo para inferir acerca do estado de saúde/doença do organismo assentam essencialmente na dificuldade em estabelecer “valores de referência”, devido à discrepância de valores encontrados na literatura para alguns elementos. Esta discrepância advém, em primeiro lugar, da dificuldade em excluir o efeito da contaminação exógena (por exemplo, devido à utilização de produtos de cosmética capilar) e da não utilização de procedimentos padronizados para a colheita e para a preparação das amostras. Outros factores, tais como, as características morfológicas do cabelo, o sexo, a raça, a faixa etária, os hábitos alimentares ou a localização geográfica do indivíduo também terão a sua influência nos valores encontrados (Pozebon *et al.*, 1999), embora nestes aspectos a semelhança com o que se verifica na análise do sangue e da urina já seja maior.

Atendendo às vantagens apresentadas, a comunidade científica tem concentrado esforços no sentido de aumentar a fiabilidade da análise do cabelo, procurando contornar as limitações acima referidas. Assim, podem encontrar-se vários trabalhos

que descrevem exaustivamente diferentes procedimentos de colheita e de preparação das amostras de modo a possibilitar a padronização destas acções (Borella *et al.*, 1996; Dombovari e Papp, 1998; Morton *et al.*, 2002), enquanto outros apresentam uma compilação dos teores descritos para os diferentes elementos numa determinada área geográfica, de modo a que se possa definir o intervalo de valores considerados “normais” nessa região (Carneiro *et al.*, 2002; Nowak, 1998; Senofonte *et al.*, 1989; Senofonte *et al.*, 2000). Em resultado destes esforços, actualmente já é possível relacionar a concentração de vários elementos no cabelo com certos estados fisiológicos/patológicos ou com a exposição a determinados factores como, por exemplo, contaminantes ambientais (Cizdziel e Gerstenberger, 2004; Fido *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2004; Kubová *et al.*, 1997; Lech, 2001a; Lech, 2001b; Lech, 2002; Leung *et al.*, 1999; MacPherson *et al.*, 1995; MacPherson e Bacso, 2000; Ng, 1999; Pereira *et al.*, 2004; Shamberger, 2003; Suzuki *et al.*, 1992; Wojciak e Krejpcio, 2002; Wojciak *et al.*, 2004).

Inicialmente, recorria-se à análise do cabelo essencialmente para determinar elementos vestigiais tóxicos (Pb, Hg, As, Ni, Cd, Sb). Posteriormente, a avaliação do teor de elementos maioritários como, por exemplo, o Ca e o Mg, começou também a despertar interesse. Deste modo, actualmente é bem conhecida a relação existente entre o teor de Ca e de Mg no cabelo e: i) diversos estados patológicos — por exemplo, cancro da mama, doença coronária, fibromialgia, autismo, paralisia cerebral e alterações neurológicas e osteomusculoarticulares (Fido *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2004; Lech, 2001a; Lech, 2001b; Lech, 2002; MacPherson *et al.*, 1995; MacPherson e Bacso, 2000; Ng, 1999; Wojciak e Krejpcio, 2002); ii) diversos estados fisiológicos — por exemplo, síndrome pré-menstrual e gravidez (Leung *et al.*, 1999; Shamberger, 2003); e iii) a utilização de determinados fármacos — por exemplo, anticonvulsivantes (Suzuki *et al.*, 1992).

Muito embora após se ter efectuado a digestão de uma amostra de cabelo seja possível obter desde logo uma solução onde o elemento a determinar apresente uma

concentração adequada à análise instrumental posterior (diluindo o digesto a um volume final adequado), para efectuar uma análise multi-elementar, incluindo a análise de elementos vestigiais e maioritários na mesma amostra, o mais indicado é obter uma solução onde a concentração dos elementos vestigiais se encontre na gama dos $\mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração dos elementos maioritários esteja na gama dos mg L^{-1} . Desse modo, é possível analisar os elementos minoritários, por exemplo, por espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica ou por ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*); e os elementos maioritários, nomeadamente o Ca e o Mg, por ICP-AES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*), por fluorescência de raios-X ou por EAA/chama, entre outras.

4.1.2.2 Determinação Na em amostras de urina

A análise de amostras de urina é uma das mais habituais tarefas nos laboratórios de Química Clínica, sendo diversos os analitos pesquisados ou quantificados. A determinação de Na é exemplo de uma das determinações mais correntemente efectuadas. Essencialmente, é efectuada com o objectivo de avaliar o estado de hidratação do organismo e o estado de funcionamento do rim, através da excreção de Na (Silberberg, 2006).

A aldosterona, uma hormona produzida pelas glândulas supra-renais, desempenha um papel de grande importância na regulação da concentração de Na no organismo e na urina. Mais concretamente, a aldosterona aumenta a reabsorção de Na, de cloro e de água nos rins promovendo, em contrapartida, a excreção de potássio e de iões hidrogénio na urina. Assim, a reabsorção de Na ajuda a manter o nível de hidratação dos tecidos do organismo e a controlar a pressão sanguínea. Por exemplo, em caso de desidratação e/ou de patologias que conduzam a uma diminuição do fluxo sanguíneo no rim, a produção de aldosterona é estimulada, e esta, por sua vez, promove a

reabsorção de NaCl e água ao nível do rim, diminuindo a concentração de sódio na urina.

Uma diminuição da concentração de sódio na urina pode estar associada a diversas patologias, como, por exemplo, aldosteronismo, insuficiência cardíaca congestiva ou insuficiência renal. Por outro lado, um aumento da sua concentração pode indicar, por exemplo, um aporte dietético excessivo (Silberberg, 2006).

4.2. Experimental

4.2.1. Instrumentação

Como já se referiu atrás, as técnicas de espectrofotometria atômica utilizadas neste trabalho foram a EAA/chama (determinação de Ca e de Mg em amostras de digestos de cabelo) e a FC (determinação de Na em amostras de urina).

Para as determinações por EAA/chama utilizou-se um espectrofotómetro com uma câmara de nebulização com *flow spoiler*, da marca PerkinElmer®, modelo 5000. Na fase dos estudos preliminares utilizou-se ainda um espectrofotómetro com uma câmara de nebulização com esfera de impacto, da marca Pye Unicam, modelo SP9. Em ambos os casos, a chama era de ar/acetileno. Como fonte de radiação utilizaram-se lâmpadas de cátodo oco da marca Cathodeon Ltd.

Para as determinações por FC utilizou-se um equipamento da marca Buck Scientific, modelo PFP-7. A chama neste caso era de ar/butano.

A todos os equipamentos foi acoplado um registador da marca Metrohm AG, modelo E 586 Labograph, que assegurava o registo gráfico do sinal analítico.

Na construção dos sistemas de fluxo apresentados na Figura 4.1 foram utilizados os seguintes dispositivos: micro-bombas solenóides da marca Bio-Chem™ Valve Inc., modelos 090SP e 120SP, que debitavam um volume fixo de 3 µL, 5 µL, 8 µL, 25 µL ou

50 µL em cada pulso; bomba peristáltica da marca Gilson®, modelo Minipuls™ 2; válvulas solenóides de 3-vias NResearch® Inc., modelo 161T031; uma válvula solenóide do tipo “pinch” da marca NResearch Inc., modelo 161P011; tubo de impulsão, da marca Gilson, com um diâmetro interno de 1,65 mm; tubos de Teflon®, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm; ligadores e confluências em “V”, em “Y” e em “duplo-Y”, de construção laboratorial.

O controlo dos sistemas de fluxo, bem como a aquisição e o processamento dos dados, foi efectuado por intermédio de um computador pessoal, equipado com uma interface activa da marca Advantech®, modelo PC-LABCard™ PCL-711B. As micro-bombas solenóides eram comandadas usando um circuito de potência baseado num circuito CoolDrive™, comercializado pela NResearch® Inc.

No procedimento de lavagem das amostras de cabelo utilizou-se um agitador da marca GFL®, modelo 3005, tendo a secagem das amostras sido efectuada numa estufa da marca J.P. Selecta, programada para uma temperatura de 105 °C.

As digestões por via húmida foram efectuadas num forno de microondas da marca Milestone, modelo MLS-1200 Mega, equipado com um rotor do tipo HPR-1000/10 S.

4.2.2. Material e Reagentes

Na preparação de todas as soluções utilizou-se sempre água ultrapura.

Com excepção do HNO₃ e do HCl que eram de qualidade *Suprapur*® (Merck) ou equivalente, todos os reagentes eram de qualidade *GR for analysis* (Merck) ou equivalente.

Na preparação de todas as soluções de HNO₃ diluídas utilizou-se uma solução de HNO₃ 65% (m/m). Na preparação de todas as soluções de HCl diluídas utilizou-se uma solução de HCl 30% (m/m). Ambas as soluções concentradas eram comercializadas pela Merck.

Nas determinações por EAA/chama, as soluções de calibração foram preparadas por diluição adequada de soluções padrão comerciais de Ca e de Mg com uma concentração de 1000 mg L⁻¹ (CertiPUR® da marca Merck e Spectrosol® da marca BDH, respectivamente) com uma solução de HNO₃ 0,2% (v/v).

A solução padrão-mãe do “agente libertador” (solução de La 1000 mg L⁻¹) foi preparada por dissolução de óxido de lantânio (Sigma-Aldrich) em HCl (concentração final: La₂O₃ 0,12% m/v e HCl 0,6% v/v).

Para as determinações por FC preparou-se uma solução padrão-mãe de Na com uma concentração de 100 g L⁻¹ dissolvendo uma massa adequada de NaCl, da marca Panreac, em HNO₃ 0,2% (v/v). As soluções de calibração eram preparadas por diluição adequada desta solução padrão-mãe.

As amostras de cabelo foram lavadas com uma solução de Triton® X-100 1% (v/v) (Merck). Na digestão das amostras de cabelo utilizou-se uma solução de HNO₃ 65% (m/m) (Merck) e uma solução de H₂O₂ 30% (m/m) (Riedel-de-Häen).

Para avaliar a exactidão das metodologias analíticas desenvolvidas utilizaram-se amostras de referência certificadas de cabelo (IAEA-086, Btl n.º 81, fornecida pela *International Atomic Energy Agency*) e de urina (*Seronorm™ Trace Elements Urine*, lote NO2525, comercializada pela Sero AS).

4.2.3. Preparação das amostras

4.2.3.1 Amostras de cabelo

As amostras de cabelo foram submetidas a uma lavagem prévia por agitação mecânica com uma solução de Triton® X-100 1% (v/v) durante cerca de 30 minutos. Após eliminação do detergente, por lavagem abundante com água ultrapura, deixaram-se as amostras a secar na estufa, a 105 °C, durante a noite.

Para a digestão por via húmida das amostras de cabelo, colocou-se uma massa de amostra de cerca de 0,25 g nos vasos de digestão do forno de microondas e

adicionaram-se 3 mL de HNO_3 65% (m/m) e 1 mL de H_2O_2 30% (m/m). O programa do forno de microondas seleccionado foi o recomendado pelo fabricante para a digestão de amostras orgânicas com potencial para uma reacção exotérmica inicial rápida, e era constituído por cinco etapas: 1 min a 250 W; 2 min a 0 W; 5 min a 250 W; 5 min a 400 W e 5 min a 600 W. Após arrefecimento dos digestos, o volume era completado até 15 mL com água ultrapura. Em cada um dos ciclos de digestão efectuados, um vaso era destinado a conter a amostra de referência certificada e outro a constituir o “branco das amostras” (i.e., o “branco do procedimento de digestão”).

Para a determinação de Ca e de Mg pelo procedimento manual, realizada para efeitos de comparação com os resultados obtidos utilizando o sistema de fluxo desenvolvido, os digestos de amostras de cabelo foram diluídos (1+14) com água ultrapura.

4.2.3.1 Amostras de urina

As amostras de urina foram colhidas em recipientes de polietileno adequadamente descontaminados por lavagem ácida. Depois foram acidificadas com HNO_3 até um valor de pH inferior a 2 e refrigeradas a cerca de 5 °C até à sua análise. Algumas amostras foram dopadas com uma solução concentrada de Na.

Antes da análise, as amostras eram vigorosamente agitadas e centrifugadas a 4000 g durante 5 minutos.

Para a determinação de Na pelo procedimento manual, realizada para efeitos de comparação com os resultados obtidos utilizando o sistema de fluxo desenvolvido, as amostras de urina foram diluídas (1+199) com água ultrapura.

4.2.4. Sistemas de fluxo

4.2.4.1 Determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo

O sistema de fluxo utilizado para efectuar a determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo encontra-se representado na Figura 4.1-G.

O ciclo analítico iniciava-se com a lavagem do canal da amostra. Para este propósito, 60 μL de amostra A (i.e., 20 pulsos de 3 μL) eram introduzidos no sistema de fluxo por activação da mBS B₁, a uma frequência de 300 pulsos min^{-1} (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,2 s), seguindo-se um período de tempo de 10 s durante o qual apenas funcionava a bomba peristáltica BP. De seguida, eram introduzidos 24 μL de amostra A (8 pulsos x 3 μL) e 400 μL de solução de La (8 pulsos x 50 μL) por activação simultânea da mBS B₁ e da mBS B₂, ambas a funcionar a uma frequência de 100 pulsos min^{-1} (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,6 s). A mistura da amostra com a solução de La iniciava-se no ponto de confluência X e continuava ao longo do reactor R, de 180 cm de comprimento, até ao detector. Durante todo o ciclo analítico, a bomba peristáltica BP introduzia continuamente água ultrapura através do ponto de confluência X, a um caudal de 5 mL min^{-1} . O caudal de aspiração do nebulizador do espectrofotómetro estava regulado para 4 mL min^{-1} .

4.2.4.2 Determinação de Na em amostras de urina

O sistema de fluxo utilizado para efectuar a determinação de Na em amostras de urina encontra-se representado na Figura 4.1-E.

Neste caso, o ciclo analítico iniciava-se também com a lavagem do canal da amostra através da introdução no sistema de fluxo de 60 μL de amostra A (i.e., 20 pulsos de 3 μL) por activação simultânea da mBS B₁, a uma frequência de 300 pulsos min^{-1} (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,2 s), e da válvula solenóide do tipo “pinch” VS_P. Seguiu-se a introdução de 2,5 mL (50 pulsos de 50 μL cada), de transportador T (água ultrapura), a uma frequência de 300 pulsos min^{-1} , por

activação da mBS B₂. Por fim, eram introduzidos 24 µL de amostra (8 pulsos x 3 µL) por activação simultânea da mBS B₁, a funcionar a uma frequência de 100 pulsos min⁻¹, e da válvula solenóide do tipo “pinch” VS_P.

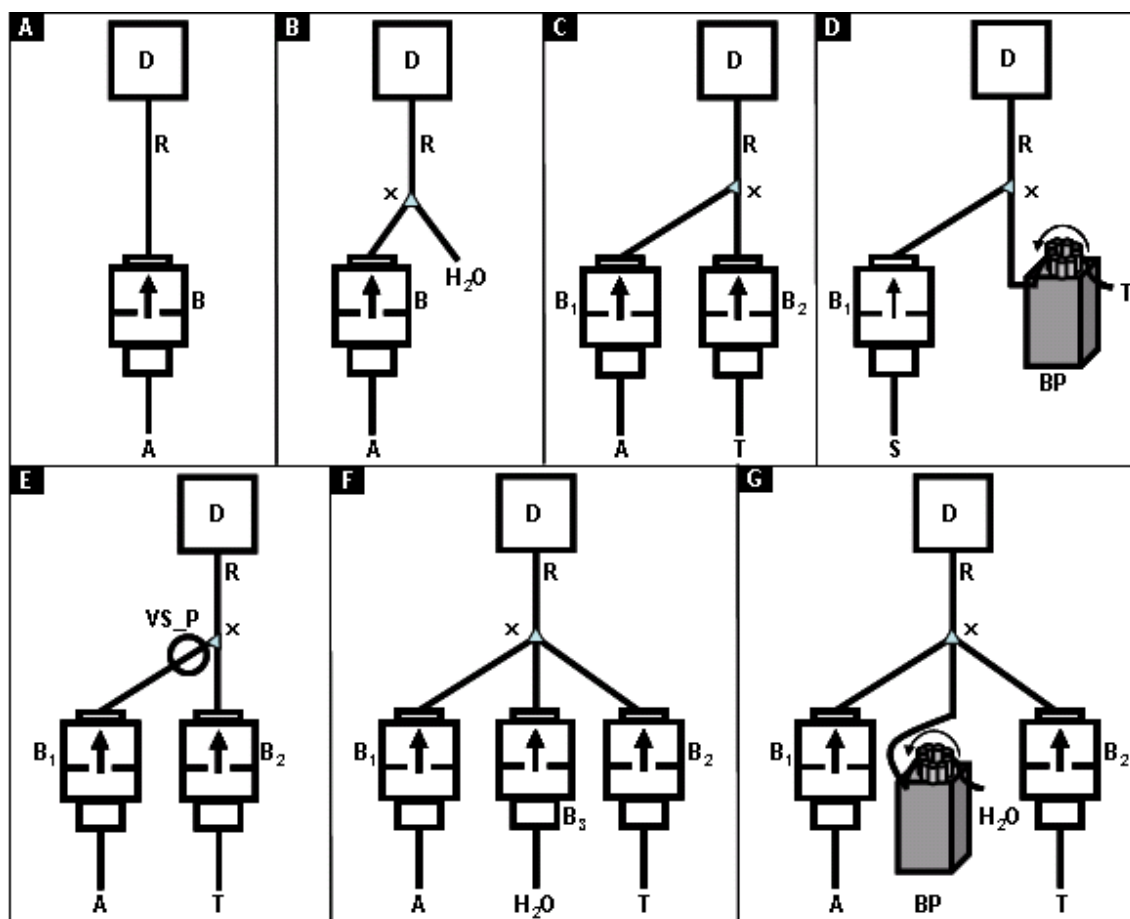


Figura 4.1 (A - G)

Representação esquemática dos diferentes sistemas de fluxo estudados. Legenda - T: transportador - água ou solução de La na configuração C, dependendo das experiências efectuadas (ver texto); água nas configurações D e E; solução de La nas configurações F e G; D: detector; B, B₁, B₂ e B₃: micro-bombas solenóides; VS_P: válvula solenóide do tipo “pinch”; R: reactores; A: amostra; BP: bomba peristáltica; H₂O: água ultrapura; X: ponto de confluência.

Durante todo o ciclo analítico a mBS B₂ introduzia continuamente o transportador T (água ultrapura) a uma frequência de 200 pulsos min⁻¹ (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,3 s), excepto durante o período de tempo que coincidia com a introdução da amostra, em que a mBS B₂ funcionava a uma frequência de pulso igual

à da mBS B₁ (100 pulsos min⁻¹). A diluição da amostra A no transportador T (água ultrapura) iniciava-se no ponto de confluência X (mBS B₁ e mBS B₂ apresentavam volumes internos de 3 µL e de 50 µL, respectivamente), e continuava ao longo do reactor R de 180 cm de comprimento, por dispersão da amostra A no transportador T, à medida que se deslocavam em direcção ao detector. O caudal de aspiração do nebulizador do espectrofotómetro estava regulado para 4 mL min⁻¹.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Estudos preliminares

De modo a melhor se perceber o comportamento dos SFMI, i.e., sistemas de fluxo incorporando micro-bombas solenóides, quando acoplados a equipamento de espectrofotometria atómica, foram efectuados vários estudos prévios, os quais se descrevem seguidamente.

4.3.1.1 Introdução contínua de amostra

Os sistemas de fluxo representados na Figura 4.1, A e B, foram acoplados a um espectrofotómetro que possuía uma câmara de nebulização com *flow spoiler*, a um espectrofotómetro com câmara de nebulização com esfera de impacto e a um fotómetro de chama. Foram estudados os seguintes parâmetros: comprimento do reactor R (entre 10 e 90 cm), volume interno da mBS B (entre 8 e 25 µL) e sua frequência de pulso (entre 24 e 300 pulsos min⁻¹, i.e., intervalos de tempo entre cada pulso entre 2,5 e 0,2 s). Para cada combinação destas condições experimentais, avaliou-se o sinal obtido com uma solução padrão de Ca de 2,5 mg L⁻¹ (contendo La na concentração de 10 mg L⁻¹), no caso das determinações por EAA/Chama; e com uma solução padrão de Na de 3 mg L⁻¹, no caso das determinações por FC. Esta

avaliação incidu particularmente na magnitude, na precisão e no perfil do sinal analítico obtido para cada caso, por comparação dos sinais entre si.

Em todos os casos avaliou-se também o caudal debitado pelas diferentes mBS utilizadas. Verificou-se que, sempre que as mBS eram programadas para debitar um caudal inferior ao caudal de aspiração do nebulizador do equipamento utilizado, o caudal efectivamente debitado pelas mBS era superior ao caudal esperado, ou seja, ao caudal teoricamente previsto. Esta situação resultava da livre aspiração de solução por parte do nebulizador durante o período de tempo em que o diafragma da mBS estava aberto. Tal como já foi referido no Capítulo 2 desta dissertação, as mBS são internamente constituídas por um diafragma, um solenóide e uma mola, e o seu funcionamento baseia-se no deslocamento do diafragma por acção da mola, “activada” pelo solenóide. Na posição de repouso, o diafragma encontra-se fechado por acção da mola. Ao aplicar um potencial eléctrico ao solenóide produz-se um campo magnético que fornece energia à mola, a qual se “contrai” provocando a abertura do diafragma e originando a entrada de líquido na câmara da mBS. De facto, era durante esse pequeno período de tempo que se verificava a livre aspiração da solução por acção do nebulizador. A diferença entre o caudal esperado e o caudal efectivamente debitado pelas mBS aumentava com o aumento da diferença entre o caudal resultante do efeito de aspiração natural do nebulizador e o caudal teoricamente esperado devido à actuação das mBS. Este controlo exercido pelo equipamento de EA sobre o caudal debitado pelas mBS não se verificava no sistema de fluxo apresentado na Figura 4.1-B, em que existia um canal paralelo que permitia a compensação da diferença entre o caudal produzido pelas mBS e o caudal de aspiração do nebulizador, através da livre aspiração de água pelo ponto de confluência X.

No que respeita ao efeito do fluxo pulsado sobre o processo de nebulização/atomização, verificou-se que o mesmo era constante, na medida em que os sinais analíticos se mantiveram inalterados (em perfil e magnitude) durante todo o

período de tempo definido para a introdução contínua das soluções em estudo (Figuras 4.2 e 4.3). Também a repetição de uma dada determinação produzia um sinal analítico que não diferia do primeiro, desde que obtido nas mesmas condições. De facto, nas Figuras 4.2 e 4.3 pode constatar-se que o segundo sinal obtido é semelhante ao primeiro. A única diferença que se poderá encontrar entre ambos é no que respeita ao comprimento da “plataforma” (*plateau*) e é devida ao facto de se terem utilizado diferentes intervalos de tempo para a introdução contínua da solução.

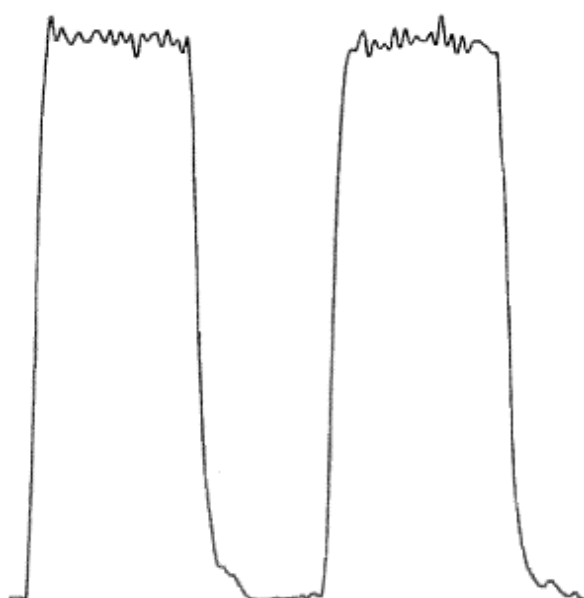


Figura 4.2

Sinais analíticos obtidos na introdução contínua de uma solução padrão de Ca ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$). Sistema de fluxo com um reactor de 90 cm e uma mBS de $50 \text{ }\mu\text{L}$ a funcionar a uma frequência de $150 \text{ pulsos min}^{-1}$ ($1 \text{ cm} = 3 \text{ s}$).

Quando se utilizavam mBS de maior volume interno, frequências de pulso mais baixas e/ou reactores de menor comprimento, o fluxo pulsado reflectia-se no traçado do sinal analítico, o qual passava a apresentar um perfil “serrilhado”, como se pode verificar na Figura 4.3.

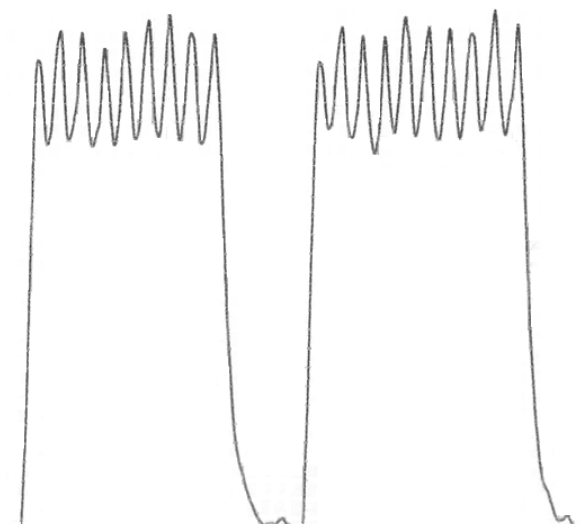


Figura 4.3

Sinais analíticos obtidos na introdução contínua de uma solução de calibração de Ca ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$). Sistema de fluxo com um reactor de 90 cm e uma mBS de 50 μL a funcionar a uma frequência de 100 pulsos min^{-1} (1 cm = 3 s).

4.3.1.2 Introdução de um segmento de amostra

O sistema de fluxo apresentado na Figura 4.1-C permitiu avaliar o efeito que a intercalação no transportador de segmentos de amostra de diferente volume, obtidos através da variação do número de pulsos debitados pela mBS B_1 , exercia no sinal analítico. Para tal, utilizaram-se as mesmas soluções padrão (colocadas no canal da amostra A) e os três equipamentos atrás descritos. Testaram-se mBS com diferente volume interno para introduzir a amostra A (B_1 : 8 e 25 μL) e o transportador T (B_2 : 25 e 50 μL); diferentes intervalos de tempo entre cada pulso (B_1 : 0,2 a 0,4 s e B_2 : 0,2 a 2,5 s); diferentes volumes de amostra A (B_1 : 2 a 40 pulsos); reactores R de diferente comprimento (90 e 180 cm); diferentes ângulos no ponto de confluência X (ver Figura 4.4); e diferentes estratégias de introdução da amostra (i.e., diferentes modos de intercalação da amostra no transportador): introdução de um segmento único de amostra, *merging zones* (i.e., introdução da amostra e do transportador em simultâneo) e amostragem binária (i.e., introdução intercalada da amostra e do transportador).



Figura 4.4

Representação esquemática dos diferentes ângulos testados no ponto de confluência X.

Quando se acoplou o sistema de fluxo em estudo (Figura 4.1-C) ao espectrofotómetro com câmara de nebulização com *flow spoiler* e ao fotómetro de chama obtiveram-se sinais analíticos muito reprodutíveis. Inclusivamente, era possível efectuar calibrações com base na variação do volume de amostra introduzido no sistema de fluxo, i.e., obtinha-se uma relação linear entre o sinal analítico obtido e o volume de amostra introduzido no sistema. Parecia, pois, que nestes dois equipamentos nem o fluxo pulsado interferia com o processo de nebulização/atomização, nem o caudal de aspiração do nebulizador afectava o volume debitado pelas mBS ou, se o faziam, estes efeitos eram constantes, não prejudicando a precisão analítica. A reprodutibilidade dos sinais analíticos era significativamente menor quando se utilizava o espectrofotómetro com uma câmara de nebulização com esfera de impacto, pelo que não se efectuaram mais estudos com este equipamento.

Também foi possível verificar que: i) os ângulos de confluência da amostra com o transportador; ii) os intervalos de tempo entre cada pulso definidos para a mBS B₁ (amostra); e iii) as estratégias seleccionadas para introduzir a amostra no sistema de fluxo, que foram testados, não afectavam de modo significativo o sinal analítico. Contudo, no caso da introdução de um segmento único de amostra notou-se, por vezes, uma ligeira diminuição da precisão do sinal analítico, quando comparada com a precisão obtida com a amostragem binária ou com a amostragem por *merging zones*, o que poderá estar relacionado com o facto de, nestes dois últimos casos, ocorrer uma melhor mistura da amostra com o transportador.

A utilização de maiores intervalos de tempo entre cada pulso, ou seja, de menores frequências de pulso, na mBS B₂, responsável pela introdução do transportador T

(água ultrapura) no sistema de fluxo, resultava no aumento da dispersão da amostra A no transportador T e, conseqüentemente, em sinais analíticos menores, sem afectar a precisão.

Tal como referido anteriormente para a introdução contínua de amostra, também neste caso (intercalação da amostra no transportador), quando se utilizavam mBS de maior volume interno, frequências de pulso mais baixas e/ou reactores de menor comprimento, o efeito do fluxo pulsado era evidente no traçado do sinal analítico, que passava a apresentar um perfil serrilhado (Figura 4.5).

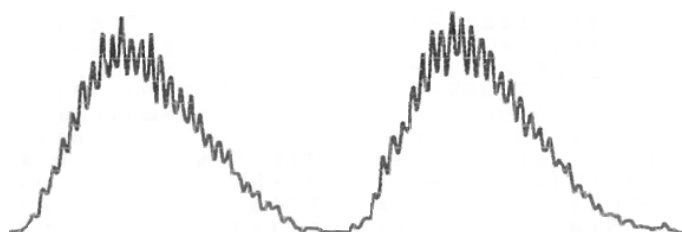


Figura 4.5

Sinais analíticos obtidos na introdução de um segmento único (10 pulsos) de uma solução padrão de Ca ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), propulsionada com água em direcção ao detector, através de um reactor de 180 cm. Ambas as mBS eram de $25 \text{ }\mu\text{L}$ e funcionavam a uma frequência de $100 \text{ pulsos min}^{-1}$.

A precisão inerente às mBS na introdução de microvolumes de amostra e o facto de se poder seleccionar mBS com diferente volume interno (e, deste modo, controlar o volume debitado em cada pulso), tornam bastante atractiva a utilização destes dispositivos em sistemas de fluxo construídos para efectuar diluições em linha. As mBS são dispositivos capazes de, por si só, executarem, num sistema de fluxo, tarefas como comutação (pelo facto de se utilizar uma mBS para cada solução e de cada mBS se poder controlar de modo independente), introdução de soluções e a sua propulsão. Por isso, as mBS permitem a construção de sistemas de fluxo com uma configuração bastante simples (i.e., com pouca variedade de dispositivos) e, conseqüentemente, mais fiáveis e mais robustos. A diluição das amostras é frequentemente necessária quando se recorre ao tipo de equipamento em estudo

(equipamento de EA), não só para enquadrar a concentração do analito no intervalo de resposta instrumental linear, como também para minimizar efeitos de matriz, um problema comum na análise de amostras biológicas. Assim, partiu-se do sistema apresentado na Figura 4.1-C para avaliar se os SFMI se confirmavam como uma alternativa vantajosa relativamente a outros sistemas de fluxo já descritos na literatura para efectuar diluições em linha (Tyson, 1991). Para tal, utilizaram-se soluções padrão de Ca 100 mg L^{-1} , nas determinações por EAA/chama (câmara de nebulização com *flow spoiler*), e soluções padrão de Na 100 mg L^{-1} , nas determinações por FC; uma mBS B_1 de $3 \text{ }\mu\text{L/pulso}$ (i.e., $3 \text{ }\mu\text{L}$ de volume interno) e uma mBS B_2 de $50 \text{ }\mu\text{L/pulso}$. Testaram-se: i) diferentes intervalos de tempo entre cada pulso para cada uma das mBS (0,2 a 0,8 s); ii) diferentes volumes de amostra (3 a $30 \text{ }\mu\text{L}$); iii) diferentes comprimentos do reactor R (100 a 300 cm); e iv) diferentes estratégias para a introdução da amostra no sistema de fluxo (amostragem binária e amostragem por *merging zones*). Para todas as combinações estudadas os resultados apresentaram baixa precisão (CV entre 8,3% e 10,5%; $n = 10$). Efectuaram-se alterações na configuração do sistema da Figura 4.1-C, como, por exemplo, a substituição da confluência situada no ponto assinalado com um X por uma válvula solenóide de 3-vias, ou a inclusão de uma câmara de mistura, mas a imprecisão dos resultados manteve-se. Possivelmente esta imprecisão estaria relacionada com o “arrastamento” de volumes mortos de amostra pelo transportador propulsionado pela mBS B_2 . Este “arrastamento” é passível de ser justificado com base no próprio fundamento da multi-impulsão: o movimento caótico das soluções propulsionadas em todas as direcções. De facto, como já foi referido, no momento em que o solenóide é desactivado, a mBS propulsiona a solução que se encontra no interior da sua câmara, introduzindo-a no sistema de fluxo a uma velocidade instantânea muito elevada, velocidade essa que acaba por ser o factor responsável pelo movimento caótico da solução propulsionada, atrás referido. Assim, neste caso, em resultado da actuação da mBS B_2 , o movimento caótico do transportador favorecia a “lavagem” de volumes

mortos de amostra que eventualmente tivessem ficado retidos nalgum componente do sistema de fluxo (válvulas solenóides, confluências ou ligadores, por exemplo). Como se compreende, este efeito é mais evidente nos sistemas de fluxo utilizados para efectuar a diluição em linha de amostras muito concentradas, passando facilmente despercebido nos casos em que se utiliza um sistema deste tipo para, por exemplo, efectuar a pré-concentração das amostras.

As alterações que permitiram contornar a imprecisão dos resultados foram: i) a substituição da mBS B₂ por uma bomba peristáltica (Figura 4.1-D), a qual origina menos turbulência ao propulsionar o transportador, uma vez que produz um fluxo laminar: CV = 1,1%; n = 10; e ii) a introdução, entre a mBS B₁ e a confluência colocada no ponto X, de uma válvula solenóide do tipo “*pinch*” (Figura 4.1-E), a qual fechava quando a mBS B₂ era activada, impedindo a “lavagem do canal da amostra por arrastamento”: CV = 1,1%; n = 10. De notar que as configurações apresentadas na Figura 4.1-C e E conduziām à obtenção de sinais de magnitude superior, o que poderá estar relacionado com um aumento da eficiência da nebulização promovido pelo fluxo pulsado.

Em espectrofotometria atómica com atomização em chama, muitas vezes, para além de se efectuar uma diluição, também é necessário adicionar à amostra uma solução de um tampão de ionização ou de um “agente libertador” (por exemplo, a determinação de Ca por EAA/chama normalmente requer a adição de uma solução de La às amostras). A utilização das configurações apresentadas na Figura 4.1-C a E obrigaria a que aquelas soluções fossem simultaneamente o transportador, conduzindo a um gasto acrescido de reagentes. Assim, procedeu-se à utilização de uma confluência com um canal adicional (Figura 4.1-F), o que permitia que o transportador fosse diferente (água, neste caso), minimizando os gastos de reagentes e gerando efluentes menos prejudiciais para o meio ambiente.

Utilizou-se: i) uma mBS B₁ de 3 µL (amostra); ii) uma mBS B₂ de 50 µL (solução de La com uma concentração de 1000 mg L⁻¹); iii) uma mBS B₃ de 50 µL (transportador;

água, neste caso); e iv) um reactor R de 180 cm de comprimento. Recorrendo à amostragem por *merging zones*, introduziam-se no sistema de fluxo 8 pulsos de amostra com 8 pulsos de solução de La, através da activação simultânea da mBS B₁ e da mBS B₂ a funcionarem com um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,6 s. De seguida activava-se a mBS B₃ (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,3 s) e encaminhava-se a mistura para o detector D (espectrofotómetro com câmara de nebulização com *flow spoiler*). Avaliou-se a linearidade e a precisão da resposta obtida para a introdução repetida (n = 10) de soluções de calibração de Ca com concentração variável entre 5 e 50 mg L⁻¹. Obteve-se uma curva de calibração com a equação $S = 0,2971 C + 0,2006$ (r = 0,9999; 4 pontos de calibração), em que S representa a altura do sinal analítico em *unidades*, em que 1 *unidade* corresponde a uma quadrícula do papel de registo e é equivalente a 2,5 mm, e C representa a concentração de Ca (em mg L⁻¹). Os valores de CV obtidos variavam entre 5,4% (para a solução de 5 mg L⁻¹) e 10,6% (para a solução de 50 mg L⁻¹). A precisão foi melhorada com a substituição da mBS B₂, responsável pela introdução do transportador, por uma bomba peristáltica BP (Figura 4.1-G). Esta alteração resultou numa curva de calibração com a equação $S = 0,1342 C + 0,2579$ (r = 0,9999; 4 pontos de calibração), com valores de CV variáveis entre 1,3% (para a solução de 5 mg L⁻¹) e 2,9% (para a solução de 50 mg L⁻¹). Os valores do CV aumentavam à medida que aumentava a concentração da solução de Ca, parecendo confirmar a ocorrência de “arrastamento” de eventuais volumes mortos no sistema, efeito tanto mais evidente quanto maior a concentração da amostra. Tal como já tinha sido referido para as configurações apresentadas na Figura 4.1, C e E, a configuração F, constituída apenas por mBS, permitia também maior sensibilidade analítica.

4.3.2. Aplicações analíticas

Para demonstrar a aplicabilidade dos SFMI desenvolvidos e também para se poder caracterizar o seu desempenho em termos de precisão e exactidão analíticas, procedeu-se à determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo por EAA/chama (câmara de nebulização com *flow spoiler*) e de Na em amostras de urina por FC.

4.3.2.1 Determinação de Ca e de Mg em digestos de amostras de cabelo

Como já foi referido, a concentração de Ca e de Mg nos digestos de amostras de cabelo pode ser ajustada controlando a massa de amostra que é digerida e/ou o volume final de solução preparada. No entanto, como nos digestos de cabelo habitualmente se pretende determinar também elementos vestigiais, é aconselhável obter soluções mais concentradas e proceder depois à diluição posterior de uma alíquota para determinar os elementos maioritários.

Das configurações estudadas, as apresentadas na Figura 4.1-F e G eram as que melhor se poderiam aplicar na determinação de Ca e de Mg nos digestos de cabelo pois, para além de permitirem efectuar a diluição das amostras, permitiriam também a adição em linha da solução do “agente libertador” (solução de La). Como já foi referido, com a configuração apresentada na Figura 4.1-F (constituída apenas por mBS) a precisão dos resultados obtidos era menor, pelo que se optou por utilizar a configuração apresentada na Figura 4.1-G. Optimizaram-se algumas variáveis do sistema de fluxo no sentido de melhorar o seu desempenho, nomeadamente em termos de precisão, exactidão e rendimento analítico. As variáveis estudadas foram: i) o comprimento do reactor R; ii) o volume e o caudal da amostra A e do transportador T (solução de La); iii) a concentração da solução de La e iv) o caudal debitado pela bomba peristáltica BP.

Estudaram-se reactores de 110, 150, 180 e 230 cm de comprimento. Para cada um deles, testaram-se diferentes volumes de amostra (6 e 8 pulsos de 3 μL - mBS B₁) e de solução de La (6 e 8 pulsos de 50 μL - mBS B₂), introduzidos no sistema de fluxo por *merging zones* (i.e., simultaneamente). Para todas as combinações testadas, a precisão do sinal analítico não era afectada pelo número de pulsos debitados pela mBS B₁ e pela mBS B₂, e aumentava com o aumento do comprimento do reactor R, o que poderá estar relacionado com a diminuição da expressão do efeito de Venturi (característico do nebulizador do equipamento de EA) no funcionamento do sistema de fluxo.

Testaram-se diferentes intervalos de tempo entre cada pulso (0,2 a 0,8 s, equivalentes a frequências de pulso entre 300 a 75 pulsos min^{-1}) para as mBS B₁ e B₂, correspondendo, em termos práticos, a diferentes caudais de introdução da amostra e da solução de La no sistema de fluxo. Muito embora a precisão do sinal analítico, avaliada pelos valores de CV obtidos, não variasse de modo muito significativo (1,3% a 1,8%; n = 10), era superior para uma frequência de 100 pulsos min^{-1} (i.e., quando se utilizava um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,6 s), aumentando para as restantes frequências de pulso testadas (i.e., para intervalos de tempo entre cada pulso inferiores e superiores a 0,6 s). A magnitude dos sinais diminuía à medida que aumentava o intervalo de tempo entre cada pulso, ou seja, para menores frequências de pulso (i.e., quando se utilizavam caudais mais baixos na introdução das soluções no sistema). Estas variações da precisão e da sensibilidade para cada caso podem ser explicadas com base no caudal a que as soluções eram introduzidas no sistema. Ao aumentar a frequência de pulso (caudais superiores) diminui a precisão dos volumes dispensados pelas mBS devido ao aumento do efeito de contrapressão (do inglês, *backpressure*). Por outro lado, como se introduz no sistema o mesmo volume de solução num período de tempo mais curto, o movimento caótico da solução no interior do sistema de fluxo não tem tempo para ser “absorvido”, pelo que há prevalectimento do fluxo pulsado relativamente ao fluxo laminar, com a consequente

diminuição da dispersão axial da zona da amostra, de que resultam sinais de magnitude superior. Para frequências de pulso mais baixas, devido ao aumento do tempo entre cada pulso, aumenta a dispersão da amostra no transportador, resultando sinais menores. Além disso, como o efeito do fluxo laminar se sobrepõe ao do fluxo pulsado, a dispersão da amostra apresenta-se menos reprodutível, provocando a diminuição da precisão do sinal analítico.

Avaliaram-se mBS B₂ com diferente volume interno (5 a 50 µL). A magnitude dos sinais analíticos aumentava com a diminuição do volume interno da mBS B₂, mas a precisão diminuía (por exemplo, para uma mBS B₂ de 5 µL: magnitude do sinal = 17,67 cm e CV = 11,4%; para uma mBS B₂ de 50 µL: magnitude do sinal = 6,96 cm e CV = 1,0%; n = 10). Este aumento do sinal com a diminuição do volume interno da mBS B₂ deve estar relacionado com a diminuição do grau de diluição no ponto de confluência X. O aumento da reprodutibilidade com o aumento do volume interno da mBS B₂ poderá dever-se à obtenção de uma melhor relação entre concentração de Ca/concentração de La, por aumento do volume de solução de La que era introduzido no sistema.

Testaram-se soluções de La com uma concentração variável entre 10 e 1000 mg L⁻¹. Para cada solução de La, obteve-se uma curva com 4 pontos de calibração no intervalo de concentração de Ca entre 5 e 50 mg L⁻¹. O CV médio, obtido através do cálculo da média aritmética dos valores de CV de cada uma das quatro soluções de calibração de Ca (n = 5 determinações), aumentava à medida que diminuía a concentração da solução de La (1000 mg L⁻¹: CV médio = 0,94%; 10 mg L⁻¹: CV médio = 3,3%). O coeficiente de correlação (r) de cada uma das curvas de calibração diminuía com a diminuição da concentração de La (1000 mg L⁻¹: r = 0,9996; 10 mg L⁻¹: r = 0,9978).

Avaliou-se o efeito que o caudal do transportador T, propulsionado pela bomba peristáltica BP, exercia no sinal analítico (magnitude e precisão). No intervalo de 2 a 5 mL min⁻¹, a magnitude do sinal analítico aumentava com a diminuição do caudal, o

que estará relacionado com uma menor diluição da amostra A no transportador T, devido à diminuição do caudal deste último. Os valores de CV obtidos a partir da determinação sucessiva ($n = 10$) de uma solução padrão de Ca de 5 mg L^{-1} e de outra de 50 mg L^{-1} variaram entre 2,2% e 4,6% e entre 0,85% e 2,9%, respectivamente, aumentando à medida que diminuía o caudal debitado pela bomba peristáltica, o que poderá estar relacionado com o aumento da diferença entre o caudal total do sistema de fluxo relativamente ao caudal de aspiração do nebulizador.

Recorrendo a uma amostra de referência certificada avaliou-se o efeito que o volume de amostra introduzido no sistema de fluxo (i.e., o número de pulsos de amostra) exercia sobre a exactidão dos resultados. Assim, recorrendo a soluções de calibração de Ca com concentração variável entre 5 e 100 mg L^{-1} , e iniciando com a introdução de $n = 2$ pulsos de $3 \text{ }\mu\text{L}$ de cada uma das soluções, obteve-se uma curva de calibração na qual se interpolava o valor do sinal obtido para a amostra de referência certificada, analisada do mesmo modo. Este procedimento repetiu-se depois para $n+1$ pulsos de amostra e assim sucessivamente até ao número de pulsos máximo testado: 10 pulsos. Verificou-se que, embora o coeficiente de correlação das rectas de calibração fosse diminuindo à medida que aumentava o número de pulsos de amostra introduzidos no sistema (2 pulsos: $r = 0,9996$; 10 pulsos: $r = 0,9983$), apenas se obtinham valores exactos, ou seja, dentro do intervalo certificado, para $n \geq 8$ pulsos de amostra (i.e., volume de amostra $\geq 24 \text{ }\mu\text{L}$).

Após se ter fixado em 8 o número de pulsos de amostra que era necessário introduzir no sistema de fluxo para se obterem resultados exactos com a mBS B_1 com um volume interno de $3 \text{ }\mu\text{L}$, correspondendo a um volume de amostra de $24 \text{ }\mu\text{L}$, testou-se uma mBS B_1 de maior volume interno ($5 \text{ }\mu\text{L}$) de modo a avaliar se era possível reduzir o tempo gasto na introdução da amostra, sem prejuízo do desempenho analítico do sistema de fluxo. Verificou-se que a introdução de 5 pulsos de amostra (5 pulsos $\times$ $5 \text{ }\mu\text{L} = 25 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra) resultava na diminuição da precisão e da exactidão dos

resultados. Este efeito poderá estar relacionado com possíveis desvios do volume dispensado relativamente ao volume interno da mBS. Efectivamente, uma vez que, para igual volume total de amostra, uma mBS B₁ de 5 µL introduz no sistema um menor número de pulsos, esses desvios em cada pulso produzirão um efeito global superior na precisão analítica.

Os parâmetros experimentais fixados durante a optimização da determinação de Ca nos digestos de amostras de cabelo foram depois reavaliados na determinação de Mg. Não se verificaram diferenças significativas no conjunto de condições que representava a melhor solução de compromisso entre precisão, exactidão e rendimento analítico. Assim, utilizou-se um sistema de igual configuração na determinação destes dois elementos: i) reactor R de 180 cm; ii) 8 pulsos de amostra (mBS B₁ com um volume interno de 3 µL); iii) 8 pulsos da solução de La com uma concentração de 1000 mg L⁻¹ (mBS B₂ com um volume interno de 50 µL); iv) introdução da amostra por *merging zones*; v) intervalo de tempo entre cada pulso de 0,6 s (i.e., 100 pulsos min⁻¹) para ambas mBS; e vi) caudal debitado pela bomba peristáltica BP de 5 mL min⁻¹.

Verificou-se que o sinal obtido na análise do “branco da amostra” não diferia do ruído instrumental, indicando que a digestão da amostra por via húmida, além de ser um procedimento rápido e simples, não constituía um factor de variabilidade analítica apreciável.

O sistema de fluxo proposto permitiu obter resultados precisos, apresentando valores de CV (n = 10) sempre inferiores a 2,0% (Ca e Mg), e um bom rendimento analítico (106 determinações hora⁻¹), num intervalo de concentrações com resposta instrumental linear adequado às determinações em causa (Figuras 4.6 e 4.7).

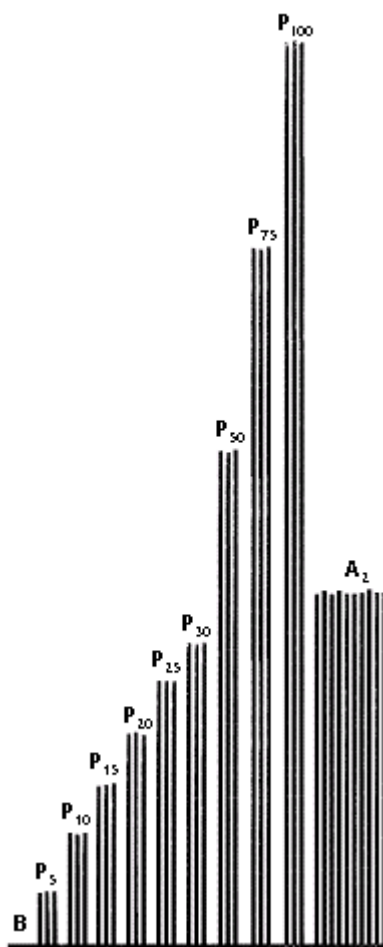


Figura 4.6

Registo gráfico correspondente à obtenção de uma curva de calibração para a determinação de Ca em digestos de amostras de cabelo por EAA/chama e avaliação da precisão analítica (amostra A_2 : CV% = 0,84).

A avaliação da exactidão, feita através da análise de uma amostra de referência certificada e por comparação dos resultados obtidos na análise de digestos de amostras de cabelo ($n = 27$) utilizando o SFMI desenvolvido e o procedimento convencional (manual), mostrou que o sistema de fluxo proposto permite obter resultados exactos quando utilizado nestas aplicações analíticas, nas condições atrás descritas. Os resultados obtidos mostraram uma boa concordância entre os dois procedimentos, como se pode avaliar pelos valores do desvio relativo (entre -1,26% e +1,29% para as determinações de Ca; e entre -5,92% e +4,25% para as determinações de Mg) e também pelos parâmetros da equação de regressão linear - Ca: $C_p = 0,999 \times$

$C_m + 1,432$ ($r = 0,9998$) e Mg: $C_p = 0,999 \times C_m + 0,007$ ($r = 0,9992$), em que C_p representa o valor de concentração obtido pelo sistema de fluxo proposto e C_m o valor de concentração obtido pelo procedimento manual. A concordância entre os dois conjuntos de valores também foi demonstrada pelo teste t de Student emparelhado, em que o valor de t obtido (Ca: 0,51 e Mg: 0,14) era inferior ao valor de t crítico (2,06) para um nível de confiança de 95% e 26 graus de liberdade (Tabelas 4.1 a 4.3).

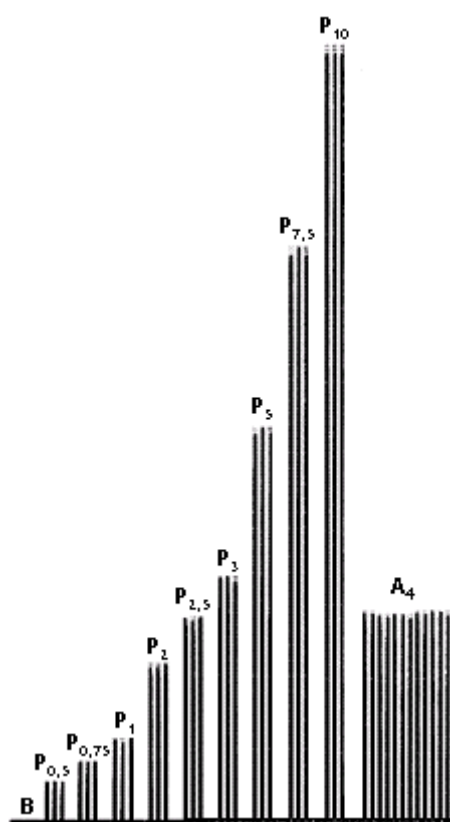


Figura 4.7

Registro gráfico correspondente ao traçado de uma curva de calibração na determinação de Mg em digestos de amostras de cabelo por EAA/chama e avaliação da precisão analítica, em termos de repetibilidade (amostra A_4 : CV% = 1,9).

4.3.2.2 Determinação de Na em amostras de urina

Como já anteriormente foi referido, os valores normais da concentração de sódio na urina variam significativamente com o estado de hidratação do organismo e com o

aporte dietético diário. De qualquer modo, é sempre necessário efectuar uma elevada diluição prévia da amostra para enquadrar a concentração do analito no intervalo de resposta linear do fotómetro de chama, um dos equipamentos utilizados nos laboratórios de análises clínicas para efectuar esta determinação. Para esta aplicação, e tendo em conta os resultados obtidos na optimização do sistema utilizado para a determinação de Ca e de Mg em digestos de cabelo, adaptou-se à configuração apresentada na Figura 4.1-E: i) um reactor R de 180 cm; ii) uma mBS B₂ de 50 µL para a introdução contínua do transportador/diluyente T (água); iii) uma mBS B₁ de 3 µL para a introdução de 8 pulsos de amostra; e iv) utilizou-se um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,6 s (100 pulsos min⁻¹) para as mBS B₁ e B₂ durante a fase de introdução da amostra, e de 0,3 s para a mBS B₂ durante todo o restante tempo do ciclo analítico. A amostra era introduzida no sistema recorrendo à estratégia de amostragem por *merging zones* (i.e., era efectuada a introdução simultânea da amostra e do transportador/diluyente).

Na figura 4.8 pode observar-se uma curva de calibração típica, obtida com o sistema de fluxo proposto, a operar nas condições atrás descritas. No entanto, e demonstrando a precisão do funcionamento deste sistema, construído apenas com base em mBS, também se verificou ser possível, nas mesmas condições, obter uma curva de calibração com base no volume de amostra introduzido no sistema (Figura 4.9). Isto demonstra que a válvula solenóide do tipo “*pinch*” impedia eficazmente o arrastamento de volumes mortos de amostra, assegurando a precisão analítica.

Com o sistema de fluxo proposto obteve-se um rendimento analítico de 105 determinações h⁻¹. Os resultados mostraram uma boa precisão, como indicam os valores do CV% obtido para 10 determinações consecutivas de três soluções padrão de Na: 1,6% (250 mg L⁻¹), 1,5% (1500 mg L⁻¹) e 0,51% (7500 mg L⁻¹). Também para esta aplicação analítica, a avaliação da exactidão, feita por comparação dos resultados obtidos na análise de amostras de urina (n = 18) utilizando o sistema de fluxo desenvolvido e o procedimento convencional (diluição manual) e através da análise

de uma amostra de referência certificada, mostrou que o sistema de fluxo desenvolvido permitia obter resultados exactos. De facto, verificou-se uma boa concordância entre os dois procedimentos, como indicam os valores do desvio relativo (entre -4,41% e +3,93%) e os parâmetros da equação de regressão linear $C_p = 1,002 \times C_m - 1,057$ ($r = 0,9997$), em que C_p representa o valor de concentração obtido pelo sistema de fluxo proposto e C_m o valor de concentração obtido pelo procedimento manual. A concordância entre os dois conjuntos de valores foi demonstrada ainda pelo teste de t de Student emparelhado, em que valor de t obtido (0,56) era inferior ao valor de t crítico (2,11), para um nível de confiança de 95 % e 17 graus de liberdade (Tabelas 4.2 a 4.4).

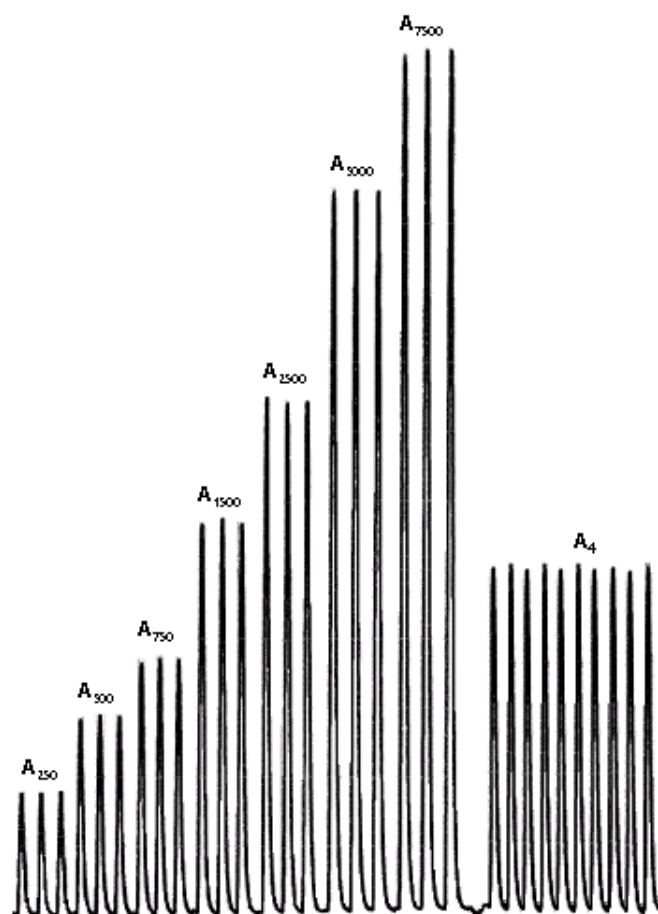


Figura 4.8

Registo gráfico correspondente ao traçado de uma curva de calibração obtida na determinação de Na em amostras de urina por FC e avaliação da precisão analítica, em termos de repetibilidade (amostra A_4 : CV% = 1,5).

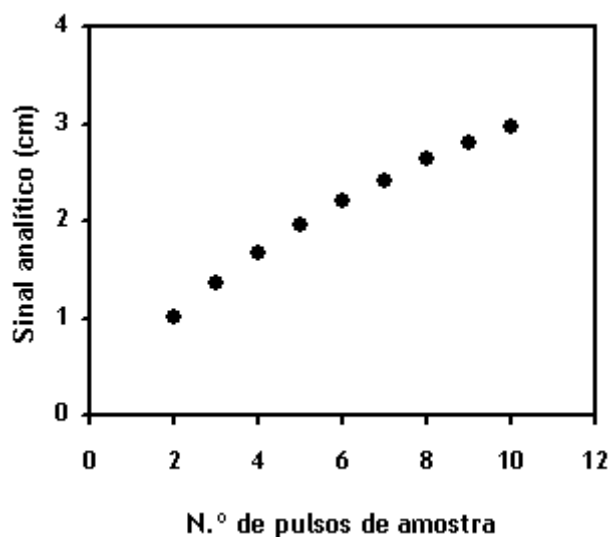


Figura 4.9

Variação da magnitude do sinal analítico em função do volume de amostra introduzido no sistema de fluxo. Estudo efectuado com uma solução padrão de Na de 2500 mg L^{-1} .

Tabela 4.1

Comparação dos resultados (mg/kg cabelo) obtidos na determinação de Ca e de Mg ($n = 27$) por EAA/chama com o sistema de fluxo proposto e pelo procedimento manual.

Amostra		Sistema de fluxo proposto (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio relativo ^b (%)
1	Ca	3998 ± 144	3947 ± 167	+1,28
	Mg	393 ± 12	388 ± 18	+1,22
2	Ca	2147 ± 122	2140 ± 135	+0,35
	Mg	120 ± 11	115 ± 16	+4,25
3	Ca	4852 ± 151	4805 ± 183	+0,99
	Mg	323 ± 11	318 ± 17	+1,70
4	Ca	3318 ± 147	3356 ± 166	-1,14
	Mg	181 ± 13	178 ± 20	+0,88
5	Ca	2663 ± 128	2681 ± 166	-0,66
	Mg	324 ± 12	319 ± 17	+1,50
6	Ca	3722 ± 133	3756 ± 155	-0,91
	Mg	684 ± 16	671 ± 20	+1,80
7	Ca	1051 ± 128	1042 ± 144	+0,90
	Mg	116 ± 12	115 ± 17	+0,34

Amostra		Sistema de fluxo proposto (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio relativo ^b (%)
8	Ca	1707 $\pm$ 136	1700 $\pm$ 151	+0,44
	Mg	138 $\pm$ 12	144 $\pm$ 18	-5,30
9	Ca	1130 $\pm$ 126	1142 $\pm$ 141	-1,09
	Mg	177 $\pm$ 11	173 $\pm$ 16	+1,87
10	Ca	907 $\pm$ 140	913 $\pm$ 159	-0,65
	Mg	116 $\pm$ 13	114 $\pm$ 18	+1,25
11	Ca	918 $\pm$ 159	907 $\pm$ 140	+1,29
	Mg	172 $\pm$ 12	175 $\pm$ 18	-2,04
12	Ca	4194 $\pm$ 148	4223 $\pm$ 174	-0,68
	Mg	381 $\pm$ 12	388 $\pm$ 18	-1,75
13	Ca	2278 $\pm$ 149	2252 $\pm$ 134	+1,13
	Mg	125 $\pm$ 13	120 $\pm$ 18	+4,09
14	Ca	5000 $\pm$ 168	5017 $\pm$ 199	-0,35
	Mg	315 $\pm$ 13	319 $\pm$ 19	-1,17
15	Ca	3407 $\pm$ 139	3440 $\pm$ 158	-0,95
	Mg	180 $\pm$ 12	188 $\pm$ 17	-4,21
16	Ca	2082 $\pm$ 139	2830 $\pm$ 155	-0,99
	Mg	324 $\pm$ 12	318 $\pm$ 18	+1,67
17	Ca	3690 $\pm$ 151	3710 $\pm$ 129	-0,55
	Mg	653 $\pm$ 15	668 $\pm$ 19	-2,31
18	Ca	1568 $\pm$ 125	1556 $\pm$ 113	+0,75
	Mg	141 $\pm$ 10	150 $\pm$ 15	-5,92
19	Ca	3565 $\pm$ 149	3553 $\pm$ 169	+0,35
	Mg	621 $\pm$ 16	619 $\pm$ 21	+0,36
20	Ca	4097 $\pm$ 142	4087 $\pm$ 167	+0,25
	Mg	410 $\pm$ 12	399 $\pm$ 17	+2,60
21	Ca	2219 $\pm$ 152	2219 $\pm$ 138	+0,03
	Mg	121 $\pm$ 13	121 $\pm$ 18	+0,35
22	Ca	1112 $\pm$ 135	1116 $\pm$ 152	-0,33
	Mg	176 $\pm$ 12	170 $\pm$ 17	+3,18
23	Ca	842 $\pm$ 119	849 $\pm$ 134	-0,79
	Mg	100 $\pm$ 11	102 $\pm$ 15	-1,35

Amostra		Sistema de fluxo proposto (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio relativo ^b (%)
24	Ca	2312 $\pm$ 138	2307 $\pm$ 153	+0,22
	Mg	126 $\pm$ 13	131 $\pm$ 18	-3,46
25	Ca	1121 $\pm$ 152	1122 $\pm$ 136	-0,07
	Mg	171 $\pm$ 12	176 $\pm$ 18	-3,10
26	Ca	3623 $\pm$ 132	3645 $\pm$ 154	-0,61
	Mg	512 $\pm$ 13	526 $\pm$ 19	-2,76
27	Ca	2384 $\pm$ 131	2375 $\pm$ 117	+0,39
	Mg	334 $\pm$ 11	326 $\pm$ 15	+2,33

^a A “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de três determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão calculado de acordo com o descrito no Capítulo 2.

^b O cálculo do desvio relativo foi feito com base na expressão $[(C_p - C_m)/C_m] \times 100$, em que C_p representa o valor de concentração obtido com o sistema de fluxo proposto e C_m o valor de concentração obtido pelo procedimento de diluição manual.

Tabela 4.2

Comparação dos resultados obtidos na determinação de Ca e Mg (digestos de amostras de cabelo) e de Na (amostras de urina) com o sistema proposto e pelo procedimento manual.

	Digestos de cabelo (EAA/Chama)		Urina (FC)
	Ca	Mg	Na
Equação de regressão linear	$C_p = 0,999 \times C_m + 1,432$	$C_p = 0,999 \times C_m + 0,007$	$C_p = 1,002 \times C_m - 1,057$
(coeficiente de correlação)	($r = 0,9998$)	($r = 0,9992$)	($r = 0,9997$)
Desvio Relativo (mínimo; máximo)	-1,29; +1,14	-4,25; +5,92	-3,3; +4,1
Teste de t de Student emparelhado ^a	0,51	0,14	0,56

^a Os valores tabelados para um teste t de Student bicaudal e para um nível de confiança de 95 % são 2,06 (número de graus de liberdade = 26) e 2,11 (número de graus de liberdade = 17).

Tabela 4.3

Resultados obtidos na determinação de Ca e Mg (digestos de cabelo) e de Na (urina) nas amostras de referência certificadas.

Digestos de cabelo (EAA/Chama)						Urina (FC)		
Ca (mg Kg ⁻¹)			Mg (mg Kg ⁻¹)			Na (mg L ⁻¹)		
Resultados obtidos (média ± dp; n = 5)		Valor certificado	Resultados obtidos (média ± dp; n = 5)		Valor certificado	Resultados obtidos (média ± dp; n = 5)		Valor certificado
SFMI	Procedimento manual	1120 ± 120	SFMI	Procedimento manual	177 ± 21	SFMI	Procedimento manual	2545 ± 82
1122 ± 136	1121 ± 152		171 ± 12	176 ± 18		2532 ± 42	2585 ± 45	

Tabela 4.4

Comparação dos resultados (mg L⁻¹) obtidos na determinação de Na em amostras de urina (n = 18) por EAA/chama com o sistema de fluxo proposto e pelo procedimento manual.

Amostra	Sistema de fluxo proposto (média ± dp ^a)	Procedimento manual (média ± dp ^a)	Desvio Relativo ^b (%)
1	2492 ± 47	2479 ± 45	+0,52
2	3264 ± 52	3275 ± 53	-0,34
3	2582 ± 37	2532 ± 35	+1,98
4	1305 ± 26	1318 ± 28	-0,97
5	938 ± 19	902 ± 22	+3,93
6	900 ± 22	942 ± 21	-4,41
7	1118 ± 23	1104 ± 25	+1,21
8	1213 ± 25	1209 ± 20	+0,26
9	1299 ± 22	1318 ± 24	-1,44
10	1020 ± 20	1002 ± 17	+1,86
11	431 ± 11	439 ± 13	-1,66
12	1299 ± 27	1296 ± 25	+0,22
13	2624 ± 51	2639 ± 53	-0,54
14	2582 ± 53	2559 ± 55	+0,92
15	4788 ± 83	4821 ± 85	-0,67
16	4128 ± 77	4072 ± 73	+1,37
17	3044 ± 61	2994 ± 68	+1,69

Amostra	Sistema de fluxo proposto (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio Relativo ^b (%)
18	2532 $\pm$ 42	2585 $\pm$ 45	-2,06

^a A “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de três determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão calculado de acordo com o descrito no Capítulo 2.

^b O cálculo do desvio relativo foi feito com base na expressão $[(C_p - C_m)/C_m] \cdot 100$, em que C_p representa o valor de concentração obtido pelo sistema de fluxo proposto e C_m o valor de concentração obtido pelo procedimento de diluição manual.

4.4. Conclusões

Este trabalho mostrou a viabilidade do acoplamento de sistemas de fluxo por multi-impulsão (SFMI), i.e., sistemas de fluxo baseados na utilização de micro-bombas solenóides (mBS) como dispositivos responsáveis pela introdução e propulsão das soluções, a equipamento de espectrofotometria atômica. Mostrou também que este acoplamento apresenta as mesmas vantagens já anteriormente evidenciadas no acoplamento a outro tipo de detectores, nomeadamente no que se refere à excelente capacidade de promover a mistura das soluções.

As características analíticas dos SFMI construídos fizeram realçar o comportamento reprodutível das mBS na introdução de microvolumes de amostra, o que é uma característica de grande utilidade na construção de sistemas para efectuar diluições em linha. Adicionalmente, importa destacar que os sistemas desenvolvidos apresentavam uma configuração muito simples e permitiram obter resultados exactos, com um bom rendimento analítico.

A utilização deste tipo de sistemas permite assim transformar alguns pré-tratamentos de amostra muito comuns, como é a sua diluição prévia e/ou a adição de um determinado reagente, em operações mais rápidas e menos sujeitas a erro do que as operações manuais. Por outro lado, constitui uma alternativa economicamente vantajosa à utilização de outro tipo de dispositivos para automatizar aquelas tarefas.

4.5. Bibliografia

- Borella, P., Rovesti, S., Caselgrandi, E. e Bargellini, A. (2002). Quality control in hair analysis: a systematic study on washing procedures for trace element determinations. *Mikrochimica Acta*. **123**: 271-280.
- Carneiro, J.M.T., Zagatto, E.A.G., Santos, J.L.M. e Lima, J.L.F.C. (2002). Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system. *Analytica Chimica Acta*. **466**: 125-132.
- Carneiro, M.T.W.D., Silveira, C.L.P., Miekeley, N. e Fortes, L.M.C. (2002). Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do rio de Janeiro - Brasil. *Química Nova*. **25**: 37-45.
- Cizdziel, J.V. e Gerstenberger, S. (2004). Determination of total mercury in human hair and animal fur by combustion atomic absorption spectrometry. *Talanta*. **64**: 918-921.
- Dombovari, J. e Papp, L. (1998). Comparison of sample preparation methods for elemental analysis of human hair. *Microchemical Journal*. **59**: 187-193.
- Fido, A., Dashti, H. e Al-Saad S. (2002). Biological correlates of childhood autism: trace elements. *Trace Elements and Electrolytes*. **19**: 205-208.
- Kilic, E., Demiroglu, A., Saraymen, R. e Ok, E. (2004). Comparative quantitative analysis of zinc, magnesium, and copper content in the scalp hair of healthy people and breast cancer patients. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. **17**: 175-180.
- Kubová, J., Hanáková, V., Medved', J. e Streško, V. (1997). Determination of lead and cadmium in human hair by atomic absorption spectrometric procedures after solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. **337**: 329-334.
- Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F., Santos, J.L.M. e Zagatto, E.A.G. (2002). Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta*. **466**: 125-132.
- Lech, T. (2001a). Calcium and magnesium content in hair as a predictor of diseases in children - part I: neurological disorders. *Trace Elements and Electrolytes*. **18**: 112-121.
- Lech, T. (2001b). Calcium and magnesium content in hair as a predictor of diseases in children - part II: disorders of the osteomusculararticular system. *Trace Elements and Electrolytes*. **18**: 165-171.

- Lech, T. (2002). Lead, copper, zinc, and magnesium levels in hair of children and young people with some disorders of the osteomusculararticular system. *Biological Trace Element Research*. **89**: 111-125.
- Leung, P.L., Huang, H.M., Sun, D.Z. e Zhu, M.G. (1999). Hair concentrations of calcium, iron, and zinc in pregnant women and effects of supplementation. *Biological Trace Element Research*. **69**: 269-282.
- Lima, J.L.F.C., Santos, J.L.M., Dias, A.C.B., Ribeiro, M.F.T e Zagatto, E.A.G. (2004). Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta*. **64**: 1091-1098.
- MacPherson, A., Balint, J. e Bacso, J. (1995). Beard calcium-concentration as a marker for coronary heart-disease as affected by supplementation with micronutrients including selenium. *Analyst*. **120**: 871-875.
- MacPherson, A. e Bacso, J. (2000). Relationship of hair calcium concentration to incidence of coronary heart disease. *Science of the Total Environment*. **255**: 11-19.
- Marques, K.L., Santos, J.L.M. e Lima J.L.F.C. (2005). A catalytic multi-pumping flow system for the chemiluminometric determination of metformin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **382**: 452-457.
- Morton, J., Carolan, V.A. e Gardiner P.H.E. (2002). Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **455**: 23-34.
- Ng, S.Y. (1999). Hair calcium and magnesium levels in patients with fibromialgia: a case center study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. **22**: 586-593.
- Nowak, B. (1998). Contents and relationship of elements in human hair for a non-industrialised population in Poland. *The Science of the Total Environment*. **209**: 59-68.
- Pereira, R., Ribeiro, R. e Gonçalves, F. (2004). Scalp hair analysis a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). *Science of the Total Environment*. **327**: 81-92.
- Pinto, P.C.A.G., Saraiva, M.L.M.F.S., Santos, J.L.M. e Lima, J.L.F.C. (2005). A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Acta*. **539**: 173-179.
- Pozebon, D., Dressler, V.L. e Curtius, A.J. (1999). Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Química Nova*. **22**: 838-846.

- Senofonte, O., Violante, N., Fornarelli, L., Beccaloni, E., Powar, A. e Carolli, S. (1989). Reference values for elements of toxicological, clinical and environmental interest in hair of urban subjects. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. **25**: 385-392.
- Senofonte, O., Violante, N. e Carolli, S. (2000). Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **14**: 6-13.
- Shamberger, R.J. (2003). Calcium, magnesium, and other elements in the red blood cells and hair of normals and patients with premenstrual syndrome. *Biological Trace Element Research*. **94**: 123-129.
- Silberberg, C. (2006). *Sodium - urine*. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003599.htm> (acedido em 10 de Fevereiro de 2007).
- Suzuki, T., Koizumi, J., Moroji, T., Shiraishi, H., Hori, T., Baba, A., Kawain, N., Tada, K. (1992). Effects of long-term anticonvulsant therapy on copper, zinc, and magnesium in hair and serum of epileptics. *Biological Psychiatry*. **31**: 571-581.
- Tyson, J.F. (1991). Flow injection atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta Reviews*. **14**: 169-233.
- Wojciak, R.W. e Krejpcio, Z. (2002). Assessment of the content of selected bioelements in the hair of children with infantile cerebral palsy (paralysis cerebri infantilis). *Trace Elements and Electrolytes*. **19**: 133-137.
- Wojciak, R.W., Krejpcio, Z., Czlapka-Matyasik, M. e Jeszka, J. (2004). Comparison of the hair bioelements in vegetarian and non-vegetarian women. *Trace Elements and Electrolytes*. **21**: 141-144.

A decorative graphic consisting of several overlapping squares in shades of gray and black, positioned to the left of the chapter title.

Capítulo

5

Determinação sequencial de Cu
em amostras de soro e de urina
por EAA/Chama

5. Determinação sequencial de Cu em amostras de soro e de urina por EAA/Chama

5.1. Introdução

O cobre (Cu) encontra-se envolvido em numerosos processos biológicos, sendo um elemento essencial para o organismo humano (Alcock, 1996; Milne, 1994; Toffaletti e Jones, 1992; Woo e Cannon, 1984).

Em condições normais, o Cu da dieta é absorvido a nível intestinal numa percentagem variável entre 50 e 80% e é transportado para o fígado, ligado à albumina, pela circulação portal (Milne, 1994). Uma vez no fígado, o Cu é redistribuído por diversas metaloproteínas, nomeadamente pela ceruloplasmina; e é ligado à ceruloplasmina que o Cu é excretado para o plasma onde se encontra em concentrações variáveis entre 700 e 1400 $\mu\text{g dL}^{-1}$, no homem, e entre 800 e 1550 $\mu\text{g dL}^{-1}$, na mulher (Alcock, 1996; Milne, 1994; Woo e Cannon, 1984). Nas grávidas e nas crianças estes valores são mais elevados (Alcock, 1996).

O Cu é predominantemente excretado pelas fezes, aí se encontrando o Cu da dieta que não é absorvido e o Cu proveniente das secreções biliares, secreções gastrointestinais (suco gástrico) e células provenientes da descamação da mucosa gástrica. A excreção de Cu por outras vias (suor, urina ou sangue menstrual) é muito baixa, sendo inferior a 50 $\mu\text{g dia}^{-1}$ no caso da excreção urinária (Milne, 1994; Toffaletti e Jones, 1992; Woo e Cannon, 1984).

Existem diversas patologias relacionadas com o metabolismo do Cu, sendo a mais bem conhecida a doença de Wilson, uma doença hereditária resultante da incapacidade do organismo para excretar o Cu pela bÍlis, o que resulta, numa primeira fase, na excessiva deposição deste elemento no fígado. Eventualmente, o fígado acaba por libertar o Cu directamente para a corrente sanguínea, a qual, por

sua vez, o transporta por todo o organismo. Desse modo, o Cu pode acumular-se em diversos locais, nomeadamente, no cérebro, na córnea e no rim, podendo, no caso de não ser instituído um adequado tratamento da doença, ocorrer graves lesões cerebrais e renais, que podem conduzir à morte (Alcock, 1996; Milne, 1994; Toffaletti e Jones, 1992; Woo e Cannon, 1984).

Em Química Clínica, a determinação de Cu é geralmente requerida como contributo para o diagnóstico da doença de Wilson, uma vez que esta doença se caracteriza, simultaneamente, por um aumento da excreção urinária de Cu e uma diminuição da sua concentração no soro. Assim, no sentido de se proceder ao diagnóstico diferencial relativamente a outras situações, patológicas ou fisiológicas que também envolvem alterações no metabolismo do Cu (por exemplo, gravidez), é habitual recorrer-se ao doseamento deste elemento tanto no soro como na urina (Milne, 1994; Toffaletti e Jones, 1992; Woo e Cannon, 1984).

Como foi referido atrás, a concentração esperada de Cu em amostras de soro ou urina é muito diferente, pelo que habitualmente se recorre a duas técnicas analíticas com muito diferente sensibilidade para se determinar o Cu no soro (CuS) e o Cu na urina (CuU).

Embora na literatura se possam encontrar referências à utilização de técnicas muito variadas para a determinação de CuU e de CuS, como, por exemplo, CF-AES (do inglês, *Carbon Furnace - Atomic Emission Spectrometry*) (Marshall e Ottaway, 1983), ICP-AES (Nixon *et al.*, 1986); colorimetria (Morales e Valladares, 1989); GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) (Aggarwal *et al.*, 1991); métodos electroquímicos (Horng, 1996); ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) (Szpunar *et al.*, 1997) ou sensores ópticos (Jerónimo *et al.*, 2004), as técnicas mais utilizadas são a espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (EAA/AE) para o CuU (Almeida e Lima, 2001; Dube, 1988; Halls *et al.*, 1981; Tahán *et al.*, 1994; Wang e Demshar, 1993) e a espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama (EAA/chama) para o CuS (Almeida *et*

al., 2000; Brown e Taylor, 1984; Flanjak e Hodda, 1985; Xu *et al.*, 1992). As vantagens apresentadas pela EAA/chama relativamente à EAA/AE, como, por exemplo, o facto de o equipamento ser mais barato e mais fácil de utilizar, e de ser menor o tempo necessário para efectuar as determinações e a susceptibilidade a interferências químicas (Brown e Taylor, 1984), justifica a preferência que lhe é dada aquando da implementação de procedimentos de rotina nos laboratórios de análises clínicas. Um dos procedimentos descritos para determinação de CuS por EAA/chama consiste na simples diluição 1+1 das amostras de soro com água ultrapura e na preparação das soluções de calibração em glicerol a 10% (v/v), de modo a ajustar a viscosidade destas à das amostras (Toffaletti e Jones, 1992). No sentido de se conseguir efectuar a determinação de CuU por EAA/chama (situação em que as concentrações a determinar são próximas do limite de detecção daquela técnica), tem-se recorrido a estratégias diversas para aumentar a sensibilidade (Almeida *et al.*, 2000; Brown e Taylor, 1984; Flanjak e Hodda, 1985; Xu *et al.*, 1992). Essas estratégias podem passar quer por artifícios instrumentais (Brown e Taylor, 1984), quer por processos de pré-concentração (Almeida *et al.*, 2000; Flanjak e Hodda, 1985; Xu *et al.*, 1992). Muitas vezes, as estratégias utilizadas para enriquecimento da amostra acabam por se revelar pouco práticas e/ou por constituírem processos pouco expeditos. Particularmente no que se refere aos processos de pré-concentração em modo descontínuo (*batch*), há a salientar o facto de serem pouco convenientes para implementação na rotina laboratorial por serem demorados e sujeitos a erros, devido ao elevado grau de manipulação da amostra. Pelo contrário, o processamento das amostras em linha, mediante a construção de um sistema de fluxo adequado, não apresenta esses inconvenientes, na medida em que, por exemplo, permite a execução dessas tarefas de um modo muito menos sujeito a erros por contaminação externa.

Neste trabalho, descreve-se um sistema de fluxo que permite a determinação sequencial tanto de Cu na urina como de Cu no soro por EAA/chama. Trata-se de um

sistema constituído por dois módulos com funcionamento independente, controlados através de *software* desenvolvido especificamente para o efeito, e em que a cada módulo corresponde um canal independente: um para a análise de soro, o outro para a análise de urina. O funcionamento em simultâneo dos dois módulos permitia a manipulação das amostras de soro (ajuste da viscosidade entre amostras e soluções de calibração) e posterior determinação do CuS, no módulo I, enquanto no módulo II era efectuada a pré-concentração do CuU, o qual era depois eluído, de modo reverso, em direcção ao detector (EAA/chama). Ou seja, o período de tempo em que decorria a pré-concentração do CuU (no módulo II) era aproveitado para efectuar a determinação do CuS (módulo I), o que resultava na análise dos dois tipos de amostras de modo sequencial. A existência de um canal independente para cada tipo de amostra era, no fundo, a característica responsável pela versatilidade evidenciada pelo sistema de fluxo desenvolvido. Cada módulo funcionava de modo distinto, utilizando diferentes estratégias de fluxo (gestão de fluidos) – multicomutação no módulo I (Rocha *et al.*, 2002) e multi-impulsão no módulo II (Lima *et al.*, 2004); e também diferentes estratégias de amostragem – amostragem binária no módulo I (Reis *et al.*, 1994) e amostragem por *merging zones* no módulo II (Ruzicka e Hansen, 1980).

O módulo I (que permitia efectuar a pré-concentração de CuU) era basicamente um sistema de fluxo do tipo multi-impulsão (SFMI), i.e., utilizava micro-bombas solenóides (mBS) para a introdução e propulsão das soluções (Lima *et al.*, 2004). Como já foi referido noutros Capítulos, o fluxo pulsado resultante da actuação destes dispositivos faz com que nos SFMI se obtenha uma boa mistura das soluções propulsionadas (aliás, a mistura pode ser total logo no ponto de confluência das soluções quando se selecciona uma estratégia de amostragem por *merging zones*) e limites de detecção mais baixos (devido à minimização do grau de dispersão, uma vez que este tipo de sistemas de fluxo é caracterizado por uma menor dispersão axial das soluções) (Lima *et al.*, 2004). Estas características dos SFMI tornam atractiva a sua

utilização para efectuar várias tarefas em linha, como seja, por exemplo, e neste caso, a adição de uma solução tampão e/ou a execução de uma etapa de pré-concentração.

O módulo II (destinado a efectuar a determinação de CuS) consistia num sistema de fluxo com multicomutação, baseado na utilização de válvulas solenóides de 3-vias como dispositivos comutadores (Rocha *et al.*, 2002). Estes dispositivos podem ser facilmente automatizados e permitem a construção de “redes de fluxo” muito flexíveis/versáteis, i.e., permitem a construção de sistemas de fluxo facilmente adaptáveis às necessidades analíticas sem ser necessária a sua reconfiguração física. A sua utilização possibilita a selecção de diferentes estratégias de amostragem, ou seja, diferentes estratégias para inserir as soluções num sistema de fluxo, como, por exemplo, a introdução de um segmento único de solução ou a intercalação de vários segmentos de diferentes soluções (amostragem binária) com elevada precisão, mesmo quando se trata de microvolumes (Giné *et al.*, 1996). O tipo de amostragem utilizado e a possibilidade de controlar estes dispositivos numa base de tempo (controlo temporizado) permite influenciar o grau de dispersão das soluções e, desse modo, o factor de diluição que se obtém (Reis *et al.*, 1994).

5.2. Experimental

5.2.1. Instrumentação

Para as determinações por EAA/Chama utilizou-se um espectrofotómetro com atomizador de chama, da marca PerkinElmer®, modelo 5000, ao qual se ligou um registador da marca Metrohm AG, modelo E 586 Labograph. A chama utilizada era de ar/acetileno. Como fonte de radiação utilizou-se uma lâmpada de cátodo oco da marca Cathodeon Ltd.

O sistema de fluxo (Figura 5.1) era constituído por quatro micro-bombas solenóides da marca Bio-Chem™ Valve Inc., que dispensavam um volume fixo de 25 µL por cada pulso; seis válvulas solenóides de 3-vias da marca NResearch® Inc., modelo 161T031; tubos de Teflon®, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm; uma coluna de Perspex® de construção laboratorial, com 5 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno (Almeida et al., 2000); ligadores e uma confluência em “duplo-T”, também de construção laboratorial.

O controlo dos sistemas de fluxo, bem assim como a aquisição e o processamento de dados, foi efectuado com recurso a um computador pessoal, equipado com uma interface activa da marca Advantech® Co., Ltd, modelo PC-LABCard™ PCL-711B. As mBS eram comandadas usando um circuito de potência baseado num circuito CoolDrive™, comercializado pela NResearch® Inc.

As determinações por ICP-MS foram efectuadas num aparelho da marca VG Elemental, modelo PlasmaQuad® 3, cuja sensibilidade e estabilidade eram diariamente optimizadas. O software PlasmaLab®, instalado num computador pessoal, permitia controlar todo o equipamento e fazer a aquisição dos dados. Para a drenagem do esgoto produzido durante o funcionamento do equipamento e para propulsionar a amostra para detecção, foi utilizada uma bomba peristáltica da marca Gilson®, modelo Minipuls™ 3.

No estudo dos processos de pré-tratamento das amostras de urina utilizou-se uma centrífuga da marca J.P Selecta, modelo Centromix S-549 (para a sua centrifugação); filtros de acetato de celulose, da marca Schleicher&Schuell, modelo FP 30/0.2 CA (para filtração “física”); cartuchos da marca Waters®, modelo Sep-Pak® Plus C18 (para filtração “química” ou extracção em fase sólida); e um forno de microondas da marca Milestone, modelo MLS-1200 Mega (na digestão por via húmida em vaso fechado).

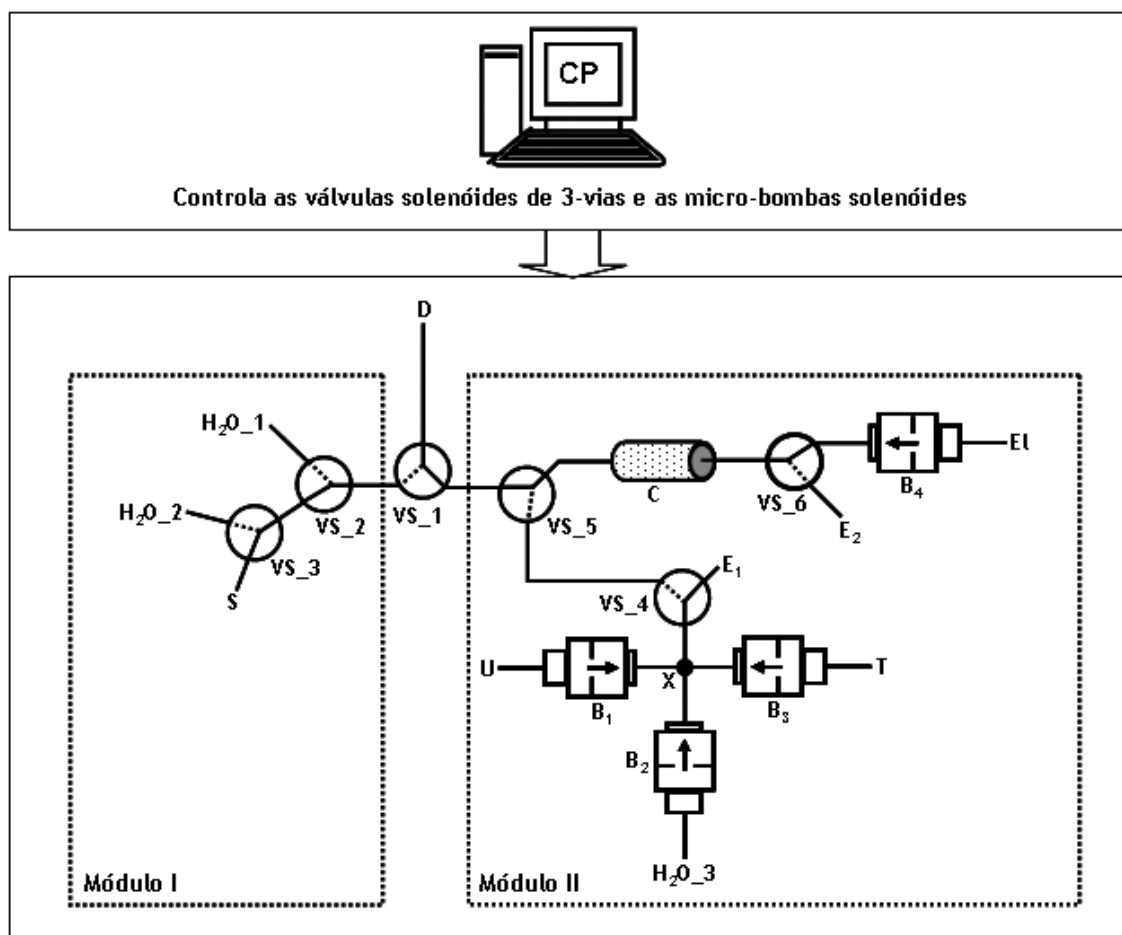


Figura 5.1

Representação esquemática do sistema de fluxo desenvolvido para a determinação sequencial de Cu em amostras de soro e urina. Legenda - H₂O_1 e H₂O_3: água ultrapura; H₂O_2: água ultrapura ou glicerol (introdução das amostras de soro ou das soluções de calibração, respectivamente); S: amostra de soro; VS_1 - VS_6: válvulas solenóides de 3-vias (linha contínua: solenóide activado - posição 1; linha tracejada: solenóide desactivado - posição 0); U: amostra de urina; T: solução tampão; B₁ - B₄: micro-bombas solenóides; X: confluência em “duplo T”; E₁ - E₂: esgoto; C: coluna de pré-concentração; El: eluente; D: detector; CP: computador pessoal.

5.2.2. Material e Reagentes

Na preparação de todas as soluções utilizou-se sempre água ultrapura.

Com excepção do HNO₃, do H₂O₂ e da solução de In, que eram de qualidade *Suprapur*[®] (designação Merck) ou equivalente, todos os reagentes utilizados eram de qualidade *GR for analysis* (designação Merck) ou equivalente.

As soluções de calibração foram preparadas por diluição adequada de uma solução padrão comercial de Cu com uma concentração de 1000 mg L^{-1} (Spectrosol[®], da BDH), com uma solução de HNO_3 0,5 % (v/v) para as determinações por EAA/Chama, ou com uma solução de HNO_3 2% (v/v) para as determinações por ICP-MS.

Na preparação de todas as soluções de HNO_3 diluídas utilizou-se uma solução de HNO_3 65% (m/m), da marca Merck.

Na digestão das amostras de urina foi utilizada uma solução de H_2O_2 30% (m/m), comercializada pela Riedel-de Haën.

Na preparação da solução tampão de ácido acético/acetato de sódio utilizaram-se reagentes comercializados pela Pronalab e pela Merck, respectivamente.

Nas extremidades da coluna de pré-concentração colocaram-se filtros de Teflon[®] com poros de $35 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, da marca MoBiTec. O material de enchimento das colunas foi a resina Metalfix[™] Chelamine[™], comercializada pela Fluka, a qual é uma resina quelante produzida por imobilização de um ligando do tipo pentamina (a tetraetilenopentamina) num polímero orgânico (a poliacrilamida reticulada) (Blain *et al.*, 1993) e que se apresentava na forma de partículas com $40\text{-}80 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro.

Para a determinação de CuS, partindo de uma solução comercial de glicerol, da marca J.T.Baker, preparou-se uma solução de glicerol 20% (v/v) que posteriormente foi utilizada para misturar com as soluções de calibração, na proporção 1+1.

Para avaliar a exactidão da metodologia analítica desenvolvida utilizaram-se as amostras de referência certificadas *Seronorm[™] Trace Elements Serum, level 1*, lote MI0181; *Seronorm[™] Trace Elements Serum, level 2*, lote NO0371 e *Seronorm[™] Trace Elements Urine*, lote NO2525, todas comercializadas pela Sero AS.

5.2.3. Preparação das amostras e das soluções de calibração

5.2.3.1 Urina

As amostras de urina foram colhidas em recipientes de polietileno adequadamente descontaminados por lavagem ácida. Após a sua recepção, foram acidificadas com HNO_3 até um pH inferior a 2 e, posteriormente, congeladas (-20°C) até à sua análise. Algumas amostras foram dopadas com uma solução concentrada de Cu.

Alguns autores referem que o pré-tratamento das amostras de urina pode influenciar a exactidão dos resultados obtidos na determinação da concentração de Cu, em particular quando se recorre a processos de pré-concentração com resinas de troca iónica (Flanjak e Hodda, 1985; Halls *et al.*, 1981). A inexactidão pode ser atribuída à precipitação de Cu quando o pH da urina aumenta e/ou à formação de complexos de Cu com certos compostos orgânicos, o que afecta a disponibilidade do Cu para o processo de troca iónica ao nível das resinas. Estas causas de inexactidão podem ser eliminadas com a acidificação e/ou com a digestão das amostras (Flanjak e Hodda, 1985; Halls *et al.*, 1981). Evidentemente, sendo necessário para melhorar a exactidão dos resultados, o pré-tratamento das amostras diminui o rendimento analítico. Nesse sentido, estudaram-se diferentes pré-tratamentos das amostras de urina com o intuito de se conseguir obter melhor precisão e rendimento analítico. Em concreto, estudou-se a influência dos seguintes processos de pré-tratamento das amostras sobre o sinal analítico: i) simples acidificação; ii) acidificação com centrifugação a 4000 g; iii) acidificação com filtração “física”; iv) acidificação com extracção em fase sólida por quelatação (filtração “química”); v) adição de 2 mL de H_2O_2 e de 8 mL de HNO_3 5% (v/v) (i.e., solução branco da calibração) a 10 mL da amostra previamente acidificada. Verificou-se que nenhum destes pré-tratamentos das amostras permitia obter resultados reprodutíveis e exactos. Assim, testou-se o pré-tratamento das amostras por digestão ácida das mesmas em forno de microondas, tendo-se verificado que este permitia não só obter uma taxa de

recuperação superior a 90%, como também melhorar a precisão analítica. Dos processos de digestão ácida que foram estudados, a melhor sensibilidade (maior magnitude dos sinais analíticos) era obtida quando se colocavam 10 mL de amostra e 2 mL de H_2O_2 nos vasos do forno de microondas, se procedia ao seu aquecimento (potência do forno = 500 W) durante 5 minutos (Almeida *et al.*, 2000) e, após arrefecimento até à temperatura ambiente, se adicionava 8 mL da solução branco de calibração - HNO_3 0,5% (v/v). A substituição dos 8 mL de branco de calibração por igual volume de solução tampão conduzia a sinais de magnitude inferior, e consequentemente à obtenção de piores limite de detecção (Tabela 5.1).

Tabela 5.1

Resumo do efeito exercido por diferentes pré-tratamentos das amostras de urina na magnitude do sinal analítico.

Pré-tratamento	Sinal relativo (%) [*]
Acidificação Centrifugação durante 10 min a 4000g Filtração Extracção em fase sólida por quelatação Diluição 1+1 (manual) com o branco da calibração + Diluição 1+1 (em linha) com a solução tampão	20 - 75
Digestão + Diluição 1+1 (em linha) com a solução tampão	95
Digestão + Diluição 1+1 (manual) com o branco da calibração + Diluição 1+1 (em linha) com a solução tampão	100
Digestão + Diluição 1+3 (manual) com a solução tampão	90

^{*} Relação entre o sinal analítico obtido com cada pré-tratamento e o sinal máximo. Em qualquer caso, o sinal corresponde à média aritmética (n=5) da altura, em cm, dos picos obtidos no registo gráfico.

Em cada ciclo de digestão, era seleccionado um vaso para funcionar como “branco da amostra”. Este vaso, no qual se substituíu o volume de amostra por igual volume de água ultrapura, era sujeito ao mesmo tratamento dos restantes.

Para as determinações por ICP-MS, as amostras de urina foram simplesmente diluídas 1+9 com uma solução de HNO_3 0,05% (v/v) (Szpunar *et al.*, 1997).

As soluções de calibração foram sujeitas ao mesmo pré-tratamento das amostras.

5.2.3.2 Soro

No procedimento manual, as amostras de soro eram misturadas 1+1 com água ultrapura, e as soluções de calibração eram misturadas 1+1 com glicerol 20% (v/v) (Toffaletti e Jones, 1992).

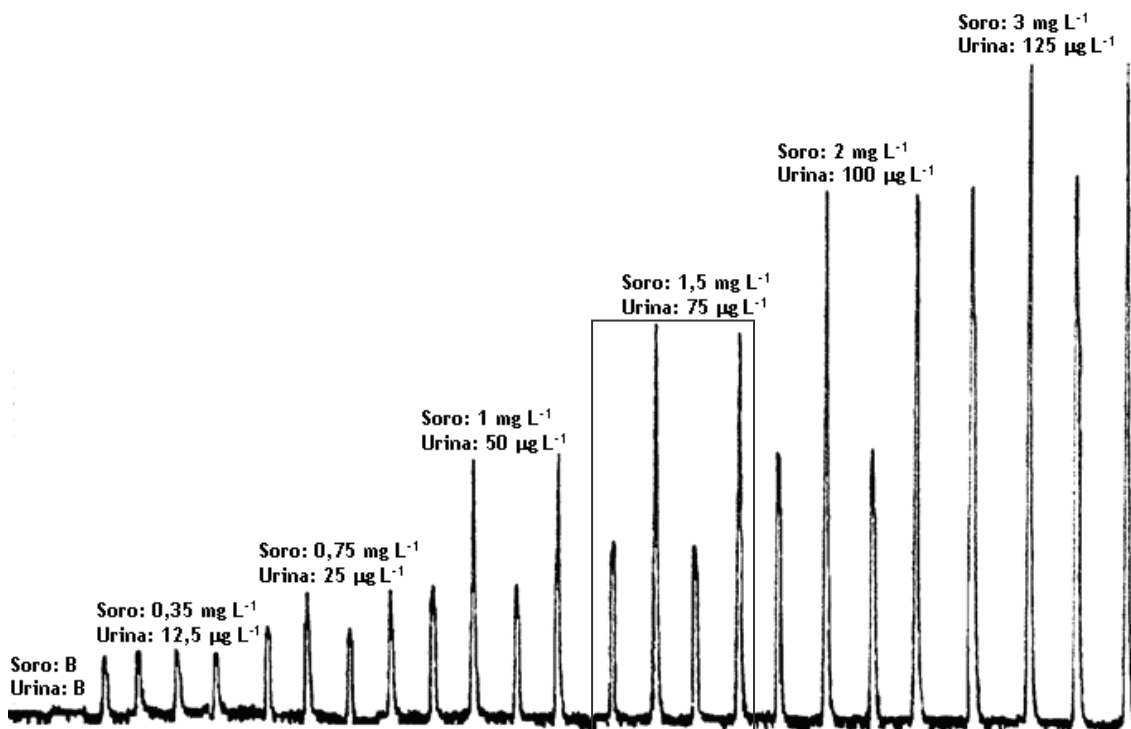


Figura 5.2

Registo gráfico do sinal analítico correspondente ao traçado de uma curva de calibração, com leituras em duplicado para cada concentração. Em cada grupo de 4 sinais analíticos (por exemplo, na caixa destacada) aparece alternadamente o sinal obtido para CuS, em primeiro lugar, e o sinal obtido para CuU, depois.

5.2.4. Sistema de fluxo

O sistema de fluxo desenvolvido encontra-se esquematizado na Figura 5.1. Como já foi referido anteriormente, tratava-se de um sistema composto por dois módulos com funcionamento independente, o que permitia aproveitar o tempo em que decorria a pré-concentração do CuU (no módulo II) para efectuar a determinação do CuS (no módulo I), obtendo-se assim o resultado da análise destes dois tipos de amostra de modo sequencial (Figura 5.2).

5.2.4.1 Módulo I - determinação de CuS

A determinação de CuS incluía duas etapas: a lavagem do canal da amostra e a determinação propriamente dita. Era efectuada durante a etapa de pré-concentração da amostra de urina no módulo II, ou seja, a determinação de CuS no módulo I ocorria em simultâneo ao “bombeamento” dos 300 pulsos de amostra de urina e de solução tampão, no módulo II. No caso da determinação de CuS, não existia nenhum dispositivo responsável pela introdução da amostra no sistema de fluxo e pelo transporte da mesma em direcção ao detector, nem pela mistura que era efectuada em linha de solução de calibração+glicerol ou água+soro. Todo o processo era efectuado recorrendo simplesmente à força de aspiração do nebulizador do espectrofotómetro de absorção atómica, o qual estava regulado para um caudal de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, e à comutação das válvulas solenóides de 3-vias VS_2 e VS_3.

5.2.4.1.1 Lavagem do canal da amostra de soro

Numa primeira fase, a amostra de soro S era aspirada pelo nebulizador em direcção ao detector D, durante 2 s, com as válvulas solenóides de 3-vias VS_2 e VS_3 na posição 1 (solenóide activado). De seguida, desactivava-se apenas o solenóide de VS_3, durante 4 s, o que permitia a aspiração de água (H₂O_2, na Figura 5.1).

Finalmente, desactivava-se também o solenóide de VS_2 e mantinha-se a alimentação do nebulizador por aspiração directa de água H₂O_1.

5.2.4.1.2 Determinação do CuS

Durante esta etapa, mantinha-se a válvula solenóide de 3-vias VS_2 na posição 1 (solenóide activado). A mistura 1+1 da amostra com a água era efectuada recorrendo à estratégia de amostragem binária. Para o efeito, o solenóide de VS_3 era alternadamente activado (permitindo a aspiração de amostra S) e desactivado (permitindo a aspiração de água H₂O_2) por igual período de tempo: 0,2 s. Após 10 ciclos de activação/desactivação do solenóide de VS_3, com uma duração de 0,4 s cada ciclo, este era desactivado durante 2 s, permitindo a entrada de água H₂O_2. Por fim, desactivava-se também o solenóide de VS_2.

Durante a calibração, as soluções padrão eram colocadas na posição da amostra S, e a água H₂O_2 era substituída por uma solução de glicerol 20% (v/v).

5.2.4.2 Módulo II - determinação de CuU

O ciclo analítico iniciava-se com a lavagem do canal da amostra. Seguia-se a fase de pré-concentração do CuU (durante a qual ocorria, no módulo I, o processo acima referido, da determinação do CuS). Na etapa seguinte, era feita a eluição reversa da coluna de pré-concentração, obtendo-se o sinal analítico. Por fim, tinha lugar o condicionamento da coluna para se iniciar um novo ciclo analítico.

5.2.4.2.1 Lavagem do canal da amostra

Por activação do solenóide de VS_4 e da mBS B₁, posta a funcionar a uma frequência de 300 pulsos min⁻¹ (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,2 s), eram introduzidos 10 pulsos de amostra de urina U no sistema de fluxo. De seguida, por activação da

mBS B₂ também a uma frequência de 300 pulsos min⁻¹, procedia-se à introdução de 20 pulsos de água H₂O₃, que seguia para o esgoto E₁.

5.2.4.2.2 Pré-concentração do CuU

Introduziam-se 300 pulsos de amostra de urina U e de solução tampão T no sistema de fluxo por activação simultânea das mBS B₁ e B₃ a funcionar a uma frequência de 75 pulsos min⁻¹ (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,8 s). A mistura da amostra com a solução tampão ocorria logo no ponto de confluência X — estratégia de amostragem por *merging zones* — e continuava à medida que esta era propulsionada em direcção à coluna de pré-concentração C, onde o Cu ficava retido, e de onde os restantes constituintes da amostra seguiam para o esgoto E₂.

5.2.4.2.3 Eluição da coluna de pré-concentração e determinação do CuU

Por activação do solenóide de VS₁, VS₅, VS₆ e da mBS B₄, com esta última a operar a uma frequência de 150 pulsos min⁻¹ (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,4 s), o Cu retido na coluna de pré-concentração C era eluído, de modo reverso, com 100 pulsos de HNO₃ 2 mol L⁻¹ (o eluente El, na Figura 5.1).

5.2.4.2.4 Condicionamento da coluna de pré-concentração

Com todas as válvulas solenóides na posição 0 (solenóide desactivado) e por activação da mBS B₂, funcionando a uma frequência de 150 pulsos min⁻¹, eram introduzidos no sistema de fluxo 50 pulsos de água (H₂O₃, na Figura 5.1), os quais percorriam a coluna de pré-concentração em direcção ao esgoto E₂.

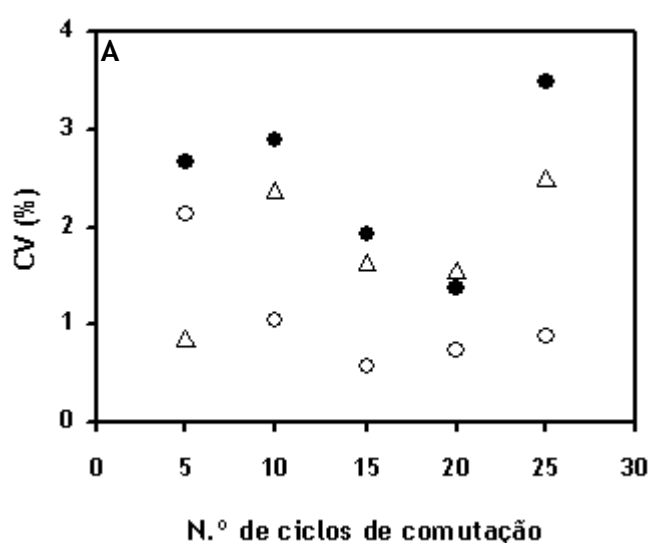
5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo

5.3.1.1 Determinação de CuS (módulo I)

Para a determinação da concentração de CuS utilizou-se um sistema de fluxo simples, sem qualquer unidade propulsora, composto apenas por dois dispositivos comutadores — as válvulas solenóides de 3-vias (Figura 5.1 - módulo I). A sincronização do funcionamento das duas válvulas solenóides de 3-vias, obtida através do controlo do tempo de activação e de desactivação definido para o solenóide (i.e., através do tempo de comutação do solenóide), era essencial para o desempenho analítico do sistema de fluxo desenvolvido. Efectivamente, como já foi referido, a alimentação do queimador e a mistura 1+1 das soluções (amostra+água ou solução de calibração+glicerol 20% v/v), feita em linha por amostragem binária, resultavam apenas do efeito de aspiração natural do nebulizador do espectrofotómetro de absorção atómica utilizado (caudal fixado em $3,5 \text{ mL min}^{-1}$), e do controlo do tempo em que as válvulas solenóides eram mantidas na posição 1 (solenóide activado) ou na posição 0 (solenóide desactivado). Para conseguir a referida mistura 1+1, era necessário que o tempo de comutação definido para que a válvula solenóide VS_3 se mantivesse na posição 1 (solenóide activado) fosse igual ao tempo definido para que esta se mantivesse na posição 0 (solenóide desactivado). O estudo da influência exercida pelo tempo de comutação foi efectuado através da avaliação de tempos de comutação de 0,1; 0,2 e 0,3 s para cada uma das referidas posições, resultando, respectivamente, em ciclos de activação/desactivação com uma duração total de 0,2; 0,4 e 0,6 s. Para cada um daqueles tempos de comutação, testou-se um número crescente de ciclos de comutação — 5, 10, 15, 20 e 25 ciclos — e calculou-se o volume de amostra que, aproximadamente, se gastava em cada determinação, tendo em conta o caudal de aspiração das soluções pelo nebulizador

do espectrofotómetro e o tempo definido para activação da válvula solenóide VS_3 em cada ciclo. Por exemplo, o recurso a 5 ciclos de comutação de 0,2 s (válvula solenóide VS_3 mantida durante 0,1 s em cada uma das duas posições possíveis), a um caudal de aspiração de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, permitia a introdução de, aproximadamente, $30 \text{ }\mu\text{L}$ de soro ($0,5 \times 3500 \div 60$), os quais eram misturados com igual volume de água ultrapura. Os resultados obtidos permitiram concluir que se obtinha maior precisão quando se utilizavam ciclos de comutação de 0,4 s, como se pode verificar também pela análise da Figura 5.3 A, onde, salvo uma excepção, independentemente do número de ciclos de comutação testado, os valores de CV% eram sempre mais baixos naquele caso (ciclos de comutação de 0,4 s). Fixando a duração de cada ciclo, o volume de amostra necessário para cada determinação aumentava linearmente com o número de ciclos de comutação (Figura 5.3 B). Num compromisso entre precisão e volume de amostra gasto por determinação, que é um aspecto a ter em consideração devido ao baixo volume de soro geralmente disponível para análise, seleccionou-se um total de 10 ciclos de comutação para a determinação de CuS, cada um com uma duração de 0,4 s.



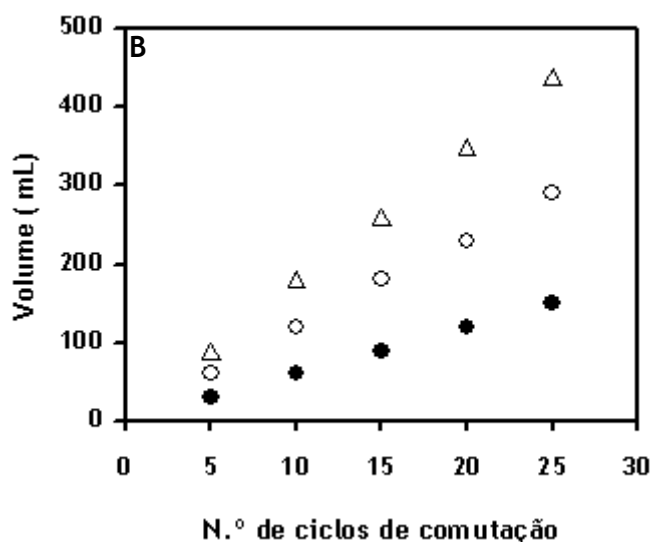


Figura 5.3

Influência do número de ciclos de comutação na precisão analítica, traduzida pelo valor do coeficiente de variação obtido na leitura consecutiva ($n = 5$) de uma solução padrão de Cu de $3,75 \text{ mg L}^{-1}$ de concentração (A), e no volume de amostra gasto em cada determinação (B), para cada um dos tempos de comutação estudados: 0,1 s (●); 0,2 s (○); 0,3 s (Δ), correspondendo a ciclos de comutação de 0,2; 0,4 e 0,6 s, respectivamente.

5.3.1.2 Determinação de CuU (módulo II)

A determinação de CuU dependia essencialmente do desempenho das várias mBS usadas, que eram os dispositivos responsáveis pela introdução e pela propulsão das soluções no módulo II do sistema de fluxo desenvolvido. Como já foi referido no Capítulo 2, o volume total de solução debitado por estes dispositivos num determinado intervalo de tempo é calculado através do número de pulsos e do volume debitado em cada pulso (doravante denominado por “volume de pulso”). Por outro lado, o caudal das soluções é definido conjuntamente pelo volume de pulso e pela frequência dos pulsos, ou seja, o número de pulsos por unidade de tempo (Lapa *et al.*, 2002).

Testaram-se mBS que dispensavam volumes de $8 \text{ }\mu\text{L}$, $25 \text{ }\mu\text{L}$ ou $50 \text{ }\mu\text{L}$ em cada pulso, que, para simplificar, passarão a ser designadas de “mBS de $8 \text{ }\mu\text{L}$ ”, “mBS de $25 \text{ }\mu\text{L}$ ” e “mBS de $50 \text{ }\mu\text{L}$ ”, respectivamente. Verificou-se que a precisão analítica aumentava

com a diminuição do volume de pulso. Este facto estaria provavelmente relacionado com o efeito de contrapressão (do inglês, *backpressure*) produzido pela presença da coluna de pré-concentração no percurso da solução que era bombeada, sendo que este efeito era tão menos evidente quanto menor fosse o volume de pulso. Porém, para a mesma frequência de pulso, o tempo necessário para se obter um sinal analítico de magnitude semelhante também aumentava com a diminuição do volume de pulso, o que prejudicava o rendimento analítico. Por exemplo, era necessário introduzir no sistema 500 pulsos de amostra de 8 μL cada para se obter um sinal de magnitude semelhante ao conseguido com a introdução de apenas 300 pulsos de 25 μL , pelo que para os ensaios posteriores seleccionaram-se as mBS de 25 μL .

Num sistema de fluxo onde seja realizada uma etapa de pré-concentração, a intensidade do sinal analítico obtido depende do volume de amostra que é feito passar pela coluna, até ao limite em que se esgote a capacidade desta. Por isso, foi efectuada a avaliação da influência exercida pelo volume de amostra, avaliação feita em termos do número de pulsos de amostra debitados pela mBS B₁ durante a etapa de pré-concentração. Para um número de pulsos entre 100 e 500 verificou-se que a magnitude do sinal analítico aumentava linearmente. Contudo, com o aumento do número de pulsos aumentava também o tempo gasto em cada determinação (Figura 5.4). Assim, e de forma a obter uma solução de compromisso entre sensibilidade e rendimento analítico, seleccionou-se um total de 300 pulsos de amostra para a etapa de pré-concentração.

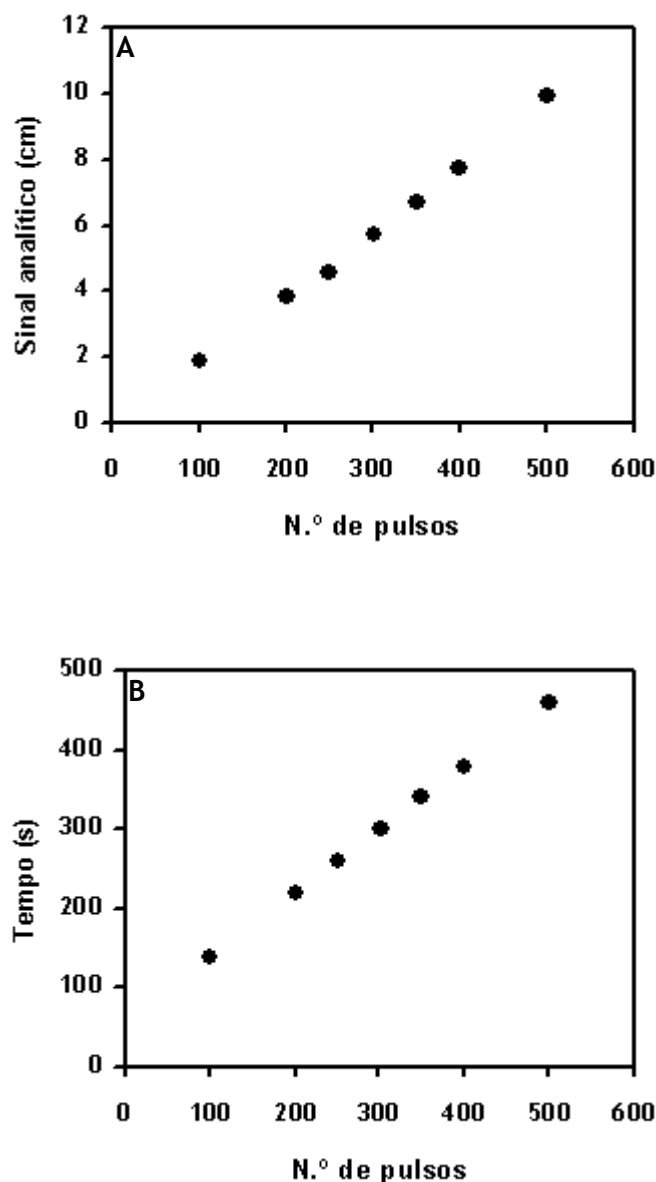


Figura 5.4

Influência do número de pulsos de amostra debitados pela mBS B₁ de 25 µL na magnitude do sinal analítico (A) e no tempo gasto em cada determinação (B).

Antes de as amostras entrarem em contacto com a resina, era feito o ajuste do pH, mediante a adição de uma solução tampão. Este procedimento era efectuado em linha, por activação em simultâneo da mBS B₁ (amostra) e da mBS B₃ (solução tampão), o que fazia com que as duas soluções confluissem e se misturassem logo no ponto X — amostragem por *merging zones*. Deste modo, o caudal total durante a etapa de pré-concentração (volume de solução que efectivamente passava pela coluna por unidade de tempo) correspondia à soma do caudal da amostra e do caudal

da solução tampão. Este “caudal total” era um parâmetro que influenciava grandemente a eficiência da pré-concentração, uma vez que afectava de modo significativo a taxa de retenção do Cu pela resina. Como se pode verificar na Figura 5.5, no intervalo testado (2,5 a 15 mL min⁻¹), a intensidade do sinal analítico diminuía à medida que aumentava o caudal total durante a etapa de pré-concentração. Em função destes resultados, seleccionou-se um caudal de 1,875 mL min⁻¹ para cada uma das soluções que eram inseridas no sistema de fluxo pela estratégia de *merging zones* (amostra e solução tampão), o que correspondia a um caudal total de 3,75 mL min⁻¹. Para se conseguir obter este caudal, utilizava-se uma frequência de 75 pulsos min⁻¹ (i.e., um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,8 s) tanto para a mBS B₁ como para a mBS B₃.

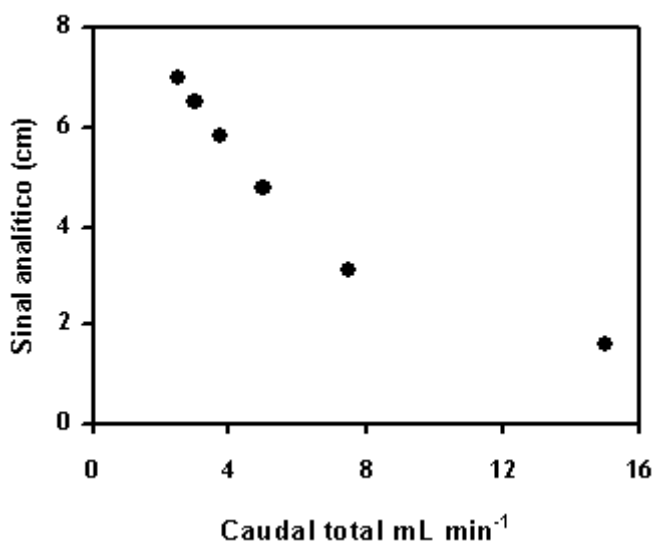


Figura 5.5

Influência exercida pelo caudal durante a etapa de pré-concentração na magnitude do sinal analítico.

Avaliou-se ainda a influência exercida pelas dimensões da coluna de pré-concentração no sinal analítico obtido, tendo-se utilizado 6 colunas diferentes, com (comprimento/diâmetro interno) de 5 cm/2 mm, 7 cm/2 mm, 3 cm/3 mm, 5 cm/3 mm, 7 cm/3 mm e 5 cm/4 mm. Mantendo constante o tempo durante o qual ocorria

a pré-concentração da amostra, obtiveram-se sinais analíticos de maior intensidade com colunas de maior diâmetro interno e/ou de menor comprimento, o que provavelmente estava relacionado com a menor resistência que estas ofereciam à passagem da mistura da amostra com a solução tampão e, portanto, com o volume que efectivamente passava pela coluna durante a etapa de pré-concentração. Por seu lado, a precisão diminuía com o aumento do diâmetro interno da coluna e não era significativamente alterada quando se mantinha o diâmetro interno da coluna constante e se variava o seu comprimento (Tabela 5.2). Estabelecendo um compromisso entre sensibilidade e precisão analítica, seleccionou-se a coluna com 3 mm de diâmetro interno e 5 cm de comprimento.

Tabela 5.2

Resumo dos resultados do estudo do efeito do diâmetro e do comprimento da coluna de pré-concentração na magnitude e na repetibilidade do sinal analítico.

Coluna de pré-concentração		Volume ^a (mL)	Sinal ^b (cm)	CV (%)
Diâmetro (mm)	Comprimento (cm)			
2	5	4,5	6,3	0,6
	7	3	4,6	0,8
3	3	6,5	11,5	0,6
	5	5	8,4	0,8
	7	4,5	5,4	1,3
4	5	6	8,6	5,7

^a Volume de amostra efectivamente propulsionado através da coluna na etapa de pré-concentração (medição em proveta graduada).

^b Média aritmética de 5 determinações consecutivas.

A resina Metalfix™ Chelamine™ apresenta elevada capacidade e grande selectividade para os metais de transição, não retendo os metais alcalinos nem os metais alcalino-terrosos. Além disso, praticamente não apresenta variações no seu volume face a alteração nos valores de pH das soluções com as quais entra em contacto (Blain *et*

al., 1993). Estas características tornam-na uma opção extremamente atractiva para utilização em sistemas de fluxo configurados para efectuar uma etapa de pré-concentração em linha, nomeadamente naqueles que tenham por objectivo a pré-concentração de metais de transição a partir de amostras com elevado teor salino. Apesar da referida resina poder ser utilizada para valores de pH entre 1 e 12, devido à protonação dos átomos de azoto do grupo funcional amina, a eficiência de retenção é largamente influenciada pela concentração de H^+ , sendo o valor de pH óptimo variável de acordo com o metal que se pretender pré-concentrar (Almeida *et al.*, 2000). Para otimizar este parâmetro para o Cu, as amostras foram tamponadas (adição de solução tampão de ácido acético/acetato de sódio) até valores finais de pH compreendidos entre 3 e 6. Concluiu-se que a influência do valor de pH na retenção do Cu era diferente consoante se tratava de uma amostra de urina ou de uma solução de calibração (Figura 5.6). Para as soluções de calibração, a máxima retenção era conseguida no intervalo de pH entre 4,9 e 5,9. No caso das amostras de urina, a máxima retenção era obtida para pH = 5,9, mas diminuía aproximadamente 18% para pH = 5,4 e cerca de 44% para pH = 4,9. Assim, optou-se por utilizar a solução tampão de ácido acético/acetato de sódio ajustada para um valor de pH de 5,9 (9,5 ml da solução de acetato de sódio 2 mol L⁻¹ e 0,5 ml da solução de ácido acético 2 mol L⁻¹, diluídos a um volume final de 100 mL) (Perrin e Dempsey, 1979). Numa fase inicial do trabalho, também se testou a utilização do “tampão de McIlvaine”, composto por fosfato dissódico 0,6 mol L⁻¹ e ácido cítrico 0,3 mol L⁻¹, pelo facto deste permitir efectuar o estudo do valor de pH óptimo para a retenção de Cu pela resina Metalfix™ Chelamine™ num intervalo mais alargado. No entanto, acabou por não se prosseguir com a sua utilização por se ter constatado que provocava uma significativa diminuição da sensibilidade analítica, o que poderá estar relacionado com uma menor fixação de Cu na resina devido à formação de complexos com o citrato (Figura 5.7).

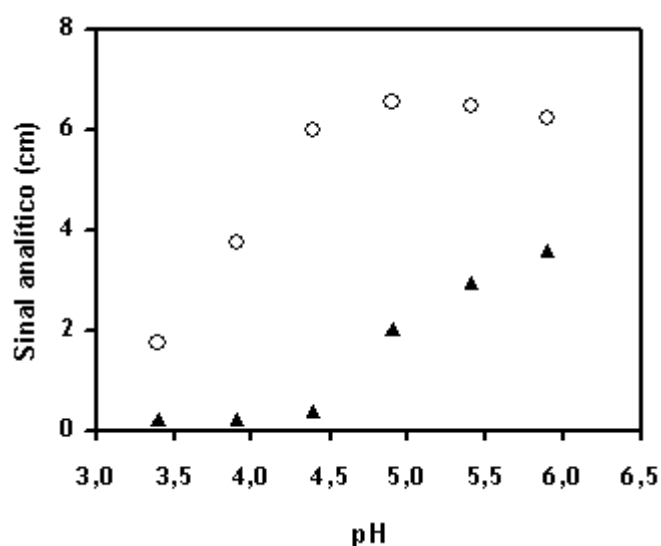


Figura 5.6

Avaliação do efeito exercido pelo valor de pH da solução de ácido acético/acetato de sódio no sinal analítico obtido para as soluções de calibração (O) e para as amostras de urina (▲).

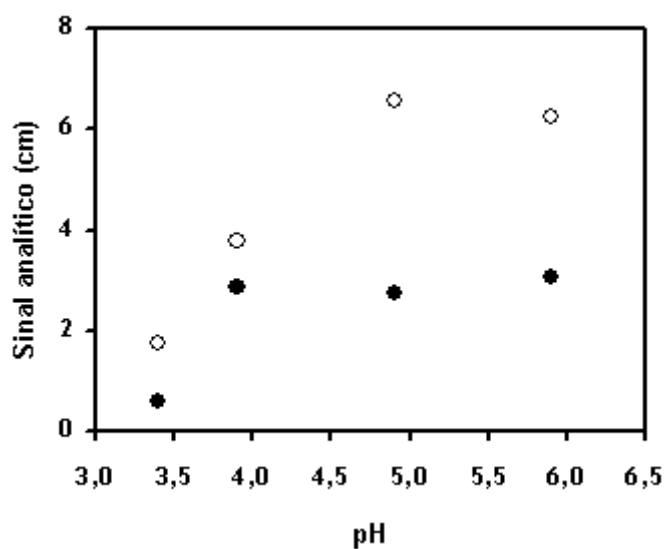


Figura 5.7

Avaliação da influência exercida pela composição da solução tampão: ● = “tampão de McIlvaine” e O = solução tampão de ácido acético/acetato de sódio.

Verificou-se que a inclusão no ciclo analítico de uma etapa de lavagem da coluna com água (H_2O_3 , propulsionada por activação da mBS B_2) após a etapa de pré-concentração era desnecessária, na medida em que, independentemente do volume

de água e do caudal utilizados, o sinal analítico não era afectado de modo significativo.

A eluição da coluna de pré-concentração de modo reverso, i.e., no sentido oposto ao do fluxo durante a etapa de pré-concentração, é geralmente considerada uma estratégia vantajosa para se limitar a dispersão e aumentar a sensibilidade (Xu *et al.*, 1992), pelo que foi também aqui utilizada. Testaram-se diferentes volumes (50 a 200 pulsos de 25 μL ; mBS B₄) e diferentes caudais (intervalo de tempo entre cada pulso de 0,2 a 0,6 s) de soluções de HNO_3 de concentração variável (0,5 mol L^{-1} a 2,5 mol L^{-1}). Verificou-se que, individualmente, nenhum destes factores (concentração, volume ou caudal do eluente) afectava de modo significativo o sinal analítico, tendo-se seleccionado o conjunto de condições que, de forma combinada, possibilitava um melhor desempenho em termos de precisão, exactidão e limite de detecção: 100 pulsos de HNO_3 2 mol L^{-1} e um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,4 s.

O condicionamento da coluna após a etapa de eluição, para efeitos de remoção da solução residual de eluente, efectuou-se com água ultrapura (H_2O_3 , por activação da mBS B₂ de 25 μL). Fez-se variar o número total de pulsos entre 25 e 200 e o intervalo de tempo entre cada pulso entre 0,2 e 0,6 s. Nenhuma das variáveis estudadas (volume e caudal), parecia afectar de modo significativo o sinal analítico, tendo-se seleccionado um total de 50 pulsos de água ultrapura (H_2O_3), introduzidos no sistema de fluxo por activação da mBS B₂ a funcionar com um intervalo de tempo entre cada pulso de 0,2 s.

5.3.2. Características do sistema de fluxo

5.3.2.1 Determinação de CuS (módulo I)

O sistema de fluxo proposto para a determinação de CuS, após optimização, permitia obter uma resposta linear até 5 mg L^{-1} e um limite de detecção de 0,035 mg L^{-1} (3σ , $n = 10$) (Thompson *et al.*, 2002), com um consumo de amostra de cerca de 250 μL . A

função de calibração típica, calculada através da média aritmética dos valores do declive e da ordenada na origem de cinco equações de curvas de calibração independentes (cada uma com 7 pontos de calibração), obtidas durante os ensaios finais de validação do método, era representada por $S = 1,9629 C + 0,0766$ ($r = 0,9998$), em que S é a magnitude do sinal analítico (altura do “pico” no registo gráfico, expressa em cm), e C a concentração de Cu, expressa em mg L^{-1} .

A sensibilidade analítica mantinha-se razoavelmente constante ao longo do tempo. De facto, para o intervalo de concentrações de 0 - 5 mg L^{-1} de cobre, obteve-se um valor médio de declive igual a 1,9629 ($n = 5$), com um desvio padrão de 0,0426, a que corresponde um CV de 2,2%.

A precisão foi avaliada efectuando leituras replicadas de soluções padrão com três diferentes valores de concentração: 0,25 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} e 5 mg L^{-1} . Esta avaliação foi feita quer em termos da repetibilidade de leituras consecutivas ($n = 10$) da mesma solução num curto intervalo de tempo, quer em termos da reprodutibilidade de leituras em dias consecutivos ($n = 5$). Os valores de CV% obtidos na avaliação da repetibilidade foram: 8,1% (0,25 mg L^{-1}), 3,1% (1 mg L^{-1}) e 0,90% (5 mg L^{-1}); na avaliação da “reprodutibilidade” foram: 9,1% (0,25 mg L^{-1}), 4,0% (1 mg L^{-1}) e 1,0% (5 mg L^{-1}).

Relativamente à exactidão, ela foi avaliada comparando os resultados obtidos na análise de amostras de soro ($n = 18$) com recurso ao sistema de fluxo desenvolvido (mistura em linha) ou realizando o procedimento de mistura manual, os quais se encontram resumidos na Tabela 5.3. A avaliação estatística, feita através do teste t de Student e da análise por regressão linear, mostra que os resultados não diferem significativamente (Tabela 5.4), pelo que se pode concluir que o sistema de fluxo proposto permite obter resultados suficientemente exactos para a determinação de CuS. Adicionalmente, procedeu-se à análise de amostras de referência certificadas. Os resultados (Tabela 5.5) reforçaram as conclusões anteriores, uma vez que os

valores obtidos, quer com o sistema de fluxo desenvolvido quer pelo procedimento manual, foram concordantes com os valores certificados.

Tabela 5.3

Comparação dos resultados (mg L^{-1}) obtidos na determinação de CuS ($n = 18$) por EAA/chama usando o sistema de fluxo proposto ou o procedimento manual.

Amostra	Sistema de fluxo desenvolvido (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento manual (média $\pm$ dp ^a)	Desvio Relativo ^b
1	1,08 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,05	-2,66
2	1,25 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,05	-2,12
3	1,10 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,05	+1,71
4	1,25 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,05	-2,12
5	1,14 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,05	-0,71
6	1,17 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,05	-1,50
7	1,12 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,05	-0,15
8	1,26 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,05	+0,85
9	1,31 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,05	+0,61
10	1,22 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,05	-1,40
11	1,36 $\pm$ 0,05	1,38 $\pm$ 0,05	-1,58
12	1,01 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,05	-1,98
13	1,35 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,05	-0,37
14	1,33 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,05	+2,21
15	1,12 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,05	+1,08
16	1,32 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,05	-0,67
17	1,09 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,05	+0,75
18	1,26 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,05	-1,31

^a A “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de duas determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão calculado de acordo com o descrito na Capítulo II.

^b O cálculo do desvio relativo foi feito com base na expressão $[(C_p - C_m)/C_m] \cdot 100$, em que C_p representa o valor de concentração obtido com o sistema de fluxo proposto e C_m o valor de concentração obtido pelo procedimento manual.

Quando se utilizavam os dois módulos em simultâneo, o rendimento analítico era de 24 determinações hora⁻¹ (12 determinações de CuS e 12 determinações de CuU).

Utilizando apenas o módulo I, o rendimento analítico aumentava para 360 determinações hora⁻¹.

Tabela 5.4

Resumo da comparação dos resultados obtidos na determinação de CuS (n = 18) por EAA/chama com o sistema de fluxo proposto ou pelo procedimento manual.

Equação de regressão linear	$C_p = 1,031 \times C_m - 0,045$
(coeficiente de correlação)	(r = 0,9976)
Desvio Relativo (mínimo; máximo)	-2,66; +2,21
Teste t de Student emparelhado ^a	1,57

^a O valor de t crítico para um teste t de Student bicaudal, para um nível de confiança de 95 % e 17 graus de liberdade é 2,11.

Tabela 5.5

Resultados (mg L⁻¹) obtidos na determinação CuS em amostras de referência certificadas (SerionormTM).

Amostra de Referência “lote MI0181”			Amostra de Referência “lote NO0371”		
Resultados (média ± dp; n = 2)		Valor certificado	Resultados (média ± dp; n = 2)		Valor certificado
Sistema de fluxo	Procedimento manual	1,19 ± 0,10	Sistema de fluxo	Procedimento manual	2,20 ± 0,02
1,20 ± 0,05	1,22 ± 0,05		2,23 ± 0,05	2,20 ± 0,02	

5.3.2.2 Determinação de CuS (módulo II)

Verificou-se que o sinal analítico obtido na análise da solução “branco da amostra” não diferia do ruído instrumental do espectrofotômetro de absorção atômica, indicando que o pré-tratamento da amostra era não só simples e rápido, como também não constituía um factor de variabilidade analítica apreciável.

Depois de otimizado, o módulo II do sistema de fluxo permitia obter uma resposta linear até uma concentração de 300 µg L⁻¹ e um limite de detecção de 0,67 µg L⁻¹

(3σ , $n = 10$) (Thompson *et al.*, 2002). O consumo de amostra era de cerca de 7 mL. A função de calibração típica, calculada também através da média aritmética dos valores do declive e da ordenada na origem de cinco equações de curvas de calibração independentes (cada uma com 7 pontos de calibração), obtidas durante os ensaios finais de validação do método, era representada por $S = 0,1014 C - 0,0378$ ($r = 0,9998$), em que S representa a altura do sinal analítico, expressa em cm, e C a concentração de CuU, expressa em $\mu\text{g L}^{-1}$. Tal como já anteriormente se referiu, este módulo tinha um rendimento analítico de 12 determinações h^{-1} .

O cálculo da média aritmética dos valores do declive de cinco curvas de calibração obtidas durante os ensaios finais de validação do método e respectivo coeficiente de variação ($0,1014 \pm 0,0036$; $\text{CV}\% = 3,5\%$) permitiu concluir que a sensibilidade do sistema desenvolvido para a determinação da concentração de CuU, tal como já se tinha verificado para a determinação do CuS, não variava de modo significativo ao longo do tempo.

Para avaliar a precisão, atendeu-se, também neste caso, à repetibilidade e à reprodutibilidade. A repetibilidade foi avaliada através do valor do $\text{CV}\%$ obtido para 10 determinações consecutivas de três soluções padrão, e foi de 2,5% ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), 0,90% ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e 1,6% ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores do $\text{CV}\%$ calculados a partir da análise das mesmas soluções padrão em cinco dias consecutivos (reprodutibilidade) foram de 4,0% ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), 3,2% ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e 2,9% ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Estes resultados indicam que o sistema de fluxo apresentava uma boa precisão analítica também na análise de CuU (módulo II).

A avaliação da exactidão fez-se por comparação dos resultados obtidos na análise de amostras de urina ($n = 18$) usando a metodologia analítica desenvolvida ou um procedimento de referência, os quais são apresentados na Tabela 5.6. Uma análise estatística idêntica à realizada na determinação de CuS, mostrou que estes não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre si (Tabela 5.7 e Figura

5.8). Ainda para caracterizar o sistema de fluxo desenvolvido relativamente à exactidão, também se procedeu à determinação de CuU em amostras de referência certificadas (Tabela 5.8). Os resultados vieram comprovar que o sistema de fluxo desenvolvido era suficientemente exacto para cumprir o objectivo analítico em causa: a determinação de Cu em amostras de urina.

Tabela 5.6

Comparação dos resultados ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidos na determinação de CuU ($n = 18$), usando o sistema de fluxo proposto (EAA/chama) ou o procedimento de referência (ICP-MS).

Amostra	Sistema de fluxo desenvolvido (média $\pm$ dp ^a)	Procedimento de referência (média $\pm$ dp ^a)	Desvio Relativo ^b
1	12,89 $\pm$ 1,02	12,78 $\pm$ 0,42	+0,86
2	6,39 $\pm$ 0,00	6,42 $\pm$ 0,65	-0,47
3	11,93 $\pm$ 0,34	14,46 $\pm$ 0,03	-17,50
4	9,87 $\pm$ 0,55	11,92 $\pm$ 0,23	-17,20
5	20,84 $\pm$ 3,41	24,82 $\pm$ 0,08	-16,04
6	21,01 $\pm$ 1,48	20,37 $\pm$ 0,69	+3,14
7	25,76 $\pm$ 1,10	24,19 $\pm$ 2,40	+6,49
8	44,36 $\pm$ 1,10	47,71 $\pm$ 1,53	-7,02
9	37,64 $\pm$ 1,26	32,36 $\pm$ 1,08	+16,32
10	41,47 $\pm$ 1,31	47,93 $\pm$ 0,98	-13,48
11	62,18 $\pm$ 4,38	59,89 $\pm$ 0,21	+3,82
12	40,44 $\pm$ 1,43	46,00 $\pm$ 0,01	-12,09
13	47,49 $\pm$ 2,85	51,41 $\pm$ 2,39	-7,62
14	74,58 $\pm$ 5,48	72,58 $\pm$ 0,74	+2,76
15	83,11 $\pm$ 2,19	76,74 $\pm$ 0,34	+8,30
16	79,56 $\pm$ 4,15	77,51 $\pm$ 3,55	+2,64
17	103,02 $\pm$ 2,07	101,80 $\pm$ 0,85	+1,20
18	111,81 $\pm$ 2,07	118,30 $\pm$ 1,70	-5,49

^a A “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de duas determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão, calculado de acordo com o descrito no Capítulo 2.

^b O cálculo do desvio relativo, expresso em percentagem, foi efectuado com base na expressão $[(C_p - C_r)/C_r] \times 100$, em que C_p representa o valor de concentração obtido com o sistema de fluxo proposto e C_r o valor de concentração obtido pelo procedimento de referência (ICP-MS).

Tabela 5.7

Resumo da comparação dos resultados obtidos na determinação de CuU (n = 18) por EAA/chama com o sistema de fluxo proposto e pelo procedimento de referência.

Equação de regressão linear	$C_p = 1,001 \times C_r + 0,786$
(coeficiente de correlação)	(r = 0,9932)
Desvio Relativo (mínimo; máximo)	-17,50; +16,32
Teste de t de Student emparelhado ^a	0,80

^a O valor de t crítico para um teste t de Student bicaudal, para um nível de confiança de 95 % e 17 graus de liberdade é 2,11.

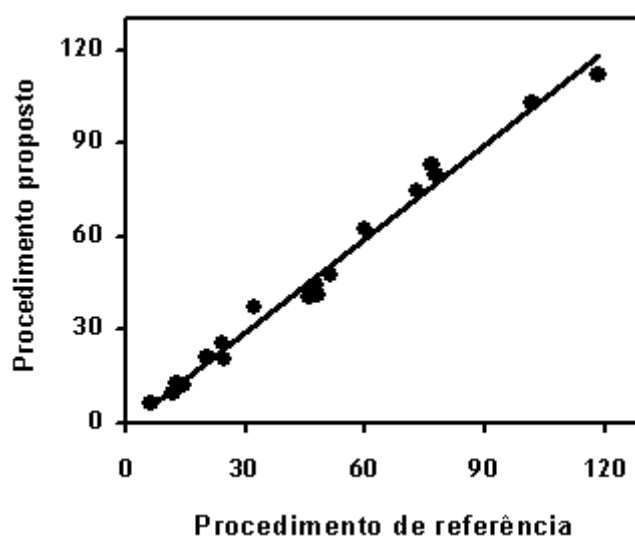


Figura 5.7

Regressão linear entre os resultados obtidos na determinação de CuU (n = 18) pelo procedimento proposto (EAA/Chama; pré-concentração) e pelo procedimento de referência (ICP-MS; simples diluição).

Tabela 5.8

Resultados ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidos na determinação CuU na amostra de referência certificada (Seronorm™).

Amostra de Referência "NO2525"		
	Resultados obtidos (média $\pm$ dp; n = 2)	Valor certificado
Sistema de fluxo	Procedimento manual	16,1 $\pm$ 1,4
15,9 $\pm$ 1,2	15,8 $\pm$ 1,3	

5.4. Conclusões

O sistema de fluxo desenvolvido e avaliado neste trabalho apresentava com principal vantagem o facto de permitir a determinação de Cu por EAA/chama, de um modo exacto e preciso, tanto em amostras de soro como de urina. As duas determinações, envolvendo estratégias analíticas diferentes (mistura 1+1 das amostras de soro com água ultrapura; pré-concentração das amostras de urina), eram efectuadas sem ser necessário realizar nenhuma alteração na configuração do sistema de fluxo. De notar que o sistema de fluxo desenvolvido, construído com base em dispositivos facilmente disponíveis e de baixo custo, foi aplicado à determinação de Cu em amostras nas quais aquele elemento se encontra em níveis de concentração muito diferentes (mg L^{-1} nas amostras de soro e $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de urina). A base de operação do sistema assentava no redireccionamento do fluxo das soluções dentro do mesmo. Para tal, recorreu-se a um *software* especialmente desenvolvido para o efeito, que era capaz de controlar individualmente, e em conjunto, os principais dispositivos que compunham o sistema de fluxo — micro-bombas solenóides e válvulas solenóides de 3-vias. A flexibilidade do sistema de fluxo desenvolvido era devida à sua configuração modular e também às estratégias de fluxo e de amostragem que foram utilizadas em cada módulo: multicomutação e amostragem binária, no módulo I; multi-impulsão e *merging zones*, no módulo II. Estes dois módulos possibilitaram a criação de dois canais independentes para cada um dos dois tipos de amostra (i.e., as amostras de soro e de urina percorriam um trajecto diferente no seu percurso até ao detector) e eram facilmente adaptados às necessidades analíticas, por exemplo, em termos de definição dos caudais e dos volumes de solução apenas através de controlo informático (ajuste das variáveis de programação). Assim, a determinação de CuS podia ser efectuada durante a etapa de pré-concentração do CuU, o que representa uma significativa economia de tempo e de recursos, uma vez que em cada ciclo analítico se determinava a concentração de Cu em dois tipos de amostras diferentes,

com níveis de concentração muito diferentes, utilizando o mesmo detector. Em resumo, e em termos práticos, o procedimento analítico desenvolvido permitia dar resposta a uma solicitação frequente nos laboratórios de Química Clínica — a determinação de Cu no soro e na urina do mesmo doente — recorrendo a uma técnica instrumental muito difundida e acessível: a espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama.

5.5. Bibliografia

- Aggarwal, S.K., Kinter, M. e Herold, D.A. (1991). Determination of copper in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. **194**: 140-145.
- Alcock, N.W. (1996). Trace elements. In: L.A. Kaplan e A.J. Pesce (eds.), *Clinical chemistry - Theory, analysis and correlation*. Mosby-Year Book Inc. Missouri.
- Almeida, A.A., Jun, X. e Lima, J.L.F.C. (2000). Flame AAS determination of copper in urine using a flow injection on-line preconcentration system based on a polyamine chelating ion Exchange column. *Atomic Spectroscopy*. **21**: 187-193.
- Almeida, A.A. e Lima, J.L.F.C. (2001). Optimized conditions and analytical performance for the determination of Cu in serum and urine samples using a single GFAAS procedure. *Atomic Spectroscopy*. **22**: 324-330.
- Blain, S., Appriou, P. e Handel, H. (1993). Preconcentration of trace metals from sea water with the chelating resin Chelamine. *Analytica Chimica Acta*. **272**: 91-97.
- Brown, A.A. e Taylor, A. (1984). Determination of copper and zinc in serum and urine by use of a slotted quartz tube and flame atomic-absorption spectrometry. *Analyst*. **109**: 1455-1459.
- Dube, P. (1988). Automated direct determination of copper in urine and whole blood by Zeeman-corrected atomic absorption spectrometry. *Atomic Spectroscopy*. **9**: 55-58.
- Flanjak, J. e Hodda, A. (1985). Determination of cadmium, copper and lead in urine by flame atomic absorption spectrometry after extraction of the iodide complexes as ion-pairs with tri-n-octylamine. *Analytica Chimica Acta*. **172**: 313-316.
- Giné, M.F., Packer, A.P., Blanco, T. e Reis, B.F. (1996). Flow system based on a binary sampling process for automatic dilutions prior to flame atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **323**: 47-53.
- Halls, D.J., Fell, G.S. e Dunbar, P.M. (1981). Determination of copper in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. **114**: 21-27.
- Hornig, C.J. (1996). Simultaneous determination of urinary zinc, cadmium, lead and copper concentrations in steel production workers by differential-pulse anodic stripping voltammetry. *Analyst*. **121**: 1511-1514.
- Jerónimo, P.C.A., Araújo, A.N., Montenegro, M.C.B.S.M., Pasquini, C. e Raimundo Jr, I.M. (2004). Direct determination of copper in urine using a sol-gel optical sensor coupled to a multicommutated flow system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **380**: 108-114.

Lima, J.L.F.C., Santos, J.L.M., Dias, A.C.B., Ribeiro, M.F.T. e Zagatto, E.A.G. (2004). Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta*. **64**: 1091-1098.

Marshall, J. e Ottaway, J.M. (1983). Determination of copper in urine by carbon-furnace atomic emission spectrometry. *Talanta*. **30**: 571-575.

Milne, D.B. (1994). Trace elements. Em: C.A. Burtis e E.R. Ashwood (eds.), *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders. Philadelphia.

Morales, A. e Valladares, L. (1989). Extraction-spectrophotometric determination of microamounts of copper as the ternary bis-(2,2'-biquinolyl)-copper(I) picrate complex. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **334**: 53-55.

Nixon, D.E., Moyer, T.P., Johnson, P., McCall, J.T., Ness, A.B., Fjerstad W.H. e Wehde, M.B. (1986). Routine measurement of calcium, magnesium, copper, zinc, and iron in urine and serum by inductively coupled plasma emission spectroscopy. *Clinical Chemistry*. **32**: 1660-1665.

Reis, B.F., Giné, M.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C. e Lapa, R.A.S. (1994). Multicommution in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta*. **293**: 129-138.

Rocha, F.R.P., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Lapa, R.A.S. e Santos, J.L.M. (2002). Multicommution in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*. **468**: 119-131.

Ruzicka, J. e Hansen, E.H. (1980). Flow injection analysis: principles, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*. **114**: 19-44.

Szpunar, J., Bettmer, J., Robert, M., Chassaigne, H., Cammann, K., Lobinski, R. e Donard, O.F.X. (1997). Validation of the determination of copper and zinc in blood plasma and urine by ICP MS with cross-flow and direct injection nebulisation. *Talanta*. **44**: 1389-1396.

Tahán, J.E., Granadillo, V.A. e Romero, R.A. (1994). Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Al, Cu, Fe, Pb, V and Zn in clinical samples and in certified environmental reference materials. *Analytica Chimica Acta*. **295**: 187-197.

Toffaletti, J.G. e Jones, P.J. (1992). Electrolytes. Em: M.L. Bishop, J.L. Duben-Engelkirk e E.P. Fody (eds.), *Clinical chemistry - Principles, procedures and correlations*. J.B. Lippincott. Philadelphia.

Thompson, M., Ellison, S.L.R. e Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*. **74**: 835-855.

Wang, S.T. e Demshar, H.P. (1993). Rapid Zeeman atomic absorption determination of copper in serum and urine. *Clinical Chemistry*. **39**: 1907-1910.

Woo, J. e Cannon, D.C. (1984). Metabolic intermediates and inorganic ions. Em: J.B. Henry (ed.), *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. W.B. Saunders. Philadelphia.

Xu, S., Sperling, M. e Welz, B. (1992). Flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium and copper in biological reference materials using on-line sorbent extraction preconcentration. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **344**: 535-540.

A decorative graphic consisting of several overlapping squares in shades of gray and black, positioned to the left of the chapter title.

Capítulo

6

Determinação de Rh, Pd e Pt
em amostras de urina por ICP-MS

6. Determinação de Rh, Pd e Pt em amostras de urina por ICP-MS

6.1. Introdução

Os elementos do grupo da platina - abreviadamente PGEs (do inglês, *Platinum Group Elements*), compreendem a platina (Pt), o paládio (Pd), o irídio (Ir), o ósmio (Os), o ródio (Rh) e o ruténio (Ru). Juntamente com o ouro e a prata, os PGEs constituem os chamados metais preciosos ou metais nobres.

A emissão de PGEs para o meio ambiente e consequentemente a sua bioacumulação tem aumentado consideravelmente em resultado da sua utilização em variadas actividades industriais.

Actualmente, a actividade que mais contribui para a emissão de PGEs para o meio ambiente, particularmente de Pt, Pd e Rh, é a utilização de veículos automóveis. De facto, estes elementos são utilizados nos conversores catalíticos existentes nos sistemas de exaustão dos veículos, e o seu uso generalizou-se nas duas últimas décadas a fim de se reduzirem as emissões de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de azoto para a atmosfera (Begerow *et al.*, 1997a; Bencs *et al.*, 2003; Benkhedda *et al.*, 2003; Ravindra *et al.*, 2004). Os gases resultantes da combustão, ao fluírem pelo conversor catalítico a uma temperatura elevada, acabam por provocar a sua abrasão e, deste modo, a libertação de PGEs para o meio ambiente (Bencs *et al.*, 2003).

Os PGEs são igualmente utilizados como catalisadores em inúmeras reacções químicas (Begerow *et al.*, 1997a; Benkhedda *et al.*, 2003). Por esse motivo, podem aparecer resíduos destes elementos metálicos em medicamentos, alimentos e noutros produtos utilizados diariamente, o que também contribui para a sua

libertação para o meio ambiente e para a sua bioacumulação (Begerow *et al.*, 1997a; Benkhedda *et al.*, 2003).

Na literatura, encontra-se ainda referenciado o aumento da concentração de PGEs nos fluidos e tecidos corporais em resultado da sua libertação a partir de materiais dentários (Begerow *et al.*, 1997a), para além da exposição ocupacional, como acontece no caso dos trabalhadores das indústrias de refinação de metais preciosos (Ravindra *et al.*, 2004).

Do ponto de vista laboratorial, a determinação de PGEs apresenta bastantes dificuldades. Estas estão essencialmente relacionadas com a sua baixa concentração nas amostras com interesse analítico - amostras ambientais (por exemplo, fumos de exaustão dos veículos automóveis ou vegetação) e amostras clínicas (por exemplo, sangue e urina) - e também com a complexidade das próprias matrizes (Balcerzak, 1997; Bencs *et al.*, 2003; Benkhedda *et al.*, 2003). De facto, a concentração de PGEs neste tipo de amostras, normalmente na gama dos ng L⁻¹ ou dos pg L⁻¹, é muito inferior ao limite de detecção das técnicas analíticas de utilização mais comum para a determinação de metais, o que implica o recurso a demorados e complexos processos de pré-tratamento das amostras (Balcerzak, 1997; Bencs *et al.*, 2003; Benkhedda *et al.*, 2003).

Com o aparecimento de técnicas analíticas dotadas de maior sensibilidade e selectividade aumentou também o interesse da comunidade científica pela determinação de PGEs em amostras clínicas (fluidos e tecidos corporais), com o intuito de avaliar os potenciais riscos que estes elementos poderão apresentar para a saúde humana. Daí tem resultado que, apesar de durante muito tempo os PGEs terem sido considerados inócuos, tanto para o ambiente como para o Homem, pelo facto da sua forma metálica ser quimicamente muito inerte (Begerow *et al.*, 1997a; Ravindra *et al.*, 2004), actualmente, fruto de uma investigação mais aprofundada, estejam já evidenciados alguns efeitos tóxicos provocados pelos PGEs. Sabe-se que diversos compostos contendo PGEs apresentam propriedades carcinogénicas e genotóxicas e

constituem potentes alergénios, como é, por exemplo, o caso de alguns sais de Pt que são responsáveis pelo aparecimento de variadas reacções alérgicas (dermatite de contacto, rinite, conjuntivite, asma, urticária, etc.) (Begerow *et al.*, 1997a; Bencs *et al.*, 2003; Benkhedda *et al.*, 2003; Ravindra *et al.*, 2004). Os PGEs aparecem ainda associados a outros problemas como, por exemplo, casos de aborto espontâneo, náuseas e alopecia (Ravindra *et al.*, 2004).

Embora na literatura se encontre referência à utilização de técnicas diversas para a determinação de PGEs (Balcerzak, 1997; Barefoot e Van Loon, 1999; Bencs *et al.*, 2003; Qu, 1996), as mais utilizadas são claramente a espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (EAA/EA) (Begerow *et al.*, 1997a; Costa *et al.*, 2002), a técnica de ICP-AES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) (Fan *et al.*, 2004; Pohl *et al.*, 2005) e, especialmente, a técnica de ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) (Benkhedda *et al.*, 2003; Begerow *et al.*, 1997b; Krachler *et al.*, 1998; Wang e Hansen, 2001; Rodushkin *et al.*, 2004; Bocca *et al.*, 2004; Petrucci *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 1995). As técnicas que competem com estas em termos de sensibilidade são a voltametria adsorptiva e a análise por activação neutrónica (Balcerzak, 1997). Porém, apesar da voltametria adsorptiva apresentar elevada sensibilidade para a determinação de Pt, é muito afectada pela composição da matriz; e a análise por activação neutrónica, embora permita obter limites de detecção muito baixos, requer que se tenha acesso a um reactor nuclear, o que não é praticável em termos de análise clínico-toxicológica de rotina.

Pelas suas características, a técnica de ICP-MS acaba assim por ser considerada a mais adequada para a determinação de PGEs em amostras biológicas. Dessas características, salientam-se os muito baixos limites de detecção, o amplo intervalo de concentrações em que se obtém uma resposta instrumental linear, a possibilidade de se efectuar uma análise multi-elementar num curto período de tempo (podem determinar-se cerca de 75 elementos em apenas 5-6 minutos) e a possibilidade de se

efectuar análise isotópica (Balcerzak, 1997). Contudo, a ocorrência de interferências espectrais e não espectrais frequentemente prejudica a precisão e a exactidão dos resultados obtidos (Balcerzak, 1997). No que respeita à determinação de PGEs em amostras biológicas, nomeadamente a determinação de Rh, Pd e Pt em amostras de urina, são várias as interferências de ambos os tipos que se podem esperar.

As interferências espectrais reflectem-se na medida da corrente de iões do analito e geralmente traduzem-se num desvio positivo da magnitude do sinal analítico (Taylor, 2001). Este tipo de interferências é praticamente devido à sobreposição isobárica (Taylor, 2001). A sobreposição isobárica pode ser isotópica (por exemplo, $^{64}\text{Zn} / ^{64}\text{Ni}$), poliatómica (formação de espécies moleculares, por exemplo, $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+ / ^{78}\text{Se}^+$) ou devida à formação de espécies iónicas de carga múltipla (por exemplo, $^{208}\text{Pb}^{2+} / ^{104}\text{Ru}^+$) (Taylor, 2001). O efeito das interferências isobáricas faz-se sentir especialmente nos equipamentos de ICP-MS de menor resolução, mais vulgarmente utilizados, os ICP-MS com um analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo (Q-ICP-MS).

Como é sabido, um espectrómetro de massa possui um filtro capaz de isolar, a partir de um feixe de iões diferentes (amostra), todos aqueles que possuam uma relação massa/carga (m/z) igual (analito). Depois, o feixe de iões com igual razão m/z assim obtido é encaminhado para o detector (geralmente do tipo “multiplicador de electrões”), o qual é capaz de transformar a corrente iónica numa corrente eléctrica correspondente, de que resulta um sinal proporcional à concentração do analito na amostra.

Como já foi referido no Capítulo de Introdução a esta dissertação, o analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo consiste em quatro barras cilíndricas dispostas paralelamente numa configuração simétrica. Fazendo variar de modo contínuo o potencial eléctrico e de radiofrequência aplicados às barras do analisador permite-se a passagem sequencial de iões com diferentes valores de m/z , o que resulta no que vulgarmente se designa por “varrimento de massas”. Este tipo de espectrómetro de

massa apresenta várias vantagens, das quais se salientam a simplicidade do seu funcionamento, a excelente estabilidade, a facilidade de operação e o relativamente baixo custo de aquisição (Taylor, 2001). No entanto, o poder de resolução deste equipamento, ou seja, a capacidade de separação de regiões contíguas do espectro de massas (i.e., regiões com um valor de m/z próximo) é apenas de cerca de uma unidade de massa atômica, i.e., 1 *uma* (Taylor, 2001). Por este motivo, pode ocorrer sobreposição do sinal do analito com os sinais de outros iões, especialmente com aqueles cuja relação m/z difira da do analito em menos de 0,5 *uma* (Balcerzak, 1997).

No caso deste trabalho, como exemplos de interferências isobáricas, podem citar-se:

i) para o ^{102}Pd : ^{102}Ru ; ii) para o ^{103}Rh : $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}$, $^{68}\text{Zn}^{35}\text{Cl}$, $^{206}\text{Pb}^{2+}$; iii) para o ^{104}Pd : $^{208}\text{Pb}^{2+}$, ^{104}Ru ; iv) para o ^{105}Pd : $^{40}\text{Ar}^{65}\text{Cu}$; v) para o ^{106}Pd : ^{106}Cd , $^{40}\text{Ar}^{66}\text{Zn}$; vi) para o ^{108}Pd : ^{108}Cd ; vii) para o ^{110}Pd : ^{110}Cd e viii) para o ^{195}Pt : $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}$ (Begerow *et al.*, 1997b; Bocca *et al.*, 2004; Krachler *et al.*, 1998; May e Wiedmeyer, 1998; Perry *et al.*, 1995; Taylor, 2001).

As interferências não espectrais podem ser de natureza química ou física, e afectam grandemente a exactidão e a precisão analíticas (Taylor, 2001). Este tipo de interferências pode reflectir-se tanto no aumento como na supressão do sinal analítico (Taylor, 2001). As interferências não espectrais estão essencialmente relacionadas com a composição da matriz, nomeadamente com a concentração total de sólidos dissolvidos na amostra e com a presença de elementos facilmente ionizáveis (Taylor, 2001).

A urina é um exemplo de um tipo de amostra cuja análise está muito sujeita a interferências não espectrais, uma vez que possui uma elevada concentração de cloreto de sódio. Quanto maior for a concentração total de sólidos dissolvidos na amostra maior será a variação do sinal analítico ao longo do tempo (o chamado *drift* instrumental). Este problema está directamente relacionado com o depósito de sais no cone de amostragem, na medida em que, ao diminuir o diâmetro do orifício

central por onde passa a corrente de iões, diminui a transmissão de iões do plasma para o espectrómetro de massa e, consequentemente, o sinal analítico obtido. Geralmente, quando a concentração de sólidos dissolvidos na amostra excede os 2 mg L⁻¹, dependendo das características do equipamento utilizado (em particular do tipo de nebulizador e câmara de nebulização), podem prever-se problemas relacionados com a estabilidade do sinal analítico ao longo do tempo.

Como já foi referido, a presença na amostra de elementos facilmente ionizáveis, particularmente elementos do grupo I (metais alcalinos) e do grupo II (metais alcalino-terrosos), também prejudica os resultados da análise, sendo um dos tipos de interferências não espectrais. De facto, a presença na amostra de elementos facilmente ionizáveis suprime a ionização de elementos que tenham um potencial de ionização mais elevado (Taylor, 2001). No caso da determinação de PGEs em amostras de urina, o sinal analítico obtido para o Rh, o Pd e a Pt (potenciais de ionização de 7,46; 8,34 e 9 eV, respectivamente) iria ser prejudicado pela ionização preferencial do sódio (potencial de ionização = 5,139 eV) (Taylor, 2001).

São conhecidas várias propostas/estratégias para obviar o problema que as interferências espectrais e não espectrais colocam à determinação de elementos vestigiais e ultravestigiais por ICP-MS, sendo que estas estratégias se podem utilizar individualmente ou em simultâneo. No caso das interferências espectrais pode referir-se, a título de exemplo, a utilização de um espectrómetro de massa de sector magnético (alta resolução), a utilização de células de reacção/colisão ou a modificação das condições do plasma, por exemplo, por utilização de tochas com um design especial (com protecção, do inglês *shielded torch*). No caso das interferências não espectrais, temos como soluções possíveis a diluição das amostras, a adição de um padrão interno, a eliminação prévia de sólidos dissolvidos ou a utilização de soluções de calibração que simulem a composição da matriz, sendo que, neste último caso, há a salientar o facto de ser necessário efectuar calibrações frequentes para se

conseguir manter a exactidão dos resultados, o que o torna um processo pouco prático, em virtude de ser bastante mais demorado (Taylor, 2001).

Relativamente às várias estratégias possíveis para eliminar as interferências espectrais e não espectrais, algumas das quais acima referidas, há a realçar o facto de muitas delas envolverem modificações na configuração original do equipamento, o que implica a aquisição de mais dispositivos, sendo por isso pouco económicas. À partida, a estratégia de mais baixo custo passa pela separação do analito dos restantes constituintes da amostra.

Neste sentido, no trabalho que se apresenta neste Capítulo, desenvolveu-se um sistema de fluxo do tipo análise por injeção sequencial (SIA, do inglês, *Sequential Injection Analysis*) de modo a tornar possível a determinação de Rh, Pd e Pt em amostras de urina por Q-ICP-MS sem se alterar a configuração de base do equipamento utilizado (i.e., mantendo-se o nebulizador, câmara de nebulização, tocha e cones com que foi originalmente comercializado, e que já foram descritos no Capítulo 2). Neste sistema foi incorporada uma coluna contendo uma resina do tipo pentamina - a Metalfix™ Chelamine™ - a qual, nas condições experimentais que foram utilizadas, retinha preferencialmente os PGEs em estudo, o que permitia efectuar a sua pré-concentração a partir das amostras de urina e simultaneamente eliminar as espécies interferentes.

A opção por um sistema de fluxo do tipo SIA teve por base as suas características particulares, referidas no trabalho de Economou (Economou, 2005) e algumas delas já relatadas no Capítulo de Introdução a esta dissertação, e também os objectivos estabelecidos para este trabalho. Pelo facto de os sistemas de SIA constituírem sistemas de fluxo de baixo custo mas dotados de grande versatilidade, robustez e facilidade de controlo, a sua utilização revela-se vantajosa na automatização de procedimentos analíticos complexos. Um sistema de SIA típico, composto apenas por um dispositivo propulsor e uma válvula selectora de fluidos, permite, simplesmente através de controlo electrónico, definir o volume, o caudal e o sentido de

escoamento das soluções, sem ser necessário efectuar uma reconfiguração física do mesmo (Ruzicka, 1992). Esta facilidade de controlo dos sistemas de SIA é muito vantajosa, particularmente no caso de trabalhos como este, em que o sistema de fluxo incorpora uma coluna de pré-concentração, pois permite que, utilizando a mesma unidade propulsora (bomba peristáltica) e sem alterar a configuração do sistema, seja possível fazer a eluição da coluna de modo reverso, i.e., no sentido oposto ao do fluxo durante a etapa de pré-concentração, o que é genericamente aceite como uma estratégia vantajosa para se limitar a dispersão e aumentar a sensibilidade analítica (Xu *et al.*, 1992).

6.2. Experimental

6.2.1. Instrumentação

Para a determinação dos PGEs por ICP-MS utilizou-se um equipamento da marca VG Elemental, modelo PlasmaQuad® 3, já descrito no Capítulo 2. As condições instrumentais eram optimizadas diariamente, de modo a se conseguir a melhor sensibilidade e estabilidade. Para tal, procedia-se à monitorização do sinal analítico obtido para os isótopos ^{115}In , ^{103}Rh , ^{105}Pd e ^{195}Pt durante a introdução contínua de uma solução multi-elemento com uma concentração de $1\ \mu\text{g L}^{-1}$. Esta monitorização, para cada elemento, compreendia a avaliação do número de contagens por segundo e do valor de coeficiente de variação (CV%) calculado com base nas últimas 5 leituras consecutivas, ambos determinados automaticamente pelo *software* de controlo do equipamento (PlasmaLab®). O *software* PlasmaLab®, instalado num computador pessoal, controlava todo o equipamento e fazia a aquisição e o processamento dos dados. Na Tabela 6.1 são apresentadas as condições instrumentais seleccionadas para este trabalho. De salientar, porém, que apenas se apresentam aquelas que se mantiveram inalteradas ao longo da utilização do equipamento, excluindo-se

parâmetros como o potencial eléctrico aplicado às lentes iónicas e a posição da tocha, que eram ajustados diariamente. Para efectuar a drenagem da câmara de nebulização durante o funcionamento do equipamento foi utilizada uma bomba peristáltica da marca Gilson®, modelo Minipuls™ 3. Em cada ciclo analítico, procedia-se à monitorização do sinal obtido para os isótopos ^{103}Rh , ^{105}Pd e ^{195}Pt , para a quantificação dos respectivos elementos na amostra, e também do sinal obtido para o isótopo ^{115}In , que funcionava como padrão interno, para efeitos de correcção da variação da sensibilidade durante a análise.

Tabela 6.1

Condições instrumentais do equipamento de ICP-MS.

Caudal do árgon	13 L min ⁻¹ (Plasma)
	0,7 L min ⁻¹ (Auxiliar)
	0,87 L min ⁻¹ (Nebulizador)
Potência da radiofrequência	1350 W
Modo de operação/aquisição do sinal analítico	Transiente - TRA (do inglês, <i>Transient - Time Resolved Analysis</i>)
<i>Dwell time</i> ^a	100 ms
Tempo total da aquisição	411 ms

^a *Dwell time* é o período de tempo durante o qual o espectrómetro de massa separa e detecta uma determinada *m/z* em particular (i.e., o tempo de integração).

Na construção do sistema de fluxo (Figura 6.1) utilizou-se uma válvula multi-posição selectora de fluidos (V_SIA), com 8 portas, da marca Crison, módulo VA 2 SN; duas bombas peristálticas da marca Gilson®, modelo Minipuls™ 3, equipadas com tubos de impulsão de PVC de 0,76 mm de diâmetro interno (no caso da BP_1, responsável pelo aporte constante de água ao nebulizador do equipamento de ICP-MS) e de 2,06 mm de diâmetro interno (no caso da BP_2, responsável pela gestão de fluidos do sistema de SIA propriamente dito); duas válvulas solenóides de 3-vias da marca NResearch®

Inc., modelo 161T031; tubos de Teflon[®], da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm; uma placa de aquecimento, da marca Velp Scientifica[®], modelo Arex; ligadores e uma coluna de Perspex[®] de construção laboratorial, com 3 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno (Almeida *et al.*, 2000).

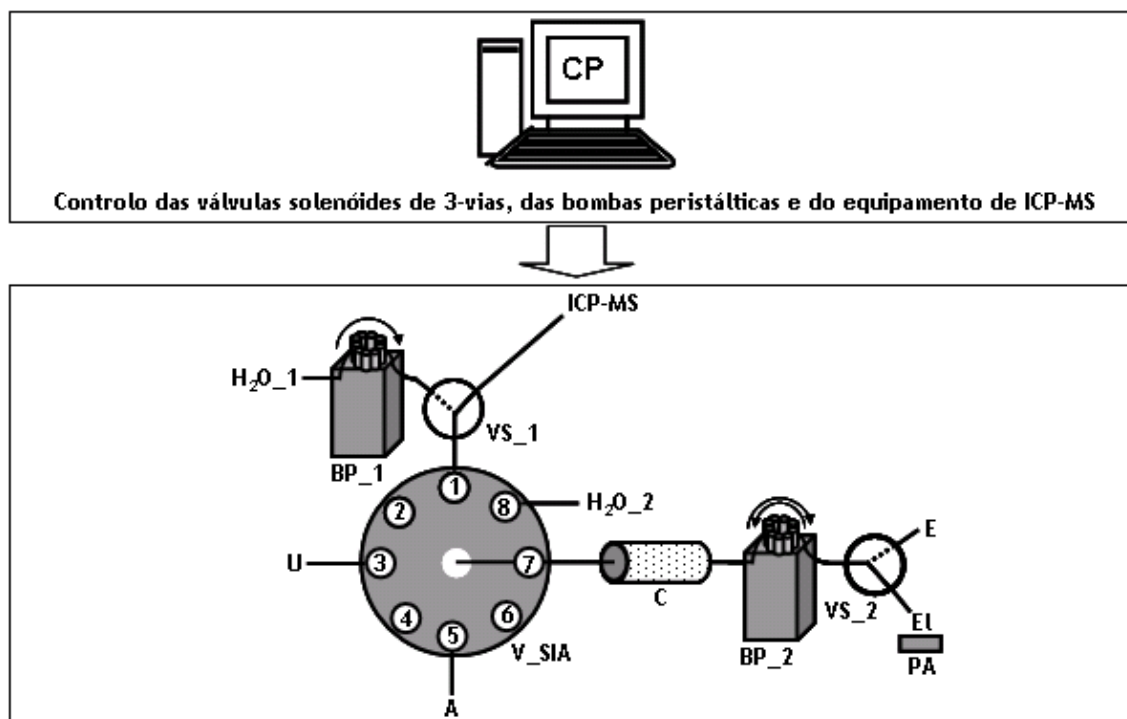


Figura 6.1

Representação esquemática do sistema de fluxo usado para a determinação de Rh, Pd e Pt em urina por ICP-MS. Legenda - H₂O_1 - H₂O_2: água ultrapura; VS_1 - VS_2: válvulas solenóides de 3-vias (linha contínua: solenóide activado - posição 1; linha tracejada: solenóide desactivado - posição 0); BP_1 - BP_2: bombas peristálticas; U: amostra de urina; A: ar; V_SIA: válvula multi-posição selectora de fluidos; C: coluna de pré-concentração; E: esgoto; El: eluente; PA: placa de aquecimento; ICP-MS: equipamento de detecção; CP: computador pessoal.

O controlo do sistema de fluxo foi efectuado por intermédio de um computador pessoal, equipado com uma interface activa da marca Advantech[®], modelo PC-LABCard[™] PCL-711B.

A digestão das amostras por via húmida foi efectuada num forno de microondas da marca Milestone, modelo MLS-1200 Mega, equipado com um rotor do tipo HPR-1000/10 S.

6.2.2. Material e Reagentes

Na preparação de todas as soluções utilizou-se sempre água ultrapura.

Com excepção do HNO_3 e do HCl , que eram de qualidade *Suprapur*[®] (Merck), todos os reagentes utilizados eram de qualidade *GR for analysis* (Merck).

As soluções de calibração foram preparadas por diluição adequada de soluções padrão comerciais (Fluka) de Rh, Pd e Pt (1000 mg L^{-1}), com água-régia $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de água-régia foi preparada por mistura de 1 parte de HNO_3 concentrado e de 3 partes de HCl concentrado. A solução assim preparada apresentava uma concentração final de H^+ de $10,8 \text{ mol L}^{-1}$, e era utilizada para obtenção de soluções ácidas mais diluídas.

Para a preparação de todas as soluções contendo HNO_3 utilizou-se uma solução comercial de HNO_3 concentrado (65% m/m). Para a preparação de todas as soluções contendo HCl utilizou-se uma solução de HCl concentrado (30% m/m). Ambas eram comercializadas pela Merck.

Nas extremidades da coluna de pré-concentração colocaram-se filtros de Teflon[®] com $35 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro de poro, da marca MoBiTec. O enchimento da coluna foi efectuado com a resina Metalfix[™] Chelamine[™], comercializada pela Fluka, a qual, como já foi referido no Capítulo 5, é uma resina quelante produzida por imobilização de um ligando do tipo pentamina (a tetraetilenopentamina) num polímero orgânico (a poliácridamida reticulada) (Blain *et al.*, 1993), e se apresentava na forma de partículas com $40\text{-}80 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro.

O eluente foi preparado por dissolução de uma massa adequada de tioureia (Merck) em água ultrapura, à qual se adicionava posteriormente o volume necessário de uma

solução padrão de In (comercializada pela Fluka; concentração de 1000 mg L^{-1}) de modo a se obter uma concentração final de In de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliar se a presença de outros metais na amostra de urina poderia afectar a determinação de Rh, Pd e Pt, preparou-se uma solução (“urina artificial”), cuja composição se encontra descrita na literatura (Wang *et al.*, 2001), e que continha: 134 mmol L^{-1} de Na^+ , 67 mmol L^{-1} de K^+ , $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca^{2+} , $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Mg^{2+} , $19,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato, 122 mmol L^{-1} de Cl^- , 310 mmol L^{-1} de ureia e $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de creatinina. Posteriormente, adicionou-se o volume necessário de soluções padrão comerciais (BDH; concentração de 1000 mg L^{-1}) de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn até se obter a concentração final de 10 mg L^{-1} para cada um destes elementos. Por fim, dividiu-se a solução assim preparada em alíquotas de 100 mL, às quais se adicionaram pequenos volumes pré-definidos de uma solução padrão de Rh, Pd e Pt. As amostras de urina foram colhidas em recipientes de polietileno adequadamente descontaminados por lavagem ácida e refrigeradas até à sua análise. Algumas foram posteriormente dopadas com pequenos volumes de uma solução concentrada de Rh, Pd e Pt.

6.2.3. Sistema de fluxo

O sistema de fluxo desenvolvido para efectuar a determinação de Rh, Pd e Pt em amostras de urina encontra-se representado na Figura 6.1. Na Tabela 6.2 apresentam-se resumidamente os parâmetros operacionais das diferentes etapas do ciclo analítico.

A primeira etapa consistia na lavagem do canal da amostra. Esta etapa (Etapa 1) compreendia, numa primeira fase (Etapa 1.1), a propulsão da água ultrapura que ficava no interior do sistema de fluxo após a última etapa (Etapa 5) do ciclo analítico anterior, seguida da propulsão de ar, ambos a partir do canal do esgoto E para a

porta 3 da válvula V_SIA. Por fim, a partir da porta 8 da V_SIA, era aspirada água ultrapura (H₂O₂) em direcção ao esgoto E (Etapa 1.2).

Na etapa seguinte (Etapa 2), a amostra de urina U era aspirada a partir da porta 3 em direcção à coluna de pré-concentração C, onde ficavam retidos os analitos (Rh, Pd e Pt) e de onde o remanescente da amostra seguia para o esgoto E. De seguida, era aspirado ar através da coluna de pré-concentração C, a partir da porta 5 da V_SIA, também em direcção ao esgoto E. Este passo (Etapa 3), que ocorria imediatamente antes da etapa de eluição, permitia eliminar o volume de amostra que ainda se encontrava dentro do sistema de fluxo.

De seguida (Etapa 4) ocorria, como se referiu, a eluição dos metais retidos na coluna C durante a etapa de pré-concentração. A eluição ocorria de modo reverso, i.e., o eluente fluía num sentido oposto ao da amostra durante a etapa de pré-concentração. O eluente El era uma solução de tioureia 0,5 M contendo 1 µg L⁻¹ de ¹¹⁵In (padrão interno).

Tabela 6.2

Condições operacionais do sistema de fluxo para as diferentes etapas do ciclo analítico.

Etapa	Tempo s	V_SIA posição	BP_1 rotação	BP_2 rotação	BP_1 mL min ⁻¹	BP_2 mL min ⁻¹	VS_1 posição	VS_2 posição
1.1	40	3	p	p	1	4	0	0
1.2	20	8	p	a	1	4	0	0
2	150	3	p	a	1	4	0	0
3	20	5	p	a	1	4	0	0
4	120	1	s	p	-	1	1	1
5	60	8	p	a	1	4	0	0

Legenda: V_SIA = válvula multi-posição selectora de fluidos; BP_1 e BP_2 = bombas peristálticas; VS_1 e VS_2 = válvulas solenóides de 3-vias; p = propulsão; a = aspiração; s = paragem de funcionamento; 0 = solenóide desactivado; 1 = solenóide activado.

A última etapa do ciclo analítico, destinada a eliminar o eluente que ficava dentro do sistema de fluxo, consistia na aspiração de água ultrapura H₂O₂ através da coluna

de pré-concentração C, a partir da porta 8 da V_SIA, em direcção ao esgoto E (Etapa 5).

Com excepção para a Etapa 4 do ciclo analítico descrito, a bomba peristáltica BP_1 aspirava continuamente água ultrapura H2O_1 de modo a manter constante o aporte ao nebulizador do equipamento de ICP-MS. A bomba peristáltica BP_2 era o único dispositivo responsável pela gestão de fluidos no sistema de pré-concentração propriamente dito.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo

6.3.1.1 Pré-concentração dos PGEs

6.3.1.1.1 Acidificação das amostras

No Capítulo anterior já se referiram as principais características da resina Metalfix™ Chelamine™ e também se destacou a utilidade desta resina quando incorporada em sistemas de fluxo configurados para efectuar uma etapa de pré-concentração em linha, nomeadamente naqueles que têm por objectivo a pré-concentração de metais de transição a partir de amostras com elevado teor salino. Por esse motivo, e também porque está bem documentada na literatura a elevada capacidade que esta resina apresenta para os PGEs (Blain *et al.*, 1993; Coedo *et al.*, 1997; Iglesias *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2003; Muzikar *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2005), foi seleccionada para este trabalho.

Alguns autores (Pohl *et al.*, 2005) estudaram a variação da capacidade da resina Metalfix™ Chelamine™ de acordo com a composição qualitativa e quantitativa do meio ácido a partir do qual alguns PGEs (Au, Ir, Pd, Rh e Ru) eram retidos. No

trabalho referido, os autores apresentam os resultados de um estudo exaustivo, que incluía a avaliação de diferentes ácidos (HCl e HNO₃), utilizados isoladamente ou em mistura (1+1 e 3+1), e também de diferentes concentrações finais de H⁺ (0,1 - 2,0 mol L⁻¹). Importa notar que este estudo foi efectuado apenas para a resina na forma de partículas com 150-300 µm de diâmetro. No que respeita à resina com um tamanho de partícula de 40-80 µm de diâmetro, apenas foi avaliada a alteração da capacidade com a variação da concentração final de H⁺, utilizando para tal apenas o HCl. Neste caso (resina com um tamanho de partícula entre 40-80 µm) e utilizando soluções com 0,2 mol L⁻¹ de HCl, Pohl *et al.* obtiveram uma percentagem de retenção de 100 ± 1% (Pd), 95 ± 4% (Pt) e 54 ± 4% (Rh). Aumentando a concentração de HCl para 1,0 mol L⁻¹, a taxa de retenção dos PGEs pela resina não se alterava significativamente, passando a ser de 97 ± 3% (Pd), 90 ± 3% (Pt) e 52 ± 2% (Rh).

Neste contexto, a fase inicial do trabalho a que se reporta este Capítulo consistiu em estudar mais aprofundadamente a taxa de retenção dos PGEs (Rh, Pd e Pt) pela resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 40-80 µm de diâmetro. Para tal, prepararam-se soluções padrão dos PGEs em estudo (com uma concentração de 0,5 µg L⁻¹ e 1 µg L⁻¹) em meios ácidos de diferente composição. Concretamente: i) em HCl (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mol L⁻¹); ii) em HNO₃ (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mol L⁻¹); iii) em mistura 1+1 de HCl e HNO₃ (com uma concentração final de H⁺ de 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mol L⁻¹); e iv) em mistura 3+1 de HCl e HNO₃ (i.e., “água-régia”, com uma concentração final de H⁺ de 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mol L⁻¹).

A avaliação da taxa de retenção dos PGEs pela resina foi feita em linha, i.e., efectuando a monitorização do sinal analítico correspondente ao efluente da coluna durante a etapa de pré-concentração. Depois relacionava-se este sinal com o obtido por leitura directa das mesmas soluções padrão.

A taxa de retenção de Rh foi inferior a 50% em todos os casos estudados e, muito embora aumentasse ligeiramente com o aumento da concentração de H^+ , a precisão dos resultados era significativamente melhor quando se preparavam os PGEs em água-régia com uma concentração final de H^+ entre 0,2 e 1,0 mol L^{-1} . Pelo contrário, a retenção da Pt diminuía consideravelmente à medida que aumentava a concentração de H^+ ; para além disso, também variava de modo significativo com a composição do meio ácido, podendo atingir-se uma taxa de retenção de apenas cerca de 20%, caso se utilizasse somente HNO_3 , ou próxima de 100%. Esta última situação era conseguida apenas nos casos em que se preparavam os PGEs em água-régia, sendo que a concentração final de H^+ podia variar entre 0,2 e 1,0 mol L^{-1} , sem que isso afectasse significativamente o valor da taxa de retenção. No que respeita aos resultados obtidos para o Pd, estes mostraram-se concordantes com outros referenciados na literatura para a resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 150-300 μm de diâmetro (Pohl *et al.*, 2005). De facto, verificou-se que a taxa de retenção do Pd praticamente não era afectada nem pela composição do meio ácido, nem pela concentração final de H^+ , situando-se sempre entre 95% e 100%.

A acidificação com água-régia do meio a partir do qual iriam ser retidos os PGEs revelou ser a melhor forma de obter uma solução de compromisso entre precisão analítica e taxa de retenção para os três metais em estudo. Quanto à concentração final de H^+ , verificou-se que a mesma podia variar entre 0,2 e 1,0 mol L^{-1} sem que isso afectasse de modo significativo a retenção de Rh, Pd e Pt pela resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 40-80 μm de diâmetro.

6.3.1.1.2 Coluna

Avaliou-se a influência exercida pelas dimensões da coluna de pré-concentração no sinal analítico obtido para cada um dos três PGEs em estudo, tendo-se testado 6

colunas diferentes, com comprimento/diâmetro interno de 5 cm/2 mm, 7 cm/2 mm, 3 cm/3 mm, 5 cm/3 mm, 7 cm/3 mm e 5 cm/4 mm.

Verificou-se que a sensibilidade analítica diminuía com o aumento do comprimento da coluna de pré-concentração. De facto, utilizando as mesmas condições operacionais (i.e., volumes, caudais), obtinham-se curvas de calibração com maior declive com colunas de menor comprimento, o que possivelmente estava relacionado com a menor resistência que estas ofereciam à passagem da amostra (menor pressão hidrodinâmica) e, portanto, com um maior volume de amostra que efectivamente passava pela coluna durante a etapa de pré-concentração.

As colunas de pré-concentração com menor diâmetro interno também provocavam um aumento da pressão hidrodinâmica do sistema, dificultando assim o fluxo da amostra e, por conseguinte, afectando a sensibilidade analítica. Por outro lado, verificou-se também que quanto maior era o diâmetro interno da coluna menor era a precisão analítica.

Assim, estabelecendo um compromisso entre sensibilidade e precisão analítica, seleccionou-se a coluna com 3 mm de diâmetro interno e 3 cm de comprimento.

6.3.1.1.3 Caudal

A optimização do caudal utilizado durante a etapa de pré-concentração foi feita através da avaliação do sinal analítico obtido para o efluente da coluna (i.e., o sinal correspondente ao remanescente da amostra não retido pela coluna). Esta avaliação foi feita com uma solução padrão contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Rh, Pd e Pt, tendo-se definido para essa etapa um tempo total de 120 s. Em cada ciclo analítico a solução era aspirada pela bomba peristáltica BP_2 através da coluna para o esgoto, a um caudal diferente, tendo-se testado valores de caudal entre 1 e 7 mL min^{-1} . Os correspondentes “esgotos” eram colhidos separadamente e depois analisados por ICP-MS. Para tal, eram propulsionados directamente para o detector pela bomba

peristáltica BP_1 . Os resultados obtidos não apresentavam diferenças significativas, pelo que se concluiu que, na gama de valores testados, o caudal da amostra durante a etapa de pré-concentração não influenciava apreciavelmente a taxa de retenção dos metais pela resina. Contudo, quando se seleccionava um caudal superior a 4 mL min⁻¹ a reprodutibilidade dos volumes debitados pela bomba peristáltica BP_2, reflectida no volume de “esgoto” final que era recolhido em proveta graduada, diminuía consideravelmente, pelo que este foi o valor fixado para os ensaios posteriores.

6.3.1.1.4 Volume de amostra

Uma vez seleccionada a coluna de pré-concentração (comprimento e diâmetro) e o caudal da amostra durante a etapa de pré-concentração, importava definir também o volume de amostra que poderia passar através da coluna sem que ocorresse saturação da resina nela contida. Para tal, fez-se passar através da coluna uma solução padrão contendo Rh, Pd e Pt numa concentração de 10 µg L⁻¹, a um caudal de 1 mL min⁻¹, durante 30 min. Durante todo esse período de tempo, fez-se a monitorização do sinal analítico obtido para cada um dos três metais, através da análise do efluente da coluna, por ligação directa do canal do esgoto ao nebulizador do equipamento de ICP-MS. O sinal obtido manteve-se constante ao longo dos 30 minutos. Por esse motivo, e tendo em consideração as condições utilizadas (30 mL de uma solução contendo 10 µg L⁻¹ de Rh, Pd e Pt), foi possível concluir que a capacidade da massa de resina contida na coluna de pré-concentração não iria ser um factor limitante do volume de amostra.

Testaram-se volumes de amostra entre 5 e 20 mL. A selecção do volume mais conveniente foi feita tendo em consideração a sensibilidade e o rendimento analítico. Uma vez que o volume de amostra era definido pelo tempo de amostragem (tempo durante o qual a bomba peristáltica BP_2 aspirava a amostra através da

coluna para o esgoto) e pelo caudal debitado pela bomba peristáltica BP_2 (fixado em 4 mL min^{-1}), seleccionou-se um tempo de amostragem de 150 s, que correspondia a um volume de amostra de cerca de 10 mL. Este volume permitia obter uma sensibilidade adequada para a determinação dos PGEs nas amostras de urina, mantendo o rendimento analítico em níveis aceitáveis.

6.3.1.1.5 Tamponamento e pré-tratamento da amostra

A taxa de retenção dos PGEs pela resina Metalfix™ Chelamine™ depende do valor de pH da solução em que se encontram (Iglesias *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2003; Muzikar *et al.*, 2006). Uma vez que as amostras de urina, mesmo em condições normais, podem apresentar valores de pH bastante variáveis (4,6 - 8,0) (Woo e Cannon, 1984), pareceu adequado que se procedesse ao ajuste do seu pH a um valor fixo. Para esse propósito, utilizou-se uma solução tampão de HCl/KCl, adicionada em linha. Tendo em consideração o descrito na literatura relativamente ao valor de pH óptimo para a retenção de PGEs pela resina Metalfix™ Chelamine™ (Iglesias *et al.*, 2000), neste trabalho testaram-se valores de pH entre 1,0 e 2,5. No entanto, posteriormente acabou por se verificar que a adição em linha de uma solução tampão às amostras era dispensável. De facto, para assegurar que os elementos a determinar se encontravam dissolvidos em meio ácido e, por isso, disponíveis para a troca iónica a nível da resina, mostrou-se ser necessário efectuar uma digestão prévia das amostras. O estudo do pré-tratamento das amostras demonstrou que a digestão ácida (12 mL de amostra com 3 mL de água-régia, em forno de microondas a uma potência de 500 W, durante 5 minutos, e posterior adição de 10 mL de água-régia, com uma concentração total de H^+ de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, após os digestos terem arrefecido até à temperatura ambiente) resultava em soluções com valores de pH muito semelhantes. Quando se compararam os resultados obtidos na análise de amostras de urina simplesmente digeridas de acordo com o atrás descrito (i.e., sem se efectuar

qualquer outro tratamento adicional) com os obtidos na análise dessas mesmas amostras com adição de uma solução tampão em linha, foi possível concluir que, no primeiro caso, os resultados apresentavam melhores exactidão e precisão (valores de CV cerca de 50% inferiores) analíticas. Adicionalmente, a análise das amostras sem tamponamento em linha resultava num sistema de fluxo com uma configuração mais simples e permitia obter melhores rendimentos analíticos.

6.3.1.2 Lavagem do sistema de fluxo após a etapa de pré-concentração

Foi avaliado o efeito exercido pela “lavagem” do sistema de fluxo entre a etapa de pré-concentração e a etapa de eluição. Esta lavagem tinha por objectivo eliminar o volume de amostra que permanecia dentro do sistema de fluxo após a etapa de pré-concentração, enviando-a para o esgoto. Para esse efeito, numa fase inicial, utilizou-se o branco da calibração e, posteriormente, água ultrapura, em qualquer dos casos aspirados pela bomba peristáltica BP_2 a partir da porta 5 da V_SIA. Verificou-se que a introdução desta etapa de lavagem do sistema de fluxo afectava o sinal analítico: obtinham-se sinais analíticos mais largos, por vezes apresentando um perfil serrilhado, e também o aparecimento de “duplos-picos” (i.e., para cada um dos elementos em estudo obtinham-se dois picos contíguos), como se ilustra na Figura 6.2. Este efeito da etapa de lavagem sobre o sinal analítico reflectia-se, por último, no desempenho do sistema de fluxo, prejudicando a precisão e a exactidão dos resultados, e o próprio rendimento analítico. No entanto, o volume residual da amostra que permanecia no sistema de fluxo deveria ser eliminado antes da etapa de eluição, para se evitarem os efeitos sobre a determinação dos PGEs por ICP-MS já referidos na introdução deste Capítulo. Face aos maus resultados obtidos com o procedimento de lavagem acima descrito (i.e, com branco da calibração ou água ultrapura) testou-se a utilização de ar. Apesar de, em teoria, a presença de ar ou a interrupção do fluxo de solução ao equipamento poder originar instabilidade no

plasma, na prática acabou por se verificar que essa instabilidade não era significativa. Aliás, quando se utilizava ar para purgar/lavar o sistema de fluxo, os sinais analíticos eram mais estreitos, indicando que as trocas a nível da resina ocorriam de modo mais eficaz (i.e., os PGEs eram eluídos mais facilmente). Logo, o tempo necessário para a etapa de eluição diminuía, o que possibilitava a obtenção de melhores rendimentos analíticos. Para além disso, utilizando ar para purgar o sistema de fluxo após a etapa de pré-concentração, não se obtinham “duplos-picos” e também melhoravam significativamente a precisão e a exactidão analíticas.

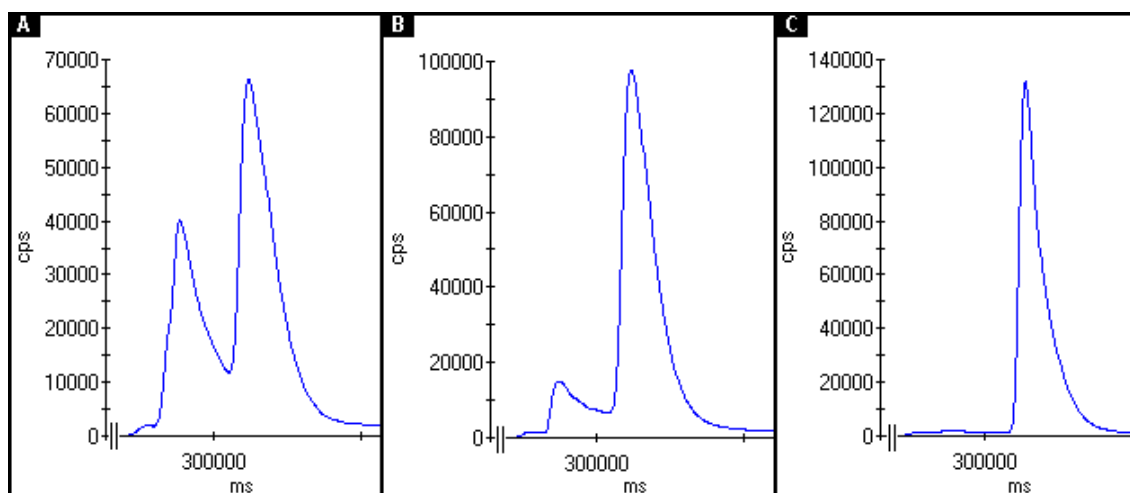


Figura 6.2

Influência exercida pela etapa de lavagem no perfil do sinal analítico obtido para o Pd. **A:** lavagem com água-régia; **B:** lavagem com água ultrapura; **C:** lavagem com ar.

O comportamento evidenciado pelo sistema de fluxo quando se mudava de uma etapa de lavagem com um líquido (branco da calibração ou água) para uma etapa de purga com ar está provavelmente relacionado com o facto de o ar não induzir alterações na resina, que será sempre de algum modo sensível a alterações nos valores de pH e de força iónica, e/ou com o facto da utilização de ar não influenciar a dispersão/diluição do eluído. Além disso, a presença de ar acabava por não provocar instabilidade significativa no plasma, uma vez que o nebulizador era

continuamente alimentado pela água ultrapura introduzida pela bomba peristáltica BP_1 até à etapa de eluição.

6.3.1.3 Eluição

6.3.1.3.1 Composição do eluente

Como já foi referido, a resina Metalfix™ Chelamine™ é uma resina que apresenta elevada afinidade para os PGEs, razão pela qual constitui uma alternativa vantajosa quando se pretende efectuar a separação de PGEs de outro tipo de metais (Blain *et al.*, 1993; Coedo *et al.*, 1997; Iglesias *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2003; Muzikar *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2005). Contudo, muito embora essa elevada afinidade da resina para os PGEs seja uma característica útil quando se trata da etapa de pré-concentração, ela acaba depois por dificultar a etapa de eluição, constituindo um obstáculo à total “libertação” dos metais pela resina (Coedo *et al.*, 1997). Por esse motivo, testaram-se diferentes eluentes de modo a encontrar a melhor alternativa em termos de taxa de recuperação dos PGEs, precisão e rendimento analítico. Para tal, partiu-se dos resultados apresentados na literatura sobre a eficiência de diversos eluentes na eluição de Pd e de Pt a partir da resina Metalfix™ Chelamine™ (Iglesias *et al.*, 2000). De acordo com os mesmos, uma solução de tioureia 0,5 mol L⁻¹ preparada em HCl 1,0 mol L⁻¹ era 100% eficiente na eluição de Pd e uma solução de NaClO₄ 0,5 mol L⁻¹ preparada em HCl 1 mol L⁻¹ apresentava uma eficiência de 70,9% na eluição de Pt. Desse modo, preparou-se um eluente constituído por tioureia 0,5 mol L⁻¹, NaClO₄ 0,5 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹. Com este procedimento pretendia-se não só verificar se era possível combinar os três reagentes (HCl, tioureia e NaClO₄) numa única solução eluente sem que isso alterasse a sua eficiência na eluição do Pd e da Pt, como ainda avaliar se essa mesma solução permitia também eluir o Rh retido pela resina. Contudo, esta solução eluente afectava o funcionamento do sistema de fluxo, o que se reflectia no perfil dos sinais analíticos (sinais mais largos, serrilhados, pouco

reprodutíveis) e, por conseguinte, no rendimento analítico, na precisão e na exactidão dos resultados. O efeito exercido por este eluente (tioureia 0,5 mol L⁻¹, NaClO₄ 0,5 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹) provavelmente estava relacionado com uma eventual instabilidade do agente complexante tioureia na presença de um ácido (HCl) e de um oxidante (NaClO₄) fortes. Por essa razão, esta alternativa foi considerada inadequada e, por isso, foi abandonada. Seguidamente, testaram-se então os dois eluentes tal como descritos na literatura (Iglesias *et al.*, 2000), i.e., as duas soluções em separado. Os resultados obtidos foram diferentes dos descritos por aqueles autores, tendo-se verificado que o eluente tioureia 0,5 mol L⁻¹ preparado em HCl 1,0 mol L⁻¹ era mais eficaz que o eluente NaClO₄ 0,5 mol L⁻¹ preparado em HCl 1 mol L⁻¹, mesmo para a eluição da Pt. Deve referir-se que, neste trabalho, a eluição era efectuada em linha (i.e., num sistema de fluxo), enquanto que o trabalho de Iglesias *et al.* atrás referido se reporta a uma eluição em *batch*, o que poderá justificar a diferença entre os resultados obtidos, se se considerar a influência exercida por estes dois modos de operar na cinética da permuta iónica ao nível da resina. No entanto, apesar de se ter verificado que o eluente tioureia 0,5 mol L⁻¹ preparado em HCl 1,0 mol L⁻¹ constituía a melhor alternativa em termos de taxa de recuperação da Pt, este não era o eluente ideal, na medida em que havia um lento retorno do sinal à linha de base. Para ultrapassar estas dificuldades, aumentou-se a concentração de tioureia no eluente, o que, porém, acabou por se reflectir no processo de nebulização, prejudicando-o, devido ao aumento do teor de sólidos dissolvidos. Avaliaram-se então outros agentes complexantes, para além da tioureia: L-cisteína, glicina e tiocianato de amónio. Além disso, fez-se variar a sua concentração e o pH das soluções. Em todas as situações estudadas, a precisão e a exactidão dos resultados eram piores do que quando se utilizava o eluente tioureia 0,5 mol L⁻¹ em HCl 1,0 mol L⁻¹.

Por fim, testou-se uma simples solução aquosa de tioureia 0,5 mol L⁻¹ (i.e., sem o HCl 1,0 mol L⁻¹). Constatou-se que o perfil do sinal analítico melhorava para todos os

elementos em estudo, aparecendo mais bem definido. Este efeito notava-se particularmente no sinal da Pt que, com a presença de HCl no eluente, apresentava dificuldade em regressar à linha de base, situação que deixou de se verificar quando se passou a utilizar a simples solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 6.3). O facto da solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ se ter revelado mais eficaz poderá estar relacionado quer com o aumento da estabilidade da tioureia em solução aquosa simples, quer com a eliminação de possíveis efeitos de memória eventualmente induzidos pela presença de HCl no eluente tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, quer ainda com um eventual aumento da eficiência do processo de nebulização devido à menor viscosidade das soluções aquosas de tioureia relativamente às soluções ácidas.

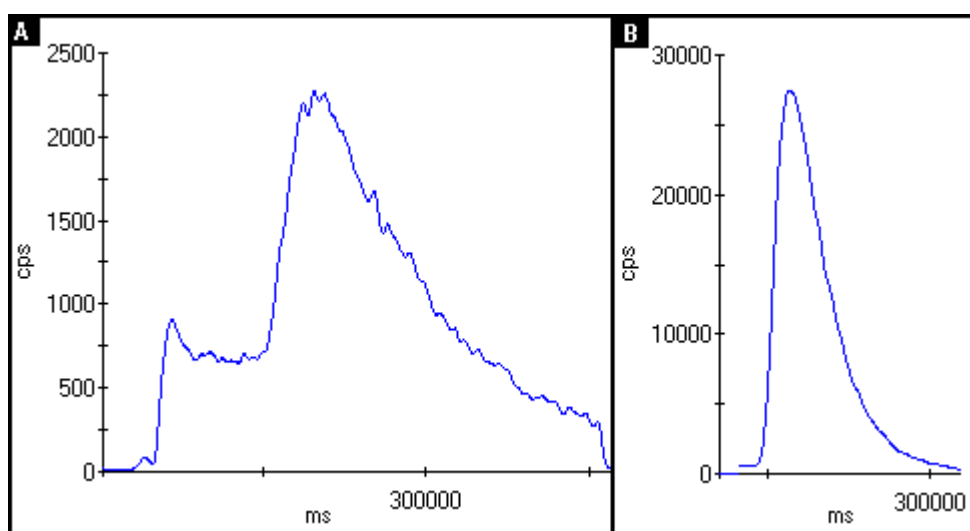


Figura 6.3

Influência exercida pela composição do eluente no perfil do sinal analítico obtido para a Pt. **A:** solução de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; **B:** solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Pohl *et al.* ao utilizarem a resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 40-80 μm concluíram que esta não se adequava a determinações em linha (Pohl *et al.*, 2000). Segundo aqueles autores, a resina com este tamanho de partícula não era adequada para operações em coluna, uma vez que modificações no

valor do pH e da força iónica entre a solução interna e a solução externa das partículas da resina resultavam numa variação significativa do seu volume. Neste nosso trabalho, como já se descreveu, a pré-concentração dos PGEs foi feita a partir de soluções acidificadas com água-régia, com uma concentração total de H^+ de aproximadamente $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, e para a eluição utilizou-se uma solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Apesar da diferença de pH entre as duas circunstâncias (pré-concentração e eluição), não se observaram os problemas descritos por aqueles autores.

6.3.1.3.2 Temperatura do eluente

O efeito exercido pela temperatura do eluente na eficiência da eluição foi outro dos parâmetros avaliados. O aumento da temperatura do eluente até cerca de 120°C permitiu concluir que, para séries analíticas curtas (i.e., pequeno número de determinações consecutivas), este factor não afectava de modo muito significativo a determinação de Rh, Pd e Pt. No entanto, a partir de cerca de uma hora consecutiva de análise, a precisão e a exactidão eram significativamente melhores quando o eluente (solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) era mantido a uma temperatura de aproximadamente 100°C .

6.3.1.3.3 Caudal do eluente

Quando se efectua a etapa de eluição em linha, o caudal do eluente, associado à sua capacidade de dessorção, influencia o rendimento analítico. No entanto, tendo em consideração o equipamento de detecção e o tipo de nebulizador utilizados neste trabalho, o caudal do eluente preferencialmente não deve ser superior a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ (Groom *et al.*, 2005). Assim, testaram-se valores de caudal no intervalo de 0,5 a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Seleccionou-se um caudal de 1 mL min^{-1} , uma vez que, quer para caudais superiores, quer para caudais inferiores, a precisão e a exactidão dos resultados

eram afectadas, provavelmente devido a um aumento da instabilidade no plasma provocada por um deficiente processo de nebulização.

6.3.1.4 Adição de padrão interno

Na análise por ICP-MS, a adição de padrão interno permite monitorizar e corrigir eventuais variações na sensibilidade ao longo do tempo, aumentando assim a fiabilidade dos resultados (Taylor, 2001). O padrão interno é um elemento que deverá ser adicionado tanto às amostras como às soluções de calibração numa concentração fixa conhecida. Esta concentração deverá ser suficientemente elevada de modo a permitir que a medida da corrente de iões do padrão interno não esteja sujeita a um erro elevado devido ao pequeno número de contagens (Taylor, 2001). Para que a adição de um padrão interno possa funcionar adequadamente como factor de correcção, há que respeitar alguns critérios. Nomeadamente, o elemento escolhido para padrão interno: i) não deve fazer parte da composição original da amostra, ou se o fizer deverá estar presente numa concentração muito baixa, insignificante relativamente à concentração que resulta da sua adição às amostras; ii) deve apresentar uma pureza elevada; iii) deve ter pelo menos um isótopo livre de interferências espectrais; iv) não deve reagir com os elementos que se pretendem determinar, nem com a matriz da amostra; v) deve apresentar uma massa que, do ponto de vista da sua localização no espectro de massas, seja próxima da massa dos elementos a determinar e vi) deve ter uma energia de ionização próxima da energia de ionização dos elementos a determinar (Taylor, 2001).

No caso deste trabalho, o padrão interno foi incluído na solução eluente, tendo-se seleccionado para o efeito o ^{115}In numa concentração de $1\ \mu\text{g L}^{-1}$. A influência que a adição da solução concentrada de padrão interno (ácida) à solução aquosa de tioureia podia exercer sobre a determinação dos PGEs, foi avaliada. Nesse sentido, numa primeira fase, fez-se o registo dos sinais analíticos obtidos para os três PGEs

em estudo (Rh, Pd e Pt) e para o In, separadamente, i.e., recorrendo a dois ciclos analíticos distintos. No primeiro ciclo, utilizou-se uma solução padrão de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ durante a etapa de pré-concentração e, posteriormente, fez-se a eluição dos PGEs retidos utilizando a simples solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aquecida; no segundo ciclo, a solução padrão foi substituída pela solução branco de calibração e para a eluição utilizou-se a solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aquecida, adicionada de padrão interno (In na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$). Por fim, fez-se um terceiro ciclo analítico em que se utilizou a solução padrão de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ durante a etapa de pré-concentração e a solução aquosa de tioureia $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ adicionada de In $1 \mu\text{g L}^{-1}$ na etapa de eluição. Os sinais analíticos obtidos para Rh, Pd e Pt no primeiro ciclo e para o In no segundo ciclo eram sobreponíveis aos sinais analíticos obtidos para os mesmos elementos no terceiro ciclo, o que permitiu concluir que a adição de padrão interno ao eluente não afectava a determinação dos PGEs.

6.3.1.5 Condicionamento da coluna de pré-concentração

Após uma etapa de eluição em fluxo é conveniente lavar o sistema, e particularmente as partículas de resina que se encontram empacotadas na coluna, de modo a se eliminar o eluente residual e assim aumentar a taxa de retenção dos metais durante a etapa de pré-concentração seguinte (é o chamado condicionamento da coluna de pré-concentração). Para este propósito avaliaram-se diferentes procedimentos de lavagem da coluna: i) com ar; ii) com a solução branco de calibração; iii) com água ultrapura, seguido do branco de calibração; iv) com água ultrapura e v) com água ultrapura, seguido de ar. Verificou-se que a utilização de água ultrapura, seguida ou não de ar, era o procedimento que conduzia à obtenção de melhores taxas de retenção. A utilização do branco de calibração ou apenas de ar resultava na perda parcial da primeira fracção de PGEs que passava pela resina no ciclo analítico seguinte, como se pôde verificar quer pela monitorização em tempo

real do remanescente da amostra que era encaminhado para o esgoto durante a etapa de pré-concentração, quer pelo sinal analítico obtido para cada um dos três PGEs em estudo após a etapa de eluição.

6.3.1.6 Metais coexistentes

A urina é uma amostra de composição complexa, de modo que, neste trabalho, tornava-se importante avaliar se os metais coexistentes exerciam algum tipo de influência sobre a taxa de retenção que a resina Metalfix™ Chelamine™ normalmente apresenta para os PGEs quando estes são retidos a partir de soluções padrão (soluções aquosas simples). Para efeitos de comparação com os resultados obtidos por Pohl *et al.* (Pohl *et al.*, 2005) durante a avaliação da resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 150-300 µm de diâmetro, neste trabalho foram utilizados os mesmos metais: Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn. Assim, preparou-se uma urina artificial - simulação de matriz - (Wang *et al.*, 2001), à qual se adicionaram os vários metais de modo a que a concentração final de cada um deles fosse de 10 mg L⁻¹. De seguida, a várias alíquotas de 100 mL da urina artificial assim preparada adicionaram-se diferentes quantidades dos PGEs em estudo, de modo a se obterem soluções com uma concentração final entre 5 ng L⁻¹ e 100 ng L⁻¹. A todas as soluções adicionou-se também água-régia até uma concentração final de H⁺ de 0,2 mol L⁻¹. Da análise destas soluções obteve-se uma curva de calibração para cada um dos PGEs em estudo. De seguida, mantendo as mesmas condições analíticas, com soluções padrão normais, obteve-se outra curva de calibração. Quando comparadas as duas curvas de calibração assim obtidas para cada elemento, foi possível concluir que, nas condições experimentais utilizadas, a coexistência na amostra dos metais adicionados com os PGEs não influenciava a retenção destes últimos pela resina (Tabela 6.3), situação que veio confirmar para a resina Metalfix™ Chelamine™ com um tamanho de partícula de 40-80 µm de diâmetro o mesmo já

descrito para a resina com um tamanho de partícula de 150-300 μm de diâmetro (Pohl *et al.*, 2005).

Tabela 6.3

Equações correspondentes às curvas de calibração obtidas com soluções padrão: A) aquosas; B) preparadas em urina artificial (simulação de matriz; ver texto).

	^{103}Rh	^{105}Pd	^{195}Pt
A) Soluções padrão aquosas	$Y = 845,33 X + 7375,4$ ($r = 0,9992$)	$Y = 12881 X + 35836$ ($r = 0,9998$)	$Y = 5693,3 X + 23767$ ($r = 0,9992$)
B) Soluções padrão com simulação de matriz	$Y = 871,21 X + 7140,8$ ($r = 0,9990$)	$Y = 12941 X + 36597$ ($r = 0,9993$)	$Y = 5717,9 X + 19731$ ($r = 0,9996$)

Nota: Concentração das soluções: 0 - 5 - 10 - 15 - 30 - 50 - 100 ng L^{-1} .

6.3.2. Características do sistema de fluxo

Depois de otimizado, o sistema de fluxo desenvolvido permitia obter uma resposta linear até pelo menos 100 ng L^{-1} para cada um dos três elementos em estudo: Rh, Pd e Pt (Figura 6.4 e Tabela 6.3). Não foram testadas concentrações superiores uma vez que os dados disponíveis na literatura indicavam que os valores esperados em amostras de urina seriam sempre bastante inferiores a 100 ng L^{-1} (Bencs *et al.*, 2003; Benkhedda *et al.*, 2003; Bocca *et al.*, 2004; Krachler *et al.*, 1998; Petrucci *et al.*, 2004; Rodushkin *et al.*, 2004). Os dados da Tabela 6.3 mostram que se obtinha uma boa linearidade de resposta. O mesmo é confirmado pela média aritmética dos coeficientes de correlação de 5 curvas de calibração independentes, cada uma com 7 pontos de calibração: $0,9974 \pm 0,0009$ (Rh), $0,9985 \pm 0,0004$ (Pd) e $0,9979 \pm 0,0007$ (Pt).

Com um consumo de cerca de 10 mL de digesto de amostra de urina e um rendimento analítico de 27 determinações por hora (por hora, era possível efectuar a determinação simultânea dos 3 elementos - Rh, Pd e Pt - em 9 amostras), os valores

obtidos para o limite de detecção (3σ , $n = 10$) foram: $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ (Rh), $0,4 \text{ ng L}^{-1}$ (Pd) e $0,9 \text{ ng L}^{-1}$ (Pt).

A sensibilidade analítica mantinha-se razoavelmente constante ao longo do tempo, consoante se pode verificar pelos valores do desvio padrão do declive de cinco curvas de calibração obtidas durante os ensaios finais de validação do método: $856,80 \pm 20,34$ (Rh; CV = 2,37%), 12909 ± 35 (Pd; CV = 0,27%) e $5698,4 \pm 22,9$ (Pt; CV = 0,40%).

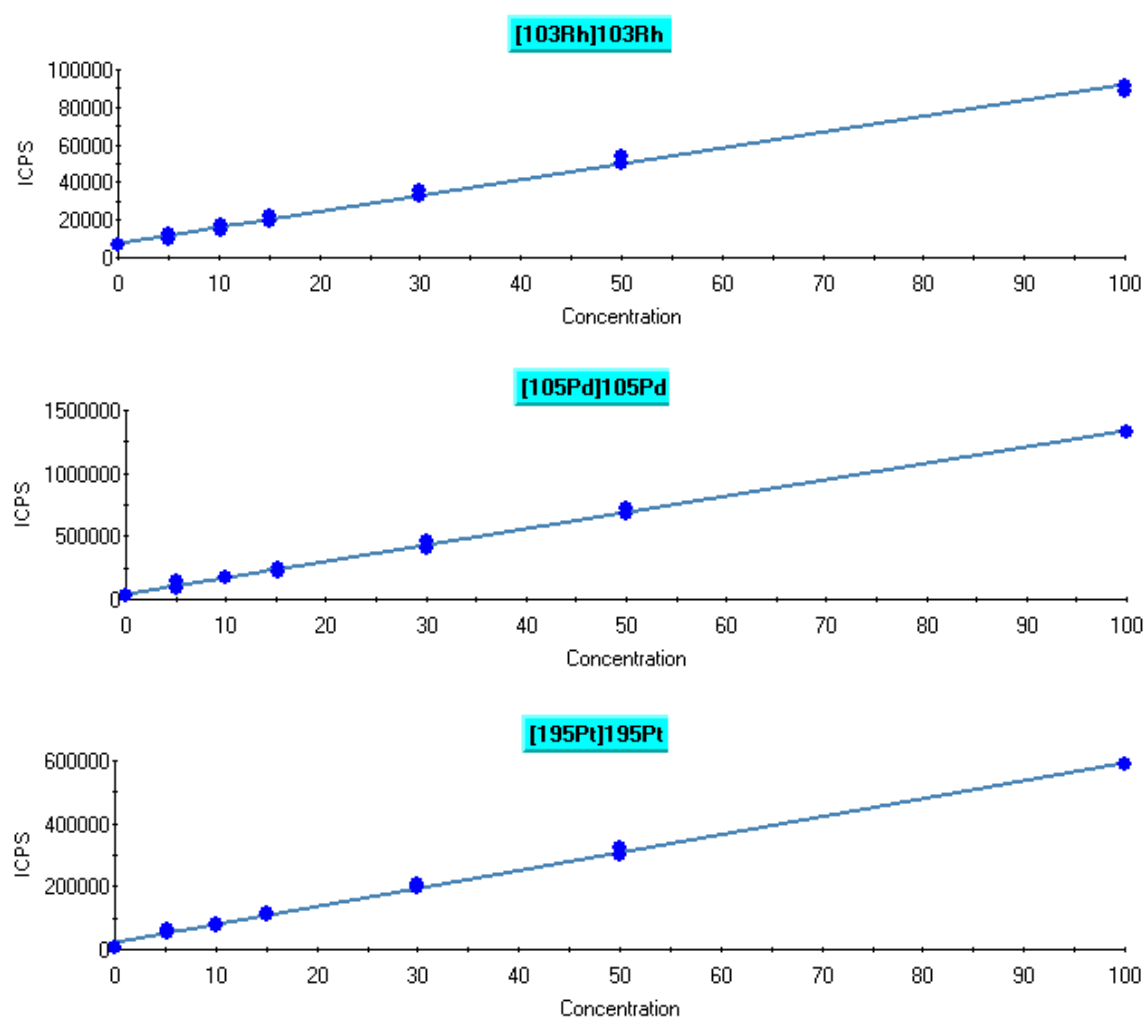


Figura 6.4

Curvas de calibração típicas obtidas para cada um dos PGEs em estudo.

Tabela 6.4

Avaliação da exactidão: resultados dos ensaios de recuperação.

Amostra		Concentração inicial (média $\pm$ dp ^a)	Concentração adicionada	Concentração obtida (média $\pm$ dp ^a)
1	Rh	0,9 $\pm$ 0,1	5	6,0 $\pm$ 0,3
			20	20,0 $\pm$ 0,7
	Pd	1,01 $\pm$ 0,04	25	26 $\pm$ 1
			40	39,8 $\pm$ 0,8
	Pt	1,65 $\pm$ 0,09	10	12,4 $\pm$ 0,4
			50	51 $\pm$ 0,1
2	Rh	1,2 $\pm$ 0,1	15	14,4 $\pm$ 0,4
			50	52 $\pm$ 1
	Pd	2,43 $\pm$ 0,09	5	7,5 $\pm$ 0,5
			80	83 $\pm$ 1
	Pt	5,4 $\pm$ 0,2	25	29,6 $\pm$ 0,6
			45	52 $\pm$ 1
3	Rh	1,0 $\pm$ 0,1	30	31,5 $\pm$ 0,6
			75	75 $\pm$ 1
	Pd	0,70 $\pm$ 0,06	35	34 $\pm$ 1
			85	84 $\pm$ 1
	Pt	0,88 $\pm$ 0,06	5	5,4 $\pm$ 0,2
			60	60 $\pm$ 1
4	Rh	2,4 $\pm$ 0,2	20	21,6 $\pm$ 0,5
			80	86 $\pm$ 2
	Pd	3,3 $\pm$ 0,1	15	19 $\pm$ 2
			55	53 $\pm$ 1
	Pt	2,9 $\pm$ 0,1	15	18,3 $\pm$ 0,5
			75	79 $\pm$ 1
5	Rh	1,2 $\pm$ 0,1	10	10,9 $\pm$ 0,4
			60	62 $\pm$ 1
	Pd	0,96 $\pm$ 0,07	20	19 $\pm$ 1
			65	68 $\pm$ 2
	Pt	4,3 $\pm$ 0,2	30	32,8 $\pm$ 0,7
			80	85 $\pm$ 1

^a Resultados em ng L⁻¹. A “média” corresponde ao valor obtido através do cálculo da média aritmética de três determinações independentes; “dp” corresponde ao desvio padrão calculado de acordo com o descrito no Capítulo 2.

A avaliação da precisão foi feita em termos da repetibilidade e da reprodutibilidade. A repetibilidade foi avaliada através do valor do CV obtido para 10 determinações consecutivas de soluções padrão de 10 ng L⁻¹, 50 ng L⁻¹ e 100 ng L⁻¹. Os valores de CV obtidos foram, respectivamente: 3,7% (Rh), 2,6% (Pd) e 2,4% (Pt); 2,4% (Rh), 1,4% (Pd) e 1,9% (Pt); e 1,3% (Rh), 0,58% (Pd) e 0,62% (Pt).

A reprodutibilidade foi avaliada através do valor de CV obtido para 5 determinações em dias consecutivos das mesmas soluções acima referidas. Os valores de CV obtidos foram: 3,9% (Rh), 3,2% (Pd) e 2,9% (Pt) para a solução de 10 ng L⁻¹; 2,8% (Rh), 2,6% (Pd) e 2,3% (Pt) para a solução de 50 ng L⁻¹; e 1,7% (Rh), 1,2% (Pd) e 1,3% (Pt) para a solução de 100 ng L⁻¹. Estes resultados comprovam que o sistema de fluxo desenvolvido permitia obter uma boa precisão analítica.

A avaliação da exactidão dos resultados foi feita através da análise de amostras de urina (n = 5) antes e após a adição de pequenos volumes de uma solução concentrada dos PGEs em estudo (ensaios de recuperação), tendo esta adição sido feita previamente à digestão das amostras (Tabela 6.4). Os valores da taxa de recuperação variaram entre 89% e 105% para o Rh, 90% e 104% para o Pd e 93% e 105% para a Pt, pelo que se pode concluir que o sistema de fluxo permitia obter resultados suficientemente exactos para a determinação daqueles PGEs em amostras de urina.

6.4 Conclusões

O sistema de fluxo desenvolvido e avaliado neste trabalho apresentava com principal vantagem o facto de permitir a determinação de níveis ultravestigiais de PGEs em amostras de urina por Q-ICP-MS, de um modo simples, exacto e preciso.

Recorrendo a uma estratégia de fluxo do tipo análise por injeção sequencial foi possível construir um sistema versátil, no qual a eluição da coluna de pré-concentração era efectuada de modo reverso, sem se necessitar para tal de reconfigurar o sistema de fluxo ou de utilizar outra unidade propulsora. De facto, a

unidade responsável pela gestão de fluidos do sistema de SIA propriamente dito (bomba peristáltica BP_2) era sempre a mesma durante todas as fases de funcionamento do sistema: pré-concentração dos PGEs, lavagem do sistema de fluxo, eluição dos PGEs retidos e condicionamento da coluna.

Depois de optimizado, o sistema de fluxo permitia efectuar a análise de três elementos ultravestigiais, Pd, Pt e Rh, numa matriz muito complexa, análise que é reconhecidamente muito sujeita a interferências espectrais e não espectrais. Na verdade, tal como já foi discutido na introdução a este Capítulo, este tipo de interferências acaba por condicionar a utilização da técnica de ICP-MS, quando se dispõe de um espectrómetro com um analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo. Neste trabalho, a eliminação de interferências espectrais e não espectrais foi possível através da etapa de “separação/pré-concentração”, a qual permitia a pré-concentração dos PGEs ao mesmo tempo que promovia a eliminação dos metais interferentes. Deste modo, em simultâneo, foi possível, recorrer a um equipamento de Q-ICP-MS na sua configuração *standard*, baixar os limites de detecção para cada um dos três PGEs e evitar a posterior formação de iões interferentes no plasma.

Há ainda a salientar o desempenho da resina Metalfix™ Chelamine™, a qual nas condições utilizadas apresentava muito maior afinidade para os PGEs do que para os metais interferentes e um bom comportamento em termos físicos, nomeadamente a manutenção de um volume relativamente constante mesmo quando posta em contacto com soluções com valor de pH bastante diferente. Estas características reveladas pela resina Metalfix™ Chelamine™ acabaram por se traduzir na obtenção de uma metodologia analítica com limites de detecção, precisão e exactidão adequados às determinações em causa.

Dado o crescente interesse na determinação de PGEs em amostras biológicas em geral, o sistema de fluxo proposto poderá ainda representar uma contribuição importante para a determinação de PGEs noutras matrizes igualmente complexas.

6.5. Bibliografia

Almeida, A.A., Jun, X. e Lima, J.L.F.C. (2000). Flame AAS determination of copper in urine using a flow injection on-line preconcentration system based on a polyamine chelating ion exchange resin. *Atomic Spectroscopy*. **21**: 187-193.

Balcerzak, M. (1997). Analytical methods for the determination of platinum in biological and environmental materials. *Analyst*. **122**: 67R-74R.

Barefoot, R.R. e Van Loon, J.C. (1999). Review article. Recent advances in the determination of the platinum group elements and gold. *Talanta*. **49**: 1-14.

Begerow, J., Turfeld, M. e Dunemann, L. (1997a). Determination of physiological noble metals in human urine using liquid-liquid extraction and Zeeman electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **340**: 277-283.

Begerow, J., Turfeld, M. e Dunemann, L. (1997b). Determination of physiological palladium and platinum levels in urine using double focusing magnetic sector field ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **359**: 427-429.

Bencs, L., Ravindra, K. e Van Grieken, R. (2003). Methods for the determination of platinum group elements originating from the abrasion of automotive catalytic converters. *Spectrochimica Acta Part B*. **58**: 1723-1755.

Benkhedda, K., Dimitrova, B., Infante, H.G., Ivanova, E. e Adams, F.C. (2003). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **18**: 1019-1025.

Blain, S., Appriou, P. e Handel, H. (1993). Preconcentration of trace metals from sea water with the chelating resin Chelamine. *Analytica Chimica Acta*. **272**: 91-97.

Bocca, B., Alimonti, A., Cristaudo, A., Cristallini, E., Petrucci, F. e Caroli, S. (2004). Monitoring of the exposure to platinum-group elements for two Italian population groups through urine analysis. *Analytica Chimica Acta*. **512**: 19-25.

Coedo, A.G., Dorado, M.T., Padilla, I. e Alguacil, F. (1997). Preconcentration and matrix separation of precious metals in geological and related materials using Metalfix- Chelamine resin prior to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **340**: 31-40.

Costa, R.C.C., Almeida, A.A., Araújo, A.N. e Silva, V.L. (2002). Sequential preconcentration for the ETAAS determination of Pd in human urine. *Atomic Spectroscopy*. **23**: 17-23.

Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*. **24**: 416-425.

Fan, Z., Jiang, Z., Yang, F. e Hu, B. (2004). Determination of platinum, palladium and rhodium in biological and environmental samples by low temperature electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with diethyldithiocarbamate as chemical modifier. *Analytica Chimica Acta*. **510**: 45-51.

Groom, S., Schaldach, G., Ulmer, M., Walzel, P. e Berndt, H. (2005). Adaptation of a new pneumatic nebulizer for sample introduction in ICP spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **20**: 169-175.

Iglesias, M., Anticó, E. e Salvadó, V. (2000). Characterization of Metalfix-Chelamine and its application in precious metal adsorption. *Solvent Extraction and Ion Exchange*. **18**: 965-979.

Iglesias, M., Anticó, E. e Salvadó, V. (2003). On-line determination of trace levels of palladium by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. **59**: 651-657.

Krachler, M., Alimonti, A., Petrucci, F., Irgolic, K.J., Forastiere, F. e Caroli, S. (1998). Analytical problems in the determination of platinum-group metals in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **363**: 1-10.

May, T.W. e Wiedmeyer, R. H. (1998). A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*. **19**: 150-155.

Muzikar, M., Fontàs, C., Hidalgo, M., Havel, J. e Salvadó, V. (2006). A preconcentration system using polyamine Metalfix-Chelamine resin for the on-line determination of palladium(II) and platinum(IV) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*. **70**: 1081-1086.

Perry, B.J., Barefoot, R.R. e Van Loon, J.C. (1995). Inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of platinum group elements and gold. *Trends in Analytical Chemistry*. **14**: 388-397.

Petrucci, F., Violante, N., Senofonte, O., De Gregorio, M., Alimonti, A., Caroli, S., Forte, G. e Cristaudo, A. (2004). Development of an analytical method for monitoring worker populations exposed to platinum-group elements. *Microchemical Journal*. **76**: 131-140.

Pohl, P., Prusisz, B. e Zyrnicki, W. (2005). Application of Metalfix Chelamine prior to the determination of noble metals by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. **67**: 155-161.

Ravindra, K., Bencs, L. e Van Grieken, R. (2004). Platinum group elements in the environment and their health risk. *The Science of the Total Environment*. **318**: 1-43.

Rodushkin, I., Engström, E., Stenberg, A. e Baxter, D.C. (2004). Determination of low-abundance elements at ultra-trace levels in urine and serum by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **380**: 247-257.

Ruzicka, J. (1992). The second coming of flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **261**: 3-10.

Qu, Y.B. (1996). Recent developments in the determination of precious metals. A review. *Analyst*. **121**: 139-161.

Taylor, H.E. (2001). Inductively coupled plasma-mass spectrometry. Practice and techniques. 1ª edição, Academic Press. San Diego.

Wang, J. e Hansen, E.H. (2001). Interfacing sequential injection on-line preconcentration using a renewable micro-column incorporated in a “lab-on-valve” system with direct injection nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **16**: 1349-1355.

Wang, J., Hansen, E.H. e Gammelgaard, B. (2001). Flow-injection on-line dilution for multi-element determination in human urine with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. **55**: 117-126.

Woo, J. e Cannon, D.C. (1984). Metabolic intermediates and inorganic ions. In: J.B. Henry (ed.), Clinical diagnosis and management by laboratory methods. W.B. Saunders. Philadelphia.

Xu, S., Sperling, M. e Welz, B. (1992). Flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium and copper in biological reference materials using on-line sorbent extraction preconcentration. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **344**: 535-540.



Capítulo

7

Considerações finais

7. Considerações finais

Os métodos baseados em técnicas analíticas de espectrofotometria atómica e de espectrometria de massa desempenham um papel muito importante em Química Clínica. De facto, como já foi referido nesta dissertação, a possibilidade de detectar concentrações vestigiais de elementos metálicos, e até mesmo dos diferentes isótopos do mesmo metal em amostras biológicas, veio permitir conhecer melhor a patogénese e a etiologia de muitas doenças.

Por outro lado, em resultado das vantagens que apresenta e que já foram também muito discutidas ao longo desta dissertação, a execução em linha de etapas do processo analítico é cada vez mais um objectivo a atingir, ao mesmo tempo que as diferentes estratégias de fluxo se assumem como ferramentas essenciais para o efeito.

Assim, com o trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação, pretendeu-se criar sistemas de fluxo capazes de executarem em linha algumas das tarefas mais comumente realizadas aquando da utilização das referidas técnicas de espectrofotometria atómica e espectrometria de massa: a diluição/adição de reagentes e a pré-concentração/separação do analito das espécies interferentes, no sentido de aumentar as potencialidades analíticas das mesmas e tornar a sua utilização mais prática e mais automática, e os resultados mais fiáveis.

Em todos os Capítulos desta dissertação especificamente dedicados à descrição de cada um dos trabalhos experimentais foram retiradas as principais conclusões dos resultados obtidos e muitas vezes fez-se também a comparação das metodologias analíticas desenvolvidas com outras metodologias similares ou alternativas existentes para o mesmo efeito. Neste Capítulo, a título de conclusões de carácter geral, faz-se

agora uma sistematização dos resultados à luz dos objectivos que motivaram o trabalho realizado.

Relativamente ao trabalho apresentado no Capítulo 3 (determinação de rubídio por espectrofotometria atómica) é possível referir que a versatilidade e a reprodutibilidade inerentes aos sistemas de fluxo com multicomutação, ficaram mais uma vez evidenciadas. De facto, recorrendo apenas a uma bomba de pistão, que era o dispositivo responsável por toda a gestão de fluidos no interior do sistema, foi possível aplicar o sistema de fluxo desenvolvido à análise de amostras que apresentavam uma concentração de analito muito elevada e bastante variável, sem ser necessário recorrer-se a alterações na configuração inicial do sistema de fluxo, ou a outras alterações de carácter instrumental que aparecem referidas na literatura, como seja a modificação do grau de rotação do queimador do espectrofotómetro. Também a estratégia de diluição utilizada (diluição por amostragem de zonas), teve grande influência na versatilidade demonstrada pelo sistema de fluxo desenvolvido, pois permitiu obter um intervalo alargado de factores de diluição apenas com base na amostragem temporizada. A facilidade de controlo electrónico dos dispositivos utilizados na construção do sistema de fluxo, a já referida bomba de pistão e as válvulas solenóides de 3-vias, também contribuiu para o elevado grau de automatização do sistema, na medida em que por meio de um mecanismo de controlo por retroacção (*feedback*) este era capaz de ajustar o grau de diluição das amostras, repetindo a análise utilizando um tempo de reamostragem diferente.

No Capítulo 4 demonstrou-se que a mais recente estratégia de fluxo (multi-impulsão), também pode ser utilizada em sistemas acoplados a equipamento de espectrofotometria atómica, apresentando as mesmas vantagens já anteriormente evidenciadas no acoplamento a outro tipo de detectores, nomeadamente no que se refere à excelente capacidade de promover a mistura das soluções. De facto, até então era desconhecida a influência exercida por um fluxo pulsado sobre o processo global de aspiração, nebulização e atomização das soluções, característico do

equipamento de espectrofotometria atômica. Foram testados diferentes equipamentos de espectrofotometria atômica e estudados sistemas de fluxo de diferente configuração, a qual foi evoluindo no sentido quer de contornar dificuldades que foram surgindo, quer de tornar os sistemas capazes de realizar as tarefas pretendidas. Por fim, importa destacar que os sistemas desenvolvidos apresentavam uma configuração muito simples e permitiram obter resultados exactos, com um bom rendimento analítico, quando testados na análise de cálcio e magnésio em amostras de digestos de cabelo por espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama e de sódio em amostras de urina por fotometria de chama.

O estudo exaustivo do comportamento das micro-bombas solenóides, i.e., dos dispositivos responsáveis pela introdução e propulsão das soluções nos sistemas de fluxo por multi-impulsão, quando acopladas a equipamento de espectrofotometria atômica, abriu caminho para o trabalho apresentado no Capítulo 5 desta dissertação. Neste Capítulo é apresentado um sistema de fluxo de configuração modular, em que cada módulo funciona de modo independente, sendo que um dos módulos corresponde a um sistema de fluxo onde é explorada a estratégia de fluxo por multi-impulsão, que apresenta uma configuração mais complexa do que os sistemas de fluxo testados no Capítulo 4. A configuração modular permitia utilizar diferentes estratégias de fluxo e de amostragem em cada módulo (multicomutação e amostragem binária, num dos módulos; multi-impulsão e *merging zones*, no outro módulo), o que conferia uma grande versatilidade ao sistema de fluxo no seu todo. Assim, recorrendo a uma técnica instrumental muito difundida e acessível - a espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama - foi possível determinar a concentração de cobre em dois tipos de amostras nas quais aquele elemento se encontra em níveis de concentração muito diferentes.

Por fim, no trabalho apresentado no Capítulo 6 utilizou-se uma técnica analítica que, sendo mais recente, conquistou já a comunidade científica e os laboratórios mais

diferenciados devido às novas possibilidades que introduziu na Química Analítica em geral, e na Química Clínica em particular, possibilidades essas já apresentadas no Capítulo de Introdução a esta dissertação, das quais se destacam, a título de exemplo, a análise multi-elementar e a análise isotópica. Trata-se da técnica de ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). A estratégia de fluxo utilizada foi a de análise por injeção sequencial, que permitiu construir um sistema versátil, no qual a eluição da coluna de pré-concentração era efectuada de modo reverso, sem se necessitar para tal de reconfigurar o sistema de fluxo ou de utilizar outra unidade propulsora. De facto, a unidade responsável pela gestão de fluidos do sistema de fluxo era a mesma durante todas as fases de funcionamento do sistema: pré-concentração dos analitos, lavagem do sistema de fluxo, eluição dos analitos retidos e condicionamento da coluna. Neste trabalho, a eliminação de interferências não espectrais e espectrais (comuns em ICP-MS, particularmente quando se recorre a equipamento com um analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo: Q-ICP-MS) foi possível através da etapa de separação/pré-concentração, a qual permitia a pré-concentração dos analitos ao mesmo tempo que promovia a eliminação dos potenciais interferentes. Deste modo, foi possível determinar, em simultâneo, a concentração de ródio, paládio e platina em amostras de urina, recorrendo a um equipamento de Q-ICP-MS na sua configuração *standard*, tendo-se obtido resultados precisos e exactos.

Em termos gerais pode dizer-se que os sistemas de fluxo desenvolvidos demonstraram ser alternativas válidas para as determinações analíticas às quais foram aplicados, sendo que poderão ser ainda aplicados noutro tipo de determinações que requeiram idêntico pré-tratamento das amostras. Trata-se de sistemas com um modo de funcionamento simples, de baixo custo, robustos e com bom desempenho analítico. De facto, todos os sistemas de fluxo construídos mostraram ser suficientemente adequados ao propósito analítico pretendido, particularmente no que diz respeito ao rendimento analítico, aos limites de detecção e à precisão e exactidão obtidas. Estas

características, associadas à ausência de sofisticação do equipamento necessário, tornam estes sistemas de fluxo particularmente adequados à utilização na prática analítica de rotina.

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação merece continuidade no sentido de se continuarem a explorar as potencialidades do acoplamento de sistemas de fluxo às diferentes técnicas analíticas de espectrofotometria atómica e de espectrometria de massa e as potencialidades das diferentes estratégias de fluxo, quer utilizadas isoladamente, quer em associação. De facto, actualmente é reconhecida a vantagem de associar mais do que uma estratégia de fluxo no mesmo sistema de modo a combinar as vantagens específicas de cada uma delas, resultando assim sistemas de fluxo com melhor desempenho global, ideia chave na generalidade dos trabalhos realizados. Esta área de investigação assume particular interesse no âmbito da análise de elementos vestigiais e ultravestigiais em amostras biológicas, por se tratar de matrizes de composição reconhecidamente complexa, nas quais a determinação daquele tipo de analitos é geralmente prejudicada pela presença de outros componentes, maioritários, da amostra, necessitando as amostras de um tratamento prévio que poderá ser mais simples e eficaz se efectuado em linha por meio de um sistema de fluxo. Além disso, o recurso a estratégias de fluxo revela-se também vantajoso em áreas como a análise isotópica e a especiação, que são áreas actualmente de muito interesse, em grande parte devido à crescente utilização da técnica de ICP-MS.