

EFEITOS MATRICIAIS NA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM FLUIDOS BIOLÓGICOS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUZIDO COM VISÃO AXIAL

Resumo

A espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES) com visão axial foi utilizada para a análise de urina com a finalidade de obter limites de detecção aceitáveis, verificando suas vantagens e limitações.

Palavras-chave: material biológico, ICP-OES, urina

Luiz Rinaldo Bizaio^{1},
Prof. Dr. Francisco José Krug²*

Varian Indústria e Comércio Ltda¹
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP²

*1 Autor para Correspondência:
Av. Dr. Cardoso de Mello, 1644
CEP 04548-005. São Paulo. SP
Fone: (11) 3845-0444
E-mail:
luiz.bizaio@varianinc.com

Summary

The inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique with axial view was used for urine analysis was used in the analytical optimization for to get acceptable detection limits, checking the limitations and vantagens.

Keywords: biological material, ICP-OES, urine

Introdução

As amostras de matrizes biológicas como sangue, soro, cabelo e urina são analisadas para se determinar a concentração de elementos potencialmente tóxicos, como por exemplo, Pb, As, Sb, Al, Cd e Cr, com a finalidade de avaliar, prevenir e acompanhar a presença de intoxicação por estes elementos no ser humano. Os elementos determinados em material biológico são classificados como essenciais, não essenciais e tóxicos. Alterações nas concentrações destes elementos em fluidos e tecidos biológicos podem resultar em uma variedade de condições patológicas, e a determinação destes metais pode fornecer informações para diagnósticos e tratamentos de uma grande variedade de desordens metabólicas hereditárias ou adquiridas. Por isso, é extremamente importante o monitoramento de exposição de grupos populacionais a poluentes ambientais e industriais de um modo mais efetivo e constante.

A técnica de ICP-OES tem sido pouco utilizada na análise de amostras biológicas para determinação de elementos-traço devido ao fato da visualização radial empregada nos instrumentos não permitir a obtenção de limites de detecção adequados.

Este trabalho foi extraído da Dissertação de Mestrado de mesmo título, no qual os resultados e discussões sobre as três matrizes biológicas (urina, sangue e soro) estão apresentados. O objetivo desta publicação é utilizar a técnica de ICP-OES com visualização axial para a determinação de Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se e Tl em urina, verificando suas vantagens e limitações.

A técnica de ICP-OES, inicialmente descrita por Greenfield, tem sido extensivamente utilizada na determinação de elementos nas mais diversas matrizes. Entre 1975 e 1987, estima-se que o número de espectrômetros com plasma vendidos no mundo tenha superado seis mil unidades, com uma taxa de crescimento anual de 8%.

A técnica de ICP-OES com visualização axial passou a ser comercialmente disponível na década de 90 após as propostas relatadas a partir dos experimentos realizados por Lichte e Koirtjohann e por Demers. A utilização da visão axial implicou em algumas modificações tecnológicas. Uma interface passa a fazer parte do instrumento para eliminar a zona de recombinação instável de argônio – ar quente na extremidade do plasma, assim como incrementar a transmissão da radiação emitida e prevenir danos aos componentes óticos.

Atualmente existem dispositivos comercialmente disponíveis para esta interface: sistema composto por exaustão utilizado por instrumentos no qual a cauda final do plasma é succionada promovendo uma curva de 90°; “shear-gas” que consiste na introdução de um fluxo de gás (18 a 25L/min) em um ângulo de 90°, proporcionando o desvio físico da extremidade do plasma; sistema de cones, derivado do sistema utilizado na técnica de ICP-MS, com a introdução de argônio fluindo a 0,15L.min⁻¹ em contra fluxo para prevenir a projeção de partículas na pré-ótica do instrumento.

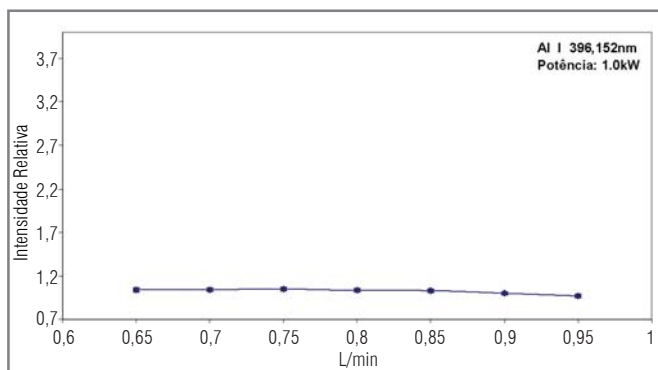


Figura 1. Exemplo do efeito da vazão do gás de nebulização sobre Al 396,152nm na urina

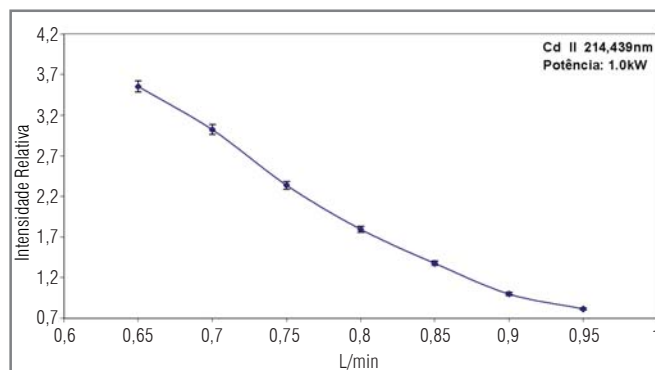


Figura 2. Exemplo do efeito da vazão do gás de nebulização sobre Cd 214,439nm na urina

A técnica de ICP-OES com visão axial e interfaceamento por cones apresenta-se hoje como uma ferramenta analítica interessante para ser aplicada a materiais biológicos como sangue, soro de sangue e urina, em função da possibilidade de alcançar melhores limites de detecção.

Vários metais podem ser classificados como essenciais ou tóxicos, dependendo da concentração no organismo ou da forma química. A interpretação de dados na composição elementar de tecidos humanos e líquidos corpóreos freqüentemente precisa ser baseada no uso de variações de valores de referência que levam em conta as influências nos hábitos de dieta diferentes e geoquímicas e outras ambientais, provocando anomalias no con-

teúdo do elemento-traço nas amostras. Para elementos bioquimicamente essenciais sujeitos ao controle homeostático, tais variações são prováveis de estarem próximas em populações de sujeitos saudáveis. Para elementos não essenciais, as variações podem ser amplas, dependendo do nível de exposição dos sujeitos.

Instrumentos e Acessórios

Um espectrômetro de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) Varian, modelo VISTA AX, com detecção simultânea e visão axial, que foi adquirido dentro do projeto temático FAPESP 98/10814-3, instalado no Laboratório de Espectroanalítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, foi utilizado para a determinação de Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se e Tl em urina.

O instrumento possui um sistema gerador de rádio-frequência de 40,68MHz capaz de fornecer potência de até 1,7kW, e é controlado por computador com processador tipo Pentium.

Um conjunto de sistema de nebulização composto por câmara Sturman-Master (Varian referência 01-105931-90) e com um nebulizador tipo V-Goove (Varian referência 99-100574-00), foi utilizado para introdução das amostras no plasma. Uma tocha axial de baixo fluxo (Varian referência 20-100904-00) foi utilizada para manter o plasma.

Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada de alta pureza (resistividade 18,2MW.cm), e os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno (Nalgene). As soluções relacionadas a seguir foram utilizadas para os experimentos no ICP-OES. Soluções estoque monoelementares 1000mg.L⁻¹, dos elementos utilizados (Y, Sc, Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Se, Tl, Zn, Pb, Co, Fe, Ni e Sb) preparadas a partir de ampolas Titrisol Merck, de acordo com recomendação do

Tabela 1. Elementos e comprimentos de onda utilizados na análise de urina

Elemento	λ (nm)
Al	I 396,152
As	I 188,890
Cd	II 214,439
Co	II 238,892
Cr	II 267,716
Cu	I 324,754
Fe	II 238,204
Mg	I 285,213
Mn	II 257,610
Ni	II 231,604
Pb	II 220,353
Sb	I 217,582
Se	I 196,026
Tl	I 351,923

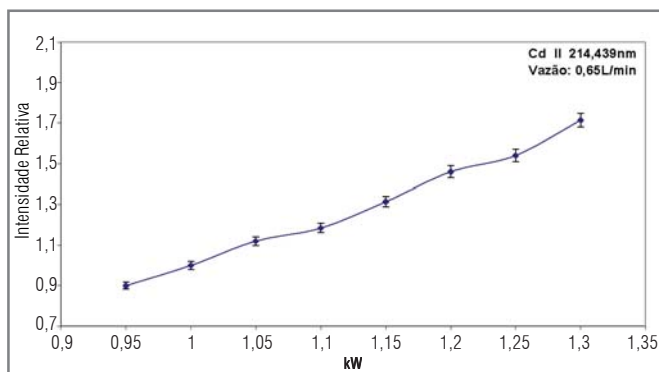


Figura 3. Exemplo do efeito da potência do gerador de RF sobre Cd 214,439nm na urina

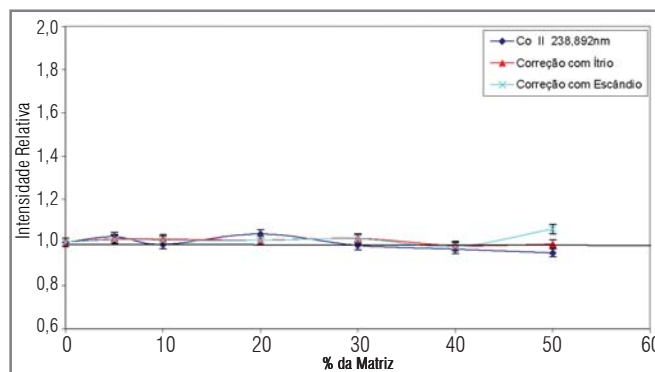


Figura 4. Exemplo do efeito do teor da urina na emissão atômica do Co 238,892nm

fabricante, onde os mesmos foram diluídos a 1 litro.

Foram utilizados os seguintes materiais de referência certificados (Quality Control Technology – Sidney, Austrália) de urina: U-91, U-92 e U-96. As amostras de urina foram injetadas tal qual.

A influência da variação do teor da matriz (urina) nos elementos foi avaliada com várias soluções contendo diferentes concentrações da matriz: Solução 50% da matriz, composta por 2,0mL de urina e 2,0mL de solução contendo 500mg.L⁻¹ Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se e Tl. Concentrações da matriz de 40, 30, 20, 10 e 0% foram devidamente preparadas.

A influência da variação do teor da matriz (urina) nos elementos com a utilização da padronização interna com padrão de Escândio foi avaliada com várias soluções contendo diferentes concentrações da matriz: Solução 50% da matriz, composta por 2,0mL de urina e 2,0mL de solução contendo 500mg.L⁻¹ Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se e Tl, e 200mg.L⁻¹ Sc. Concentrações da matriz de 40, 30, 20, 10 e 0% foram devidamente preparadas. Do mesmo modo, foram preparadas as soluções contendo Ítrio como padrão interno.

Resultados e Discussões

Os comprimentos de onda utilizados (Tabela 1) não apresentavam interferência espectral e foram selecionados de acordo com a maior sensibilidade proporcionada.

Uma amostra de urina foi utilizada para realização do estudo do comportamento da intensidade do sinal de intensidade de emissão em função da vazão do gás de nebulização.

Os dados referentes a Al, Cu e Mg mostram um comportamento estável do sinal de intensidade relativa com a vazão do gás e com o mesmo comportamento referente ao soro para estes elementos. As incertezas associadas às medidas da intensidade (n=5) são devidas à menor intensidade da linha de emissão do antimônio relativa aos outros analitos. O comportamento para Sb e ao Tl apresentou efeito que não se pode afirmar que estes estejam em uma condição estável ou sofrendo influência da alteração da vazão. Os elementos As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb

e Se, mostram um incremento do sinal de intensidade com a variação da vazão, este incremento está relacionado ao maior tempo de permanência dos átomos no plasma. A vazão de nebulização estabelecida foi de 0,65L.min⁻¹.

Uma amostra de urina foi utilizada para realização do estudo do comportamento da intensidade do sinal de emissão pela potência aplicada ao gerador de RF. A vazão de nebulização utilizada foi de 0,65L.min⁻¹, estabelecida no teste anterior.

Os dados obtidos para todos os elementos mostram um incremento na sensibilidade de acordo com o aumento da potên-

Tabela 2. Limites de detecção em urina

Elemento	L.D. (µg.L ⁻¹) Urina	Valores de Referência ⁵⁹ (µg/dia)
Al	0,8	10 – 100
As	11,0	10 – 30
Cd	1,2	1 – 5
Co	3,5	0,5 – 2
Cr	0,9	0,2 – 2
Cu	0,5	30 – 60
Fe	1,2	100 – 600
Mg	0,7	-
Mn	0,2	0,5 – 2
Ni	8,2	2 – 8
Pb	16,0	10 – 20
Sb	27,0	-
Se	19,0	25 – 50
Tl	16,9	-

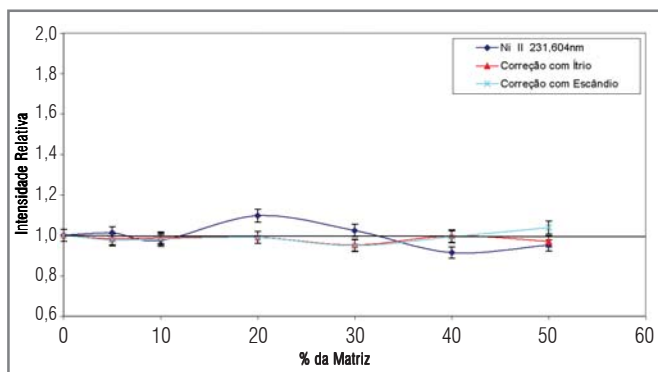


Figura 5. Exemplo do efeito do teor da urina na emissão atômica do Ni 231,604nm

cia aplicada ao gerador. O valor estabelecido de potência foi de 1,2kW. Alguns elementos (As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb e Se) apresentaram um incremento na intensidade de até 50% com relação ao sinal inicial, enquanto outros elementos (Al, Cu, Mg e Tl) apresentaram um incremento aproximado de 20%.

As soluções descritas anteriormente foram utilizadas para realização do estudo do comportamento da intensidade do sinal de emissão pelo teor da matriz de urina. As soluções contendo ítrio e escândio foram utilizadas para a determinação da eficiência de correção dos efeitos de introdução das amostras.

Tabela 3. Análise de material de referência de urina U-91 (n=5)

Elemento	Teores Esperados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Teores Obtidos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Al	12,1 +/- 9,2	14,2 +/- 0,9
As	43,8 +/- 16,4	48,1 +/- 9,5
Cd	10,7 +/- 2,3	12,8 +/- 0,9
Co	14,7 +/- 4,1	16,3 +/- 1,4
Cr	25,3 +/- 1,2	26,4 +/- 0,7
Cu	21,8 +/- 7,0	24,8 +/- 2,9
Fe	520 +/- 80	495 +/- 53
Mg	51040 +/- 4351	53412 +/- 2946
Mn	30,2 +/- 4,7	32,1 +/- 1,6
Ni	22,9 +/- 2,3	26,3 +/- 7,2
Pb	19,1 +/- 9,3	26,8 +/- 5,1
Sb	27,4 +/- 8,3	< 27
Se	31,9 +/- 23,9	48,2 +/- 16,7
Tl	25,1 +/- 10,0	< 16,9

Tabela 4. Análise de material de referência de urina U-92 (n=5)

Elemento	Teores Esperados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Teores Obtidos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Al	13,2 +/- 4,6	14,3 +/- 1,3
As	37,1 +/- 16,2	32,4 +/- 7,8
Cd	14,1 +/- 2,0	16,2 +/- 1,3
Co	18,2 +/- 2,4	16,4 +/- 4,2
Cr	33,2 +/- 3,2	35,0 +/- 0,7
Cu	22,1 +/- 4,0	23,6 +/- 1,4
Fe	491 +/- 107	523 +/- 79
Mg	30140 +/- 2503	29862 +/- 1672
Mn	29,7 +/- 4,6	31,9 +/- 2,4
Ni	27,0 +/- 3,3	32,0 +/- 6,5
Pb	20,3 +/- 7,7	25,1 +/- 6,9
Sb	27,5 +/- 2,4	< 27,0
Se	32,0 +/- 12,6	45,6 +/- 8,2
Tl	21,7 +/- 6,4	< 16,9

Os dados representados nas figuras mostram que, para o Mg, a utilização dos padrões internos (Sc (II) 361,383nm e Y (II) 371,029nm) não proporcionou nenhum efeito de correção eficiente e as curvas mostram um incremento na sensibilidade ligado diretamente ao aumento da concentração da matriz. A utilização da padronização para este elemento serve apenas para auxiliar na melhoria da exatidão dos valores obtidos, que com a correção passa a possuir uma recuperação de 130% contra 160% sem padrão interno.

Um grupo de elementos (Al, As, Co e Sb) apresentou curvas nas quais pode-se observar que não existe a necessidade da correção por padronização interna. O grupo de elementos formados por Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Se apresentou o mesmo desempenho para ambos padrões internos e a correção resultou em boa recuperação (95 a 105%). O Tl não apresentou variações significativas e devido ao elevado desvio das leituras não foi possível determinar a eficiência do padrão interno. Devido aos resultados de desvio obtidos com a utilização dos padrões internos, o método analítico foi definido sem a necessidade de utilização dos padrões internos.

Os limites de detecção obtidos para urina (Tabela 2) mostram que é possível realizar a detecção de teores de Al, Cu, Fe, Mn e

Tabela 5. Análise de material de referência de urina U-96 (n=5)

Elemento	Teores Esperados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Teores Obtidos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Al	76,4 +/- 11,3	78,6 +/- 5,3
As	19,3 +/- 3,4	17,3 +/- 6,5
Cd	3,4 +/- 0,6	4,9 +/- 3,9
Co	8,3 +/- 1,0	10,6 +/- 2,6
Cr	17,8 +/- 1,4	19,0 +/- 1,1
Cu	171,8 +/-15,3	183 +/- 8,6
Fe	182,1 +/- 49,7	178,3 +/- 19,6
Mg	189652 +/- 7196	183591 +/- 5672
Mn	13,4 +/- 0,8	14,0 +/- 0,9
Ni	31,9 +/- 3,1	35,9 +/- 4,3
Pb	158,1 +/- 26,1	165,4 +/- 12,7
Sb	5,2 +/- 0,4	< 27,0
Se	81,6 +/- 14,1	75,3 +/- 10,8
Tl	5,8 +/- 1,2	< 16,9

Se, permitindo a realização da determinação de suas concentrações dentro da faixa de valores de referência. Para os teores de As, Cd, Cr e Pb, o método pode ser aplicado apenas para identificação de contaminação e controle de indivíduos contaminados. Mg, Sb e Tl não possuem teores de referência e servem, neste caso, apenas para trabalho de comparação. Co e Ni não podem ser quantificados dentro da faixa de referência, pois seus limites de detecção estão acima dos valores máximos de referência.

Os materiais de referência de urina foram usados para avaliação da exatidão do método proposto, utilizando-se vazão do gás de nebulização e a potência do gerador de RF estabelecidos nos testes. Os três materiais de referência testados, U-91, U-92 e U-96 foram preparados conforme procedimento descrito em 3.2 e os resultados obtidos estão mostrados nas Tabelas 3, 4 e 5. Os teores obtidos de Sb e Tl ficaram abaixo do limite de detecção, enquanto os demais elementos apresentaram razoável concordância com os valores certificados. Utilizando-se o teste t de variância combinada para diferenças entre duas médias

aritméticas, com nível de significância 0,05 para o teste bicaudal, obtêm-se as seguintes informações:

- A hipótese de igualdade entre os teores esperados e os teores obtidos é válida para Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, e Pb, para os três materiais de referência de urina.
- A hipótese de igualdade entre os teores esperados e os teores obtidos é válida para Se nos materiais de referência U-91 e U-96.
- A hipótese de igualdade não pode ser testada para Sb, e Tl, pois os valores obtidos estavam abaixo do limite de detecção.

Conclusões

A determinação simultânea de elementos-traço em urina, utilizando a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-OES) com visão axial, é viável para a quantificação de alumínio, arsênio, cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, níquel e chumbo em urina. As amostras e padrões de urina foram injetados de modo direto, sem a ocorrência de problemas de nebulização.

A evolução da instrumentação na técnica de ICP-OES com visão axial permitiu a quantificação e obtenção de limites de detecção de matrizes complexas, que apresentam variações frequentes de composição entre amostras, mesmo na presença de concentrações de elementos altamente ionizáveis.

A utilização da técnica de ICP-OES permite a quantificação dos elementos descritos mais rapidamente do que a técnica normalmente utilizada, GFAAS. Por exemplo, na determinação dos 10 elementos em urina, seriam necessários 20 min por GFAAS em uma amostra, não considerando os tempos necessários para a calibração, enquanto que os mesmos elementos podem ser quantificados em 1,5 min por ICP-OES com visão axial.

O custo instrumental superior do ICP-OES perante o GFAAS é compensado pela maior taxa de amostragem e a capacidade de realizar uma quantidade maior de determinações.

O GFAAS e o ICP-OES passam a ser técnicas complementares na quantificação de elementos-traço em matrizes biológicas, graças à interface plasma – ótica, composta por cone.

A visualização axial utilizada neste trabalho abre uma nova possibilidade da técnica.

Referência

Bizaio LR. *Efeitos matriciais na determinação de elementos-traço em fluidos biológicos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido com visão axial*. Dissertação (Mestrado)—Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2003.