

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

Aplicações a Processos Bioquímicos

DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELO

PROFESSOR DOUTOR JÚLIO MANUEL da CRUZ MORAIS

**CONTRIBUTO PARA O ESTABELECIMENTO DE
UM MÉTODO PARA ANÁLISE DO TBT EM URINA
DE RATO WISTAR**

JOSÉ MANUEL ALVES FERRO

ÉVORA

2002

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri”

ÍNDICE GERAL

	PÁG.
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
AGRADECIMENTOS	IX
OBJECTIVO DO TRABALHO	i
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. COMPORTAMENTO QUÍMICO DO TBT NA ÁGUA	7
1.2.ESCOLHA DO MÉTODO PARA ANÁLISE	10
2.PRINCÍPIOS GERAIS DA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA	12
2.1.Interferências	14
2.1.1.Interferências espectrais	15
2.1.1.1.Métodos para a correcção das interferências na solução da amostra	17
2.1.2.Interferências químicas	21
2.1.3.Interferências físicas	24
2.1.4.Solventes orgânicos	26
2.1.5.Interferências de ionização	27
2.2.Métodos de avaliação	28
2.2.1.Técnicas utilizadas	29
2.3.Instrumentação	33
2.3.1.Fontes de emissão	35
2.3.1.1.Fontes contínuas	35
2.3.1.2.Fontes de emissão de linha	36

2.3.1.2.1.Lâmpadas de descarga sem eléctrodos	36
2.3.1.2.2.Lâmpada de cátodo oco	37
2.3.1.2.3.Lâmpadas de gradiente de temperatura	39
2.3.2.Atomizadores	40
2.3.2.1.A chama	41
2.3.2.1.1.Queimadores	42
2.3.2.2.Câmara de grafite	45
2.3.3.Monocromadores	47
2.3.4.Detectores e amplificadores	49
2.4.Procedimento a seguir ao utilizar um espectrómetro de absorção atómica	52
3.PRINCÍPIOS GERAIS DA ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR	54
3.1.Interferências	62
3.2.Variáveis que afectam a fluorescência	62
3.2.1.Rigidez estrutural	63
3.2.2.Heteroátomos e grupos substituintes	63
3.2.3.Factores ambientais	66
3.3.Métodos de avaliação	70
3.3.1.Técnicas utilizadas	71
3.4.Instrumentação	72
3.4.1.Fontes de excitação	74
3.4.2.Selectores de comprimento de onda	75
3.4.3.Células	76
3.4.4.Detectores	76
4.METODOLOGIA	78
4.1.Equipamentos utilizados	80
4.2.Reagentes utilizados	83
4.2.1.Preparação e conservação das soluções	84
5.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	86
5.1Espectrometria de absorção atómica	86

5.2.Fluorimetria	88
5.2.1.Estudo do método	88
5.2.1.1.Doseamento do cloreto de TBT a pH 6,9	89
5.2.1.2.Doseamento do cloreto de TBT a pH 7,2	89
5.2.1.3.Doseamento do cloreto de TBT a pH 7,5	90
5.2.2.Estudo <i>In Vitro</i>	90
5.2.2.1.Selecção do melhor solvente	90
5.2.2.2.Construção da curva de calibração adicionando várias concentrações de cloreto de TBT à urina	98
5.2.2.3.Análise de uma amostra problema	100
5.2.3.Estudo <i>In Vivo</i>	102
5.2.3.1.Quantificação do cloreto de TBT excretado pelos ratos	104
6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	106
6.1.Espectrometria de Absorção Atómica	106
6.2.Fluorimetria	107
6.2.1.Estudo do método	107
6.2.2.Estudo <i>in vitro</i>	117
6.2.2.1.Selecção do melhor solvente para extracção do TBT da urina	117
6.2.2.2.Construção da curva de calibração	118
6.2.2.3..Análise de uma amostra problema	121
6.2.3.Estudo <i>in vivo</i>	122
6.2.3.1.Quantificação do cloreto de TBT excretado pelo organismo dos ratos	122
7.CONCLUSÕES	125
8. BIBLIOGRAFIA	126
9.ANEXOS	131
Anexo 1 — Registo do controlo do Wistar 1	132
Anexo2 — Registo do controlo do Wistar 2	133
Anexo 3 — Registo do controlo do Wistar 3	134
Anexo 4 —Cálculos para a determinação do cloreto de TBT extraído da urina dos ratos Wistar	135

ÍNDICE DE GRÁFICOS

PÁG.

Gráfico 6.1. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 6,9	108
Gráfico 6.2. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 6,9	110
Gráfico 6.3. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,2.	111
Gráfico 6.4. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,2.	113
Gráfico 6.5. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,5.	114
Gráfico 6.6. Mostra a variação da concentração de fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,5.	116
Gráfico 6.7. <i>Curva de calibração</i> . Mostra a variação da concentração do cloreto de TBT em função da fluorescência	120

ÍNDICE DE TABELAS

PÁG.

Tabela 3.1. Grupos substituintes e efeitos causados pela fluorescência	64
Tabela 5.1. Composição da água (segundo o boletim do Instituto Geológico e Mineiro)	103
Tabela 5.2. Composição da ração dos ratos (segundo o fabricante)	103
Tabela 6.1. resultados obtidos por espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite	106
Tabela 6.2. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 6,9, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm	108
Tabela 6.3. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 6,9, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm.	109
Tabela 6.4. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 7,2, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm.	111
Figura 6.5. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 7,2, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm.	112
Tabela 6.6. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 7,5, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm.	114
Tabela 6.7. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetina para o valor de pH 7,5, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm	115
Tabela 6.8. Resultados da análise da amostra de cloreto de TBT, extraída da urina por cada um dos solventes.	118
Tabela 6.9. Valores das leituras feitas pelo fluorímetro para a construção da curva de calibração.	119
Tabela 6.10. Valores médios da fluorescência das cinco réplicas para cada um dos valores da concentração do cloreto de TBT nas amostras.	120
Tabela 6.11. Registo da fluorescência da análise da amostra (<i>duas leituras</i>) problema e da sua concentração obtida através da curva de calibração.	121
Tabela 6.12. registo da fluorescência (<i>duas leituras de cada amostra</i>) do cloreto de TBT extraído e da sua concentração da urina de cada um dos ratos analisados.	123
Tabela 6.13. Registo de controle do Wistar 1	132

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1.1.Representação das fórmulas estruturais para os compostos orgânicos do estanho	2
Figura 2.1.representação esquemática do fenómeno de absorção e emissão de radiação	12
Figura 2.2.Comprimento de onda da linha de ressonância do Ba existentes numa mistura de elementos alcalino-terrosos	16
Figura 2.3.Esquema de um sistema com fonte contínua para a correcção de fundo	18
Figura 2.4.Esquema de um aparelho de absorção atómica com câmara de grafite que permite a correcção de fundo baseada no efeito de Zeeman	19
Figura 2.5.Esquema da linha de emissão em lâmpadas de cátodo oco	20
Figura 2.6.Representação gráfica da recta de calibração no método da adição padrão	31
Figura 2.7.Esboço de um espectrómetro de absorção atómica	34
Figura 2.8.Lâmpada de descarga sem eléctrodos	37
Figura 2.9.Esquema da lâmpada vista de lado	38
Figura 2.10.Esquema da lâmpada vista de frente	38
Figura 2,11.Esquema de uma lâmpada de gradiente de temperatura	40
Figura 2.12.Queimador de consumo total	42
Figura 2.13.Queimador de Pré-Mistura	44
Figura 2.14Secção transversal de uma câmara de grafite	45
Figura 2.15.Esquema de uma câmara de grafite	46
Figura 2.16.Monocromador de rede de difracção	48
Figura 2.17.Esquema do mecanismo de uma rede de difracção	49
Figura 2.18.Secção transversal de um tubo fotomultiplicador	51
Figura 3.1.Esquema dos estados, singlete fundamental e excitado e triplete excitado	56
Figura 3.2.Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente	57
Figura 3.3.Esquema de um fluorímetro	72
Figura 3.4.Esquema de um espectrofluorímetro de feixe duplo	74
Figura 4.1.Espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite	80
Figura 4.2.Espectrofluorímetro	81
Figura 4.3.Medidor de pH	81

Figura 4.4.Centrífuga	82
Figura 4.5.Evaporador rotativo	82
Figura 4.6.Bidestilador	83

Agradecimentos:

O trabalho cuja edificação agora concluímos não teria, por certo, chegado ao fim se não fosse a preciosa colaboração prestada, directa ou indirectamente, por diversas pessoas e instituições de cujos valiosos contributos não posso esquecer.

Assumindo o risco de incorrer em algum esquecimento, cabe-me, contudo, aqui agradecer muito especialmente:

- Ao professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais, orientador deste dissertação, pela sua valiosa contribuição, o seu estímulo constante, pelos preciosos saberes que sempre me transmitiu, pela pertinência das suas observações e sugestões, pela disponibilidade com que sempre me atendeu e pelo singular humanismo, tolerância e compreensão que sempre manifestou em todos os momentos.
- Ao professor Doutor António Manuel Neto Vaz, corientador desta dissertação, pelo seu estímulo, a sua amizade, a sua disponibilidade e humanismo sempre manifestados e pelos conhecimentos transmitidos.
- À Dr.^a Fátima Candeias, pelo apoio e estímulo imprescindível na realização da parte prática deste trabalho.
- Às senhoras D. Jesuína Mósca e D. Anabela Cabeça, pela amizade e ajuda que sempre me dispensaram.
- À Jesus por todo o apoio e estímulo que sempre me disponibilizou.

- Ao Departamento de Química da Universidade de Évora pela oportunidade de poder realizar o presente trabalho e todo o apoio demonstrado.

- Aos órgãos de gestão e colegas da Escola Secundária Diogo de Gouveia, pelo estímulo e tolerância sempre manifestados.

OBJECTIVO DO TRABALHO

Neste trabalho, pretendemos estudar as condições analíticas para a determinação do tributilo estanho (TBT) por espectrometria de absorção atómica e fluorimetria, tendo em vista a sua análise toxicológica.

Neste sentido, procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica e a estudos experimentais preliminares por espectrometria de absorção atómica utilizando a câmara de grafite (Boiteau *et al.*, 1978) e por fluorimetria empregando a técnica da fisetine (3, 3', 4', 7-tetrahidroxiflavona) (Companó *et al.*, 1995), para determinação do TBT em solução aquosa.

Face aos resultados obtidos e às condições experimentais de que dispúnhamos, seleccionámos o método fluorimétrico referido e passámos a estudar as condições da sua aplicação à análise em urina de rato.

Na primeira fase, começámos por estudar em solução aquosa o comportamento de vários parâmetros que poderiam afectar o método analítico, a saber:

- abertura da janela do fluorímetro;
- pH;
- concentração da solução do fisetine.

Em seguida, estudámos e estabelecemos um método para extracção do TBT, usando diversos solventes e preparando curvas de calibração pela adição de quantidades conhecidas do composto ao fluido biológico em análise.

Após isso, testámos o método na análise de uma amostra de urina de rato contendo TBT em concentração que desconhecíamos e que foi preparada e fornecida pela Técnica Superior que apoiou o desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente, procedeu-se a um estudo “ *in vivo* “ tendo em vista avaliar a probabilidade do método para análise da urina de rato a que havia sido administrado previamente o TBT. Neste trabalho, foi também observado o comportamento dos animais após serem colocados em gaiolas individuais de metabolismo, tendo em vista determinar o volume de água e a quantidade de comida ingeridos e o volume de urina e de fezes produzidos, por poderem, de algum modo, influenciar a quantidade de TBT excretado.

1. INTRODUÇÃO

O elemento estanho representa-se pelo símbolo químico Sn e é conhecido desde épocas pré-históricas.

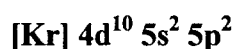
Apresenta três variedades alotrópicas sólidas (*John, 1987*):

O estanho α — também conhecido por estanho cinzento. Os seus átomos estão ligados através de ligações covalentes, como o carbono na rede do diamante, constituindo uma forma não metálica, estável abaixo de 13° C.

O estanho β — também conhecido por estanho branco. É o estanho comum, metálico e cristaliza numa rede tetragonal. Apresenta-se de forma estável de 13 a 161° C

O estanho γ — também chamado estanho rômboico. Acima dos 161° C até 232° C (*que é o seu ponto de fusão*) é estável. Forma uma rede ortorrômboica e é muito quebradiço.

O estanho é um metal pertencente ao bloco p, situando-se no 14° grupo e 5° período da tabela periódica (*TP*), cuja configuração electrónica é a seguinte:



Apresenta os estados de oxidação +2 e +4. Em compostos de estanho, o estado de oxidação +4 é, ligeiramente, mais estável do que o estado de oxidação +2.

O estanho não reage com a água, mas pelo contrário reage facilmente com os ácidos,

libertando hidrogénio.

No estado elementar apresenta uma reduzida toxicidade para os organismos vivos, o que se deve à sua baixa solubilidade no tecido lipídico, dificultando o processo de bioacumulação, pois os efeitos tóxicos de um elemento estão estreitamente dependentes das propriedades físico-químicas com que este se apresenta, podendo as diferenças de solubilidade na água ou nos lípidos, estados de agregação, estruturas químicas e volatilidades contribuir de forma decisiva para incrementar ou não, quer a toxicidade, quer a toxicodinâmica (Nogueira et al., 1999).

O estanho estabelece ligações covalentes com átomos de carbono, formando os chamados compostos organo-estânicos, que fazem parte de um grande grupo de compostos químicos designados por organometálicos.

Podemos dizer que os compostos orgânicos de estanho consistem num átomo central de estanho formando ligações covalentes com um ou mais grupos alquilo, como se mostra na figura 1.1, que se segue (Nogueira et al., 1999).

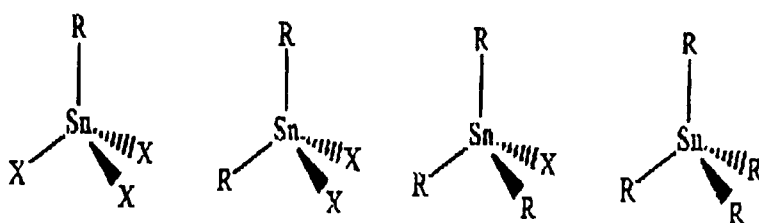


Figura 1.1- Representação das fórmulas estruturais para os compostos orgânicos de estanho. R-radical orgânico; X- radical inorgânico (normalmente halogeneto ou hidróxido) ou radical orgânico polar (acetato) (Nogueira, 1999).

As propriedades físico-químicas do estanho modificam-se quando este se liga a um ou mais grupos orgânicos (Nogueira et al., 1999). Assim, quanto maior for o número de grupos orgânicos ligados ao átomo de estanho, $(R_nSnX_{(4-n)})$, maior é a toxicidade da molécula, atingindo-se os valores mais elevados nos compostos trisubstituídos.

Contudo, se o grupo orgânico (R) for um grupo alquilo, a toxicidade da molécula diminui para cadeias superiores a quatro átomos de carbono (Nogueira et al., 1999).

Os derivados orgânicos de estanho são considerados os compostos organometálicos mais tóxicos presentes no meio natural.

Conhecem-se há mais de três décadas aplicações dos compostos organo-estânicos na agricultura e na indústria (Tong et al., 1995). Na agricultura têm tido aplicações muito importantes como bactericidas, insecticidas, fungicidas e acaricidas; e na indústria como agentes protectores da madeira, nos têxteis, couro, equipamento eléctrico e como estabilizadores para plásticos tipo cloreto de polivinilo (PVC) e outros polímeros, evitando a sua decomposição térmica durante o fabrico e a fotodecomposição a longo prazo.

Dos compostos organo-estânicos, o mais utilizado é o tributilo estanho (TBT), que é usados sobretudo na composição das tintas antivegetativas como agente biocida, uma vez que previnem a fixação de uma grande variedade de organismos marinhos tais como vermes tubulares, lapas e mexilhões aos cascos dos navios e barcos de recreio, evitando, desta forma, um deslize turbulento devido ao atrito nos cascos, que faria aumentar o consumo de combustível e levaria a uma diminuição da velocidade (Clark et al., 1988).

O impacto ambiental dos organo-estânicos, como um grupo de compostos, tem vindo a ser assunto para um grande número de pesquisas. Contudo, uma grande parte destas pesquisas têm sido dirigidas para os efeitos do TBT no meio aquático (Fent et al., 1991), (Dowson et al., 1992).

No início, os primeiros testes laboratoriais conducentes à determinação da toxicidade do TBT, provocada em organismos marinhos, não eram bem conclusivos, pelo facto de não existirem metodologias capazes de analisar correctamente as baixas concentrações

às quais os animais estavam expostos e por outro lado, devido à própria estrutura química do TBT, que possui tanto natureza orgânica como inorgânica, dificultando por isso, a sua quantificação.

Na última década as técnicas analíticas têm vindo a melhorar grandemente, o que permitiu a quantificação de níveis de exposição para algumas espécies de animais marinhos.

A literatura existente mostra que o TBT é muito tóxico para todos os peixes na fase juvenil e para algumas espécies de peixes de água doce, em concentrações da ordem dos 10 microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$) (Quevauviller et al., 1988). É, particularmente, tóxico para moluscos e gastrópodes (Hasan et al., 1992), (Dowson et al., 1992). Nos primeiros, produzindo deformações na concha das ostras (Trachman et al., 1991) e levando a uma diminuição acentuada da população de algumas destas espécies e, nos segundos, à esterilização das fêmeas com o progressivo declínio das respectivas populações para concentrações aquosas de TBT de poucos nanogramas por litro (ng/L) (Dowson et al., 1992).

O interesse científico tem-se centrado no TBT, porque este é introduzido directamente no meio aquático devido, principalmente, à aplicação de tintas antivegetativas nos cascos dos barcos.

O TBT é libertado da tinta antivegetativa através de uma lenta dissolução na água, formando-se uma película em redor do casco, muito rica em elementos tóxicos. Os organismos aquáticos, são mortos ou repelidos quando entram nesta película e, assim, o casco do navio é protegido (Clark et al., 1988), (Quevauviller et al., 1989), (Huggett et al., 1992)

Contudo, o TBT difunde-se, posteriormente, em águas adjacentes, onde plantas e

animais podem ser afectados (*Huggett et al., 1992*).

A quantidade de TBT libertada está relacionada com o tipo de tinta e com a percentagem de TBT usada nessa mesma tinta, tal como a velocidade de navegação da embarcação, uma vez que esta aumenta a turbulência da água e logo a fricção da mesma sobre o casco.

Para além da bioacumulação do TBT a nível dos diferentes órgãos e tecidos da fauna marinha, foram ainda diagnosticados processos de malformação e de diminuição do crescimento e da reprodução das respectivas populações. Os compostos organo-estênicos são precursores de um grupo de compostos designados de *desreguladores endócrinos* ou de *xeno-estrogénios*, que afectam o sistema hormonal sexual de diversas espécies de animais, como por exemplo a redução da produção de esperma para os machos, e a baixa fertilidade para as fêmeas (*Nogueira et al., 1999*).

Os estuários dos rios nacionais são igualmente alvo deste tipo de problemas, como por exemplo o do rio Sado, (*Quevauviller et al., 1989*), e do rio Tejo (*Quevauviller et al., 1993*), devido à localização de grandes infra-estruturas de construção e reparação naval. Recentemente foi detectada a poluição por este tipo de compostos, em albufeiras com forte actividade náutica, particularmente na albufeira da barragem do Castelo de Bode.

Os efeitos ecotoxicológicos do TBT no meio aquático têm vindo a provocar, nos últimos anos, grande preocupação na comunidade científica, o que levou ao aparecimento de alguma legislação para controlo por parte do poder político, do uso deste químico, tendo sido a França, em 1982, o Reino Unido em 1985, os países pioneiros desta legislação (*Huggett et al., 1992*)

Na década de noventa os países da União Europeia baniram o uso de TBT em tintas

antivegetativas (*Huggett et al., 1992*).

Em Portugal, o decreto-lei n.º 54/93 de 26 de Fevereiro estabelece limitações ao uso, fabricação e comercialização de certas substâncias perigosas, onde se incluem os compostos organo-estânicos (*Nogueira et al., 1999*).

Contudo, apesar da preocupação de alguns países para limitarem ao máximo o uso deste tipo de compostos, as tintas antivegetativas à base de TBT continuam a ter uma importância extraordinária na aplicação em navios de grande porte, pelo facto de serem “boas” e de longa duração.

Por exemplo, a Federação Europeia da Indústria Química tem reiterado que a aplicação das tintas antivegetativas à base do TBT poupa à indústria naval mundial 2,5 biliões de dólares e 7,2 milhões de toneladas de combustível todos os anos [10], apesar dos Japoneses reclamarem que as tintas feitas com cobre mostram uma qualidade aceitável de limpeza e possuem uma duração superior a dois anos.

A controvérsia sobre o TBT ainda não acabou, continuam a fazer-se estudos, nos quais os resultados obtidos são suficientemente completos para mostrar que as concentrações na água decresceram significativamente desde que as leis entraram em vigor.

Ainda existe uma informação limitada sobre a toxicidade do TBT e seus derivados em seres humanos (*Huggett et al., 1992*), (*Nogueira et al., 1999*). Contudo, o perigo destes compostos para o Homem começou por se tornar numa preocupação quando em 1954 ocorreu o acidente de “Stalinon” em França. O “Stalinon” era um medicamento oral usado no tratamento de infecções ao nível da pele que causou mais de 2000 casos de intoxicação e 98 mortes, provavelmente motivados pelas impurezas associadas à base de iodeto de trietil-estanho. Por outro lado, detectou-se também a intoxicação de

trabalhadores de indústrias produtoras e manipuladoras deste tipo de compostos (Nogueira et al., 1999).

É conhecida a relativa facilidade com que os trialquil-estanos atravessam as membranas biológicas, indo danificar as membranas do mitocôndrio, tornando-as mais permeáveis, causando assim perturbações no processo respiratório celular. Daí, o papel de surfactante assumido pelos trialquilestanhos no transporte dos aniões cloro e hidróxido através das membranas, inibindo a fosforilação oxidativa do adenosina difosfato (*ADP*) e adenosina trifosfato (*ATP*). Do mesmo modo, a fácil coordenação entre as moléculas dos trialquilestanhos com as dos aminoácidos, cistina e histidina, leva à inibição das proteínas intracelulares (Nogueira et al., 1999).

1.1. COMPORTAMENTO QUÍMICO DO TBT NA ÁGUA

Neste ponto abordaremos essencialmente o comportamento químico do TBT na água, uma vez que tem sido esta a vertente disponibilizada por todos os investigadores e estudiosos da toxicidade dos compostos organo-estânicos.

A compreensão dos efeitos ecotoxicológicos do TBT, no meio aquático, está relacionado com a informação acerca da sua distribuição entre a fase dissolvida e a fase adsorvida em partículas em suspensão no meio.

Na fase líquida, em condições normais, dependendo do pH do meio, o TBT pode aparecer sob diferentes formas, todas elas em equilíbrio umas com as outras (Dowson et al., 1992). Assim, para um valor de pH inferior a 6,5, a espécie predominante é o catião TBT^+ hidratado. Para valores de pH situados entre 6,5 e 8, o TBT apresenta-se sob a forma de complexo neutro, de onde advêm, para os organismos marinhos, os maiores

efeitos de toxicidade. A um valor de pH superior a 8 (limitado pelo valor de pH para a água do mar, em condições normais, de 8,3), podem aparecer diversas formas, tais como o hidróxido, o cloreto, e o carbonato de TBT, entre outras (Nogueira et al., 1999), (Huggett et al., 1992).

Na água, o TBT sofre processos de clivagem e de eliminação. Os primeiros devem-se a processos de degradação química, fotoquímica e bioquímica, dando origem ao aparecimento de dibutilestanho (DBT), monobutilestanho (MBT) e ao estanho elementar (Sn), os segundos devem-se a processos de adsorção à matéria em suspensão, por sedimentação e por ligação a microrganismos (Clarck et al., 1988)

Os compostos organo-estânicos apresentam uma grande capacidade de adsorção, que depende do tipo de partículas suspensas e sedimentos. Na água, os compostos organo-estânicos tendem a ficar retidos em matéria inorgânica, principalmente minérios argilosos (óxidos de ferro hidratados). Esta capacidade de adsorção é considerada um dos mais importantes processos responsáveis pela redução da concentração deste tipo de compostos no meio aquoso, logo, da sua toxicidade.

Embora os mecanismos de degradação do TBT sejam predominantemente de origem biótica, a ligação covalente Sn — C pode ser quebrada, por quatro processos abióticos diferentes:

- Radiação ultravioleta (UV);
- clivagem química;
- radiação gama;
- clivagem térmica.

O papel dos dois últimos processos na degradação do TBT é reduzido, uma vez que a ligação Sn — C é estável até 200 °C, e as radiações gama são raras. Na região dos 300 - 350 nm da radiação UV (mais energética) é suposto dar-se a fotólise directa do TBT, o que só ocorre ao nível dos primeiros centímetros da camada superficial da coluna de água devido à baixa transmitância dos raios UV (*Dowson et al., 1992*), (*Nogueira et al., 1999*). Assim, o TBT retido ao nível dos sedimentos, constitui uma ameaça para a vida aquática, podendo ser apenas repostado em circulação por ressuspensão natural, tempestades, operações de drenagem e por reciclagem das partículas para a água, por parte de organismos específicos (*Real et al., 1994*), (*Nogueira et al., 1999*).

Verificou-se que, no meio aquático, a degradação se faz mais rapidamente do que nos sedimentos, uma vez que o tempo para desaparecimento do TBT na água é na ordem dos 20 dias, enquanto que nos sedimentos é de mais de 16 semanas. Isto é, o tempo de meia-vida para o TBT na água é pequeno, dias ou semanas, dependendo das condições locais e da sua concentração, comparado com o dos sedimentos, que pode ir desde dias até vários anos, dependendo de se tratar de zonas aeróbicas ou anaeróbicas e também da própria concentração do TBT.

Os sedimentos funcionam, assim, como um repositório, com o conseqüente aumento da persistência deste tipo de compostos nos ecossistemas aquáticos, pelo que as percentagens de degradação são substancialmente inferiores às da fase aquosa. Uma vez que os mecanismos de fotodegradação se dão ao nível da fase aquosa, pode afirmar-se que em águas com baixos índices de matéria suspensa prevalece a fotodegradação, enquanto que para valores elevados predominam os mecanismos de biodegradação (*Clark et al., 1988*), (*Sarradin et al., 1995*), (*Nogueira et al., 1999*), sendo este o melhor caminho para a degradação do TBT, quer no meio aquático quer nos sedimentos (*Clark*

et al., 1988), (Nogueira et al., 1999).

Desta forma, pode-se afirmar que, quando os níveis de TBT diminuem significativamente, por exemplo, em virtude da proibição de tintas antivegetativas, verifica-se essa diminuição mais rapidamente na água do que nos sedimentos.

1.2. ESCOLHA DO MÉTODO PARA ANÁLISE

Depois de decidirmos trabalhar em espectrometria de absorção atómica optámos pela câmara de grafite em vez da chama, para as análises neste trabalho, pelo facto de ao consultarmos bibliografia especializada (*Varma, 1995*) e (*Haswell, 1991*), verificarmos não existirem no espectrómetro do Departamento de Química desta Universidade as condições necessárias para a análise de amostras de estanho, tais como: uma chama redutora de óxido nítrico – acetileno.

Salientamos também o facto de haver referências de que os resultados obtidos para a análise do estanho, em espectrometria de absorção atómica, particularmente com chama, são muito débeis (*Farnsworth et al., 1958*), (*Guimont et al., 1976*).

No que respeita aos métodos de espectrometria de chama (*tanto de emissão como de absorção*), o estanho tem sido considerado um dos elementos mais difíceis de analisar, apesar de ter vindo a receber uma atenção considerável, por parte de alguns investigadores (*Guimont et al., 1976*), (*Fytianos et al., 1989*), (*Marr et al., 1982*).

No nosso trabalho, fomos estimulados pelo facto de existir uma informação muito limitada, em especial no que se refere a espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite, sobre a toxicidade dos compostos organo-estânicos, em especial o TBT e seus derivados, em seres humanos (*Marr et al., 1982*).

O trabalho decorreu com a utilização do espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite do ICAM, existente no Laboratório de Solos, localizado na Mitra. No entanto, ocorreram avarias neste equipamento que impediram o decurso normal deste trabalho, tornou-se necessário contactar outras instituições com equipamento similar, para prosseguir o trabalho. Apesar da resposta afirmativa por parte do IPIMAR, de Lisboa, este não teve disponibilidade para ir além de uma análise sumária do TBT em solução aquosa, o que inviabilizou o prosseguimento desta linha de evolução do trabalho.

Assim, fomos levados a enveredar exclusivamente pelo método de espectrofluorimetria no desenvolvimento final do trabalho.

Se nos sentíamos estimulados pela existência de informação muito limitada, com o método anterior, sentimo-nos ainda mais estimulados com o método fluorimétrico, uma vez que a informação sobre o mesmo é ainda mais limitada.

2. PRINCÍPIOS GERAIS DA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

Se fizermos incidir sobre os átomos neutros de um elemento, no estado de vapor atômico, radiação na zona do visível ou ultravioleta com a frequência característica do elemento considerado, então os átomos livres desse elemento são capazes de absorver essa radiação. Como cada átomo tem os seus níveis de energia bem definidos, somente podem ser absorvidos fótons de determinada frequência, o que corresponde a determinados comprimentos de onda (Tyson, 1991), (Marr, 1975)

Na figura 2.1, que se segue, mostra-se a transição entre o nível de energia E e o nível de energia $E + h\nu$.

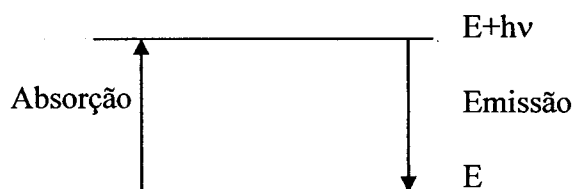


Figura2.1- Representação esquemática do fenómeno de absorção e emissão de radiação.

Esta transição é produzida num átomo como resultado da absorção de energia radiante correspondente à frequência ν .

O regresso do electrão do nível de energia superior para o nível E é acompanhado da

emissão de energia radiante:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu$$

A energia radiante emitida pelos átomos é transmitida em todas as direcções. No entanto, como a radiação da fonte é modulada para uma dada frequência, consegue-se separar a radiação emitida pela fonte da fornecida pela chama (Tyson, 1991).

Pode efectuar-se absorção atómica com ou sem chama, neste caso, com uma câmara de grafite onde um pequeno volume de amostra é injectado, dando-se a sua atomização à custa de uma corrente eléctrica entre dois eléctrodos ligados aos extremos da câmara. Nesta técnica, evita-se a formação de óxidos, porque tudo se passa em atmosfera de gás inerte e as temperaturas são mais elevadas. O gás inerte serve também para evitar a desintegração da câmara de grafite por oxidação do carbono (Welz, 1985).

Quando se introduz uma amostra líquida ou sólida numa câmara de grafite, sobe-se primeiro a temperatura de modo a remover, tanto quanto possível, as substâncias presentes antes que o elemento em estudo seja dissociado termicamente em átomos, o que não acontece na absorção atómica com chama. A introdução directa de volumes fixos da amostra na câmara de grafite faz com que as propriedades físicas, tais como a viscosidade, tensão superficial e densidade, se tornem sem efeito, ao contrário do que acontece na técnica da chama. (Varna, 1984), (Welz, 1985).

Na câmara de grafite a desvantagem duma nebulização insuficiente é evitada porque a amostra é introduzida directamente na câmara, aumentando, por um lado, o tempo de estadia dos átomos no percurso luminoso em relação à chama, para a mesma velocidade de atomização, por outro lado, a sensibilidade da absorção atómica com câmara de

grafite parece ser, para a maioria dos casos, muito melhor que na chama, o que é devido principalmente ao maior tempo de estadia dos átomos no percurso luminoso, à não formação de compostos com os gases da chama e ao facto de se poder usar pequenos volumes de amostra, da ordem dos microlitros, o que se tornou possível fazer, com exactidão, devido ao aparecimento do sistema automático de injeção (*Tyson, 1991*).

De uma maneira geral, podemos dizer que a espectrometria de absorção atómica (EAA) baseia-se na absorção da radiação por átomos ou iões do elemento em análise.

Para muitos metais difíceis de analisar por outros métodos analíticos, o método da absorção atómica exhibe uma boa sensibilidade.

Como cada metal tem um comprimento de onda de absorção característico, usa-se uma fonte (lâmpada) que o contenha, o que reduz as interferências espectrais ou de radiação (*Marr, 1975*).

Deve-se ter sempre em atenção que o método de absorção atómica é relativo, o que implica que as determinações quantitativas só podem fazer-se por comparação com padrões, pelo que pode considerar-se a presença de uma interferência, sempre que se verificarem diferenças entre o comportamento da amostra e das soluções de referência.

2.1. INTERFERÊNCIAS

Nos métodos de absorção atómica, com chama ou forno de grafite, podem existir vários tipos de interferências, os quais se descrevem em seguida bem como as razões do seu aparecimento e as possibilidades da sua eliminação (*Blankley et al., 1991*).

2.1.1. Interferências espectrais

Actualmente, este tipo de interferências, é bastante raro em absorção atômica, devido à modulação do feixe emitido pela lâmpada de cátodo oco e ao facto do amplificador estar sintonizado para aquela modulação de frequência, contudo tais interferências podem surgir (*Delves, 1991*).

Por vezes, as interferências espectrais surgem quando a absorção de uma espécie interferente se sobrepõe ou aparece muito próxima da absorção do elemento a analisar, de tal maneira que a separação por parte do monocromador é impossível.

As interferências espectrais podem também ser produzidas pela presença de produtos resultantes da combustão. Estes possuem bandas de absorção largas, dando origem a uma diminuição da intensidade do feixe transmitido, levando ao aparecimento de erros analíticos (*Welz, 1985*).

Quando a origem dos produtos resultantes da combustão está na mistura combustível-oxidante, pode-se evitar os efeitos por eles produzidos através da medição da absorvância do branco (solução que contém água bidestilada e o mesmo agente químico que se adiciona aos padrões e à amostra) (*Delves, 1991*).

Uma outra probabilidade de interferência espectral é a sobreposição parcial de riscas de absorção (*Blankley et al., 1991*), (*Kirkbright, 1975*)

Se uma determinada risca de absorção coincide com a de ressonância (esta corresponde à passagem do estado fundamental ao estado excitado de mais baixa energia do “átomo neutro”) do elemento em estudo, pode dar-se um efeito semelhante

ao que se mostra na figura 2.2..

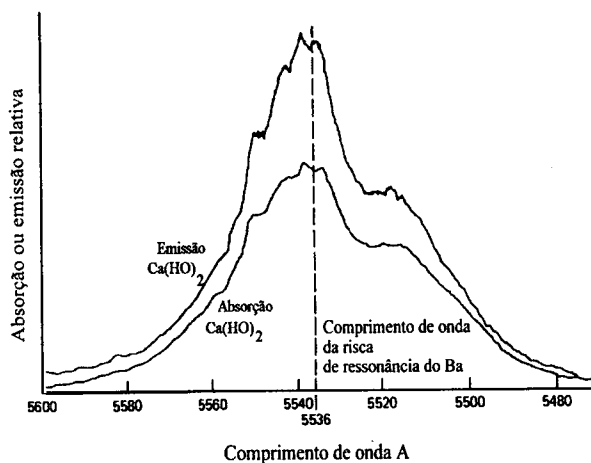


Figura 2.2- Comprimento de onda da risca de ressonância do Ba existente numa mistura de elementos alcalino-terrosos (Skoog, 1995)

Como se pode observar, o comprimento de onda da risca de ressonância do bário, utilizado na análise por absorção atômica do referido elemento numa mistura de elementos alcalino-terrosos, aparece no centro de uma banda de absorção larga que corresponde ao Ca(OH)_2 . Assim, deve ter-se em conta a interferência causada pelo cálcio na análise do bário. Neste caso particular, pode-se eliminar a interferência substituindo o ar oxidante por óxido nítrico que atinge temperaturas mais elevadas, levando, deste modo, à decomposição do Ca(OH)_2 e, conseqüentemente, à eliminação da sua banda de absorção (North, 1991), (Delves; 1991).

Na atomização com chama, as interferências espectrais causadas nos componentes da solução da amostra podem ser evitadas modificando parâmetros analíticos como a temperatura ou a relação combustível-oxidante (Delves, 1991).

Actualmente, as interferências atrás descritas são muito reduzidas na técnica da câmara de grafite, devido aos progressos da tecnologia, à alta qualidade dos novos materiais de grafite e à correcção de fundo de Zeeman.

2.1.1.1. Métodos para a correção das interferências na solução da amostra

Existem diversos métodos para correção das interferências espectrais, que aparecem devido à solução da amostra e que são:

- método de correção com duas bandas;
- método de correção com uma fonte contínua;
- método da correção baseado no efeito de Zeeman;
- método de correção baseado no efeito de Smith-Hieftje.

MÉTODO DE CORREÇÃO COM DUAS BANDAS

Este método requer a existência de uma banda de referência que provenha da fonte e esteja o mais próximo possível da banda de ressonância do elemento a analisar. Contudo, a linha de referência com origem na fonte não deve ser absorvida pela do elemento. Se estas condições estiverem reunidas, e partindo do princípio que qualquer diminuição na intensidade da linha de referência em relação ao que se observou durante a calibração se deve à absorção ou dispersão pelos componentes da solução da amostra, podemos utilizar a referida diminuição de intensidade para corrigir a absorvância da linha do elemento a analisar.

O problema deste método consiste na dificuldade em conseguir uma linha de ressonância adequada (*Blankley et al., 1991*), (*Tyson, 1991*), (*Skoog, 1995*).

MÉTODO DE CORRECÇÃO COM UMA FONTE CONTÍNUA

Na figura 2.3, que se segue, mostra-se os fundamentos deste segundo método.

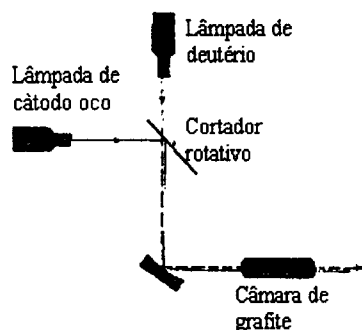


Figura 2.3- Esquema de um sistema com fonte contínua para a correcção de fundo (Skoog, 1995)

Neste caso, utiliza-se uma lâmpada de deutério como fonte de radiação contínua em toda a região do UV. A função do cortador é fazer passar alternadamente para a câmara de grafite, a radiação proveniente da fonte contínua ou da lâmpada de cátodo oco. A largura da fenda é tal que a fracção de radiação proveniente da fonte contínua absorvida pelos átomos da amostra seja desprezada (Skoog, 1995).

Deste modo, consegue-se separar a banda de ressonância do elemento a analisar.

MÉTODO DA CORRECÇÃO BASEADO NO EFEITO DE ZEEMAN

Quando o vapor atómico fica sujeito a um campo magnético dá-se o desdobramento dos níveis energéticos dos átomos, o que conduz à formação de diversas riscas de absorção para cada transição electrónica. Estas riscas diferem umas das outras cerca de 0,01nm, sendo a soma das suas absorvâncias igual à da risca da sua procedência.

A este fenómeno, comum para todos os espectros atómicos, dá-se o nome de efeito de Zeeman (Rossi, 1992).

Na figura 2.4, que se segue, mostra-se um esquema de um aparelho de absorção atômica, com câmara de grafite, no qual se utiliza o efeito de Zeeman para correcção de fundo (Welz, 1985), (Rossi, 1992), (Skoog, 1995).

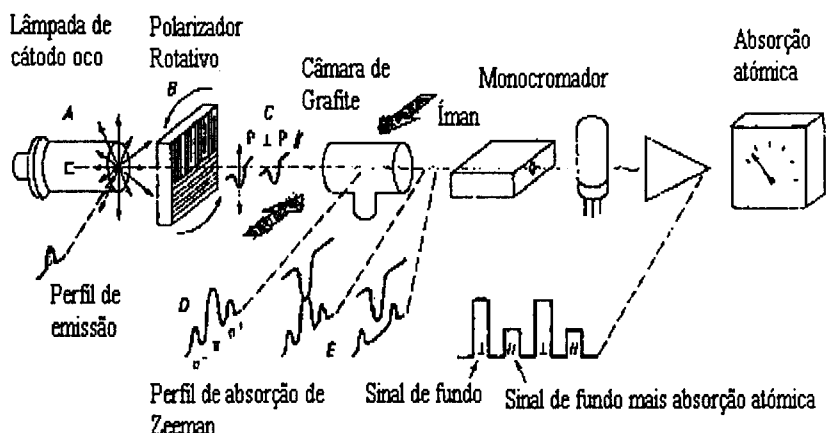


Figura 2.4- Esquema de um aparelho de absorção atômica com câmara de grafite que permite a correcção de fundo baseada no efeito de Zeeman (Skoog, 1995)

Na figura acima indicada, a radiação não polarizada proveniente de uma lâmpada de cátodo oco (A) passa através de um polarizador rotativo (B), no qual o feixe luminoso vai dividir-se em dois feixes polarizados, que vão passar pela câmara de grafite formando um com o outro um ângulo de 90° (C). A câmara de grafite está rodeada por um ímã que desdobra os níveis de energia dando origem aos três picos de absorção que se mostram em (D). O pico central só absorve radiação polarizada no plano do campo. Deste modo, durante a parte do ciclo em que a radiação fornecida está polarizada dá-se a absorção da radiação pelo elemento em estudo. Na outra metade do ciclo o elemento não absorve radiação. Quer numa parte do ciclo quer na outra, dá-se a absorção molecular de banda larga e a dispersão pelos constituintes da solução da amostra, produzindo-se, assim, um modelo de absorvância cíclico, como o que se indica em (E).

O sistema de aquisição de dados está programado para subtrair a absorvância correspondente a cada uma das partes do ciclo (plano perpendicular e plano paralelo),

obtendo-se, assim, um valor corrigido de fundo (Welz, 1985), (Rossi, 1992).

MÉTODO DE CORRECÇÃO BASEADO NO EFEITO DE SMITH-HIEFTJE

Actualmente, comercializa-se uma forma bastante simples de correcção de fundo, que parece oferecer a maioria das vantagens dos aparelhos com efeito de Zeeman. A este método dá-se o nome de Smith-Hieftje. Este baseia-se na auto-inversão ou auto-absorção, que consiste num comportamento da radiação emitida pelas lâmpadas de cátodo oco quando sujeitas a correntes eléctricas de elevada intensidade.

A corrente eléctrica de elevada intensidade dá origem a uma grande concentração de átomos não excitados, capazes de absorver a radiação emitida pelas espécies excitadas. Daqui resulta o aparecimento de uma banda com um mínimo no seu centro, que corresponde ao comprimento de onda do pico de absorção, como se mostra na figura 2.5.

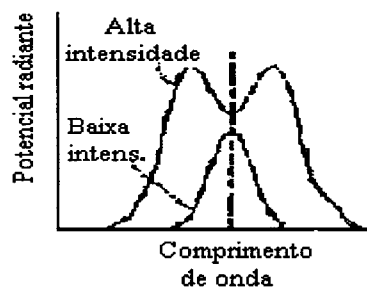


Figura 2.5-Esquema da linha de emissão em lâmpada de cátodo oco (Funcionando com alta e baixa intensidade) (Welz, 1985)

Neste método, as lâmpadas estão programadas para funcionar alternadamente com corrente eléctrica de baixa e alta intensidade, com o objectivo de se obterem absorvâncias corrigidas. O sistema de aquisição de dados subtrai a absorvância de fundo (aparece quando a radiação do pico de absorvância corresponde a um mínimo) da total

(aparece quando se trabalha com corrente eléctrica de baixa intensidade) para se obter um valor corrigido (Welz, 1985), (Blankley et al., 1991).

2.1.2. Interferências Químicas

As interferências químicas são mais comuns que as interferências espectrais. Em muitos casos, os seus efeitos podem ser minimizados desde que se conheçam as condições de trabalho adequadamente.

As interferências químicas são aquelas que surgem das reacções químicas que ocorrem na célula (suporte de amostra). Como a reacção química remove átomos do elemento a analisar, a população atómica na célula e, conseqüentemente, a absorvância, são diminuídas. Reacções químicas interferentes ocorrem, também, muitas vezes na chama, onde o oxigénio está disponível para formar óxidos refractários com o elemento a analisar (Blankley et al., 1991).

Os óxidos refractários são, normalmente, compostos estáveis que contêm oxigénio e não são dissociáveis em átomos à temperatura da chama. (Marshall, 1991)

De uma maneira geral, podemos afirmar, que as interferências químicas ocorrem como resultado da formação de compostos, que são incompletamente volatilizados ou dissociados.

Acredita-se que a maior parte dos efeitos de interferências químicas ocorre durante a formação de partículas sólidas na chama antes da sua evaporação, a que se dá o nome de *interferência na fase condensada*, é o caso por exemplo, da interferência do ião fosfato na determinação do cálcio devido à formação de fosfato de cálcio (Marshall, 1991).

O efeito dos interferentes pode ser estabelecido pela medida de absorção de séries de

amostras contendo diferentes concentrações do interferente. Em alguns casos, o efeito pode ser eliminado alterando-se as condições da chama, por exemplo, aumentando o fluxo do combustível para trabalhar em condições mais redutoras, minimizando, assim, a formação de óxidos.

Em outros casos, uma temperatura de chama mais elevada pode resolver o problema, pois a formação de óxidos refractários pode ser eliminada usando uma chama de temperatura mais elevada ou diminuindo a concentração de oxigênio disponível na chama. A concentração de oxigênio na chama pode ser diminuída tornando a chama mais rica em combustível, isto é, alternando a relação de gases que fluem para a chama para que a quantidade de combustível (reduzidor) seja superior à que pode ser consumida pelo oxidante (oxigênio). O excesso de combustível reage com a maior parte do oxidante disponível e causa um decréscimo na concentração de oxigênio. Substituindo uma chama de ar-acetileno para uma de óxido nitroso-acetileno, podem eliminar-se interferências químicas através do decréscimo da concentração de oxigênio e do aumento da temperatura (entretanto, parece que a química da chama é mais importante que a sua temperatura quando se trata da formação de óxidos refractários, por exemplo óxidos refractários são fracamente vaporizados em H_2 / N_2O e altamente vaporizados em C_2H_2 / N_2O , apesar das temperaturas serem similares) (Marshall, 1991).

Pode-se adicionar à amostra um “agente libertador”, assim chamado porque se combina preferencialmente com a interferente deixando livre o elemento a analisar. Este agente é uma substância química que previne a formação de uma interferência química através de uma reação química com um ou mais dos componentes interferentes para formar um ou mais compostos não refractários. Como o elemento a analisar não pode reagir para formar um composto refractário, pode ser vaporizado. Um exemplo é a

adição de nitrato de estrôncio a soluções de cálcio para prevenir a formação de fosfato de cálcio na chama C_2H_2 / ar.

Há também os “agentes protectores” que formam complexos com o elemento desejado, protegendo-o do interferente, sendo estes complexos facilmente decompostos.

Outra possibilidade é a adição de excesso do interferente na amostra e nos padrões, de maneira a “tamponar” a sua interferência. Entretanto, o efeito líquido do excesso de interferente é o decréscimo na intensidade do sinal.

Muitas vezes é possível compensar as interferências químicas usando a técnica da adição padrão. Quando se usa esta técnica, o analista deve assegurar-se de que a absorvância varia linearmente com a concentração das adições padrão e que a interferência afecta os padrões utilizados da mesma forma que afecta o elemento a analisar na amostra original (*Blankley et al., 19191*).

No método de absorção atômica com câmara de grafite usa-se uma atmosfera inerte, ou redutora, de modo que não são de admitir interferências devido à formação de compostos com gases da chama, óxidos, hidróxidos, etc..

Contudo, na câmara de grafite pode dar-se a sublimação do elemento em estudo em virtude de o gás no interior da câmara estar mais frio do que à sua superfície. Deste modo, a amostra deve permanecer, tanto quanto possível, em contacto com a superfície da câmara para se atomizar quantitativamente.

O tipo de interferência química, na câmara de grafite, mais conhecido é, provavelmente, a formação de carburetos com a superfície da câmara e com produtos de decomposição da amostra, por exemplo com carbono finamente dividido produzido na queima de material biológico. Têm sido apontadas outras interferências na câmara de

grafite, embora não se conheça bem o seu mecanismo. Entre elas está a redução do sinal na presença de um alto conteúdo salino da amostra (*Blankley et al., 1991*).

A influência dos ácidos nas determinações com a câmara de grafite pode ser proveniente da formação de compostos facilmente voláteis do elemento em estudo e, portanto, da sublimação das moléculas, podendo também haver perdas devido à deflagração dos sais a uma temperatura elevada, em especial quando se usa ácido perclórico ou, por vezes, ácido nítrico. (*Skoog, 1995*).

A luz intensa da câmara de grafite, levada a altas temperaturas, pode conduzir a um grande ruído de fundo, ou mesmo à saturação do fotomultiplicador, o que piora a sensibilidade e o limite de detecção para a determinação de um dado elemento. Este tipo de interferência pode ser minimizado fazendo com que a luz directa emitida pela câmara não atinja o detector (*Tyson, 1991*), (*Skoog, 1995*).

2.1.3. Interferências físicas

Várias propriedades físicas da solução afectam o valor da medição da absorvância, em especial a pressão de vapor e a tensão superficial, que afectam o tamanho das gotas. A adição de sais e ácidos pode impedir a evaporação do solvente; gotas maiores resultam numa diminuição da quantidade de aerossol que atinge o queimador, uma vez que se depositam mais facilmente nas paredes da câmara de atomização. Todos os factores que provocam uma diminuição da tensão superficial da solução contribuem para a produção de partículas mais pequenas, o que faz aumentar o caudal de aspiração na chama. Neste contexto, pode adicionar-se uma concentração elevada de um ou vários sais, como o cloreto de lítio, às soluções amostra e padrões para minimizar o efeito dos outros. A viscosidade também influencia a velocidade com que o aerossol atinge a

chama por aspiração. É essencial que a viscosidade dos padrões se aproxime, tanto quanto possível, do valor para a amostra (*Haswel, 1991*).

A diminuição da absorvância na presença de grandes teores salinos pode não ser necessariamente devida a efeitos físicos, isto é, a uma menor velocidade de aspiração, pois pode ser provocada também pela incorporação do elemento do sal impedindo, pelo menos parcialmente, a sua dissociação. Estas interferências físicas e químicas diminuem o número total de átomos formados. A diferença entre estes dois tipos de interferências pode verificar-se a partir do gráfico da absorvância em função da concentração da solução da amostra, pois enquanto as físicas, geralmente, provocam uma diminuição gradual do sinal, as químicas produzem um rápido decréscimo até um determinado ponto correspondente a uma estequiometria e depois a absorvância mantém-se quase praticamente constante (*Tyson, 1991*).

As interferências físicas podem ser eliminadas diluindo a amostra. Também se pode utilizar o método da adição padrão, que é um modo muito prático para resolução destes problemas. O método do padrão interno, se bem que aplicável, necessita de vários requisitos, entre outros, requer um espectrómetro de feixe duplo para evitar que se torne mais moroso.

As interferências físicas não se podem verificar na câmara de grafite em virtude das amostras serem injectadas para a câmara. Contudo, a câmara de grafite não pode conter tomas de mais de cerca de 100 mg de amostra atomizada. Caso contrário, a sua capacidade é excedida perdendo-se sensibilidade.

As substâncias orgânicas, de um modo geral, são capazes de aumentar o valor da absorvância da amostra. Embora não se saiba bem ao certo a razão deste fenómeno, há determinados factores que podem contribuir para a sua explicação. Como há a



considerar influências físicas e químicas actuando simultaneamente, o caso dos solventes orgânicos é tratado separadamente, neste trabalho (Tyson, 1991).

2.1.4. Solventes orgânicos

O uso de solventes orgânicos provoca os mesmos problemas que altas concentrações salinas. No entanto, de um modo geral, provocam um aumento de absorvância, motivo por que o uso de solventes orgânicos é tido como uma vantagem e não como uma interferência. A razão de ser deste facto reside em várias causas susceptíveis de actuar conjuntamente ou não:

- Efeito físico devido ao aumento da tensão superficial, redução da viscosidade, etc..
- Efeito térmico provocado por um menor abaixamento da temperatura da chama, havendo uma maior quantidade de energia térmica disponível para a atomização. Por vezes, pode mesmo observar-se um aumento de temperatura da chama.
- Efeito redutor provocado por alguns compostos orgânicos, impedindo a formação de óxidos (Marr, 1975), (Tyson, 1991).
- Efeito quelante provocado por alguns compostos orgânicos capazes de provocar a quelatação protectora, como foi referido atrás.

Quando o solvente orgânico não forma quelatos com o elemento em estudo, são quase sempre os primeiros dois efeitos que contribuem de um modo mais notável para o aumento do valor da absorvância.

2.1.5. Interferências de ionização

Trata-se de um tipo especial de interferências químicas em que se dá a ionização numa dada percentagem de átomos na chama. Uma chama de oxigénio/gás natural possui energia suficiente para ionizar, por exemplo, os metais alcalinos e alcalino-terrosos. Consequentemente, há uma diminuição no número de átomos neutros disponíveis que podem absorver radiação ao comprimento de onda seleccionado.

Por outro lado, estão sempre presentes átomos estranhos no vapor atómico, quer devido a contaminações quer a substâncias presentes na amostra (*Tyson, 1991*).

A ionização de gases, como o vapor de água e outros produtos de combustão da chama, podem ser ignorados, uma vez que as potências de ionização destes componentes são superiores a 10-12 eV, o que corresponde a um grau de ionização muito baixo. Elementos com potencial de ionização inferior a 5,5 eV são quase completamente ionizados numa chama de óxido nitroso/acetileno, pelo que se deve adicionar cézio ou potássio numa concentração superior a 10 g L⁻¹ para evitar a interferência (*Tyson, 1991*).

Se o potencial de ionização dos elementos em estudo é de 6,5 eV, necessita-se de uma concentração de 1-2 g L⁻¹ de cézio ou potássio para evitar a ionização e se o potencial for superior a 6,5 eV só se necessita de uma concentração menor ou igual a 0,2 g l⁻¹ daqueles catiões, sendo desnecessário usar tampão de radiação quando o potencial de ionização é igual ou superior a 10 eV (*Haswell, 1991*).

O modo de evitar estas interferências é baixar a temperatura da chama. Contudo, deste modo, podem aumentar as interferências químicas. Pode também adicionar-se ao elemento em estudo uma substância que se ionize com maior facilidade, o que faz aumentar a pressão parcial dos electrões, deslocando o equilíbrio para a formação de

átomos neutros. Contudo, pela adição de um elemento mais facilmente ionizável a todos os padrões e à amostra, conseguimos manter aproximadamente constante a pressão parcial dos electrões, o que faz com que a curva de calibração tenda a ser uma recta. Se desejamos fazer o doseamento de um elemento metálico e não sabemos a concentração ou o tipo de interferentes na amostra, podemos adicionar uma quantidade de um elemento facilmente ionizável à amostra e aos padrões. Deste modo, o efeito de qualquer elemento facilmente ionizável que pudesse estar inicialmente na amostra seria minimizado. Esta é a chamada técnica do *tampão de radiação* (Haswell, 1991).

2.2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

A espectroscopia de absorção atómica, tem sido um dos métodos espectrais atómicos mais utilizados devido à sua simplicidade, eficácia e ao seu custo relativamente baixo. Este método apresenta, no que diz respeito à preparação da amostra, alguns problemas, daí esta constituir uma das etapas de grande importância (Marr, 1975), (Tyson, , 1991).

Um dos problemas dos métodos espectroscópicos (absorção e emissão), resulta do facto da amostra ser introduzida dissolvida, geralmente, em água, no atomizador sob a forma de finas gotículas, onde sofre a dessolvatação, vaporização e atomização. A nebulização da solução permite a sua distribuição uniforme através do corpo da chama e a introdução de uma fracção representativa da amostra.

Muitos dos materiais com grande interesse para análise, tais como, amostras de solos, de tecidos animais, de plantas, de derivados do petróleo e de minerais, não são directamente solúveis nos solventes comuns, o que requerem, com frequência, um tratamento prévio, para se obterem dissoluções adequadas para a atomização. Os

processos de decomposição e dissolução da amostra incluem, habitualmente, o tratamento desta com ácidos minerais a quente; a oxidação com ácidos (sulfúrico, nítrico e o perclórico); a combustão numa bomba de oxigénio ou nouro tipo de reservatório fechado (para evitar perdas da amostra); mineralização a altas temperaturas e a fusão a altas temperaturas com reagentes como o óxido bórico, o carbonato de sódio, o peróxido de sódio e o piro-sulfato de potássio (*Welz, 1985*), (*Tyson, 1991*).

Muitas vezes, os métodos utilizados para a decomposição e dissolução da amostra introduzem mais erros (muitas vezes, tão graves, que não se podem corrigir com o branco) que as próprias medições espectroscópicas.

Em condições normais, o erro associado à análise de absorção atómica é da ordem de 1 a 2%. Contudo, quando se tomam as precauções necessárias, este valor pode ser diminuído (*Skoog, 1995*).

2.2.1. Técnicas utilizadas

A absorção atómica é um método relativo que não dá valores absolutos de absorvância, mas sim relativos a um conjunto de padrões de composição conhecida, pelo que as características dos padrões são fundamentais para os métodos de avaliação.

Na preparação dos padrões prepara-se, geralmente, uma “solução mãe” para o elemento a determinar. Mediante diluição, destas são obtidas as soluções padrão com as concentrações desejadas. (*Tyson, 1991*), (*Brankley et al., 1991*).

A técnica mais simples e rápida para a determinação de um elemento por absorção atómica é a da curva de calibração, em que se usam padrões preparados a partir de uma “solução mãe”. A curva de calibração é obtida representando graficamente em função

da sua concentração os valores da absorvância, para um dado número de soluções padrão. Seguidamente traça-se a melhor recta. Uma vez lida a absorvância da amostra, cujo valor deve estar entre os dois padrões, determina-se, por intrapolação, a sua concentração. Muitas vezes temos uma relação linear entre a absorvância e a concentração, isto é, o sistema tem um comportamento que respeita a lei de Beer para valores de baixa concentração.

Para valores de concentração mais elevados, a recta pode encurvar para as abcissas, o que significa que não há obediência à lei de Beer. Se a concentração da amostra estiver englobada numa ordem de grandeza que não siga a lei de Beer, os dados obtidos podem ser usados empiricamente para determinar a concentração da amostra. Não é uma situação ideal, isto porque, não existem garantias de que o desvio à lei de Beer não seja devido a qualquer reacção química cujo efeito se tenha desprezado e que afecte seriamente os resultados (*Marr, 1975*), (*Tyson, 1991*).

Muitas vezes é difícil ou até pouco conveniente, prepararem-se padrões semelhantes à amostra. Assim, pode-se usar o método da adição padrão em vez do método da curva de calibração. Este método, baseia-se numa técnica de comparação muitas vezes utilizada quando não se conhece a composição da amostra a analisar.

Nestes métodos, as leituras de absorvâncias são feitas em várias soluções, todas elas contendo a mesma quantidade de solução da amostra (alíquota) e concentrações diferentes do padrão adicionado. Quando se representa o valor da absorvância (A_b) em função da concentração de padrão adicionado ($C_{p\text{adic}}$), a recta obtida não passa pela origem porque o valor da absorvância para a concentração nula de padrão adicionado corresponde ao da amostra. A partir deste valor determina-se a concentração do elemento em estudo (existente na solução proveniente da alíquota da amostra

adicionada) a partir da abcissa na origem, como se mostra na figura 2.6.

A precisão deste método é tanto maior quanto maior for o número de soluções utilizadas (Banklly, 1991), (Skoog, 1995).

O método da adição padrão elimina o tipo de interferências que fazem com que o coeficiente de proporcionalidade entre a absorvância e a concentração seja diferente para os padrões simples e para a amostra, e que se torne constante pela adição de quantidades idênticas de amostra aos padrões. Assim, interferências físicas como a viscosidade, a tensão superficial, ou a densidade da amostra, podem ser eliminadas através deste método. Porém, não são eliminadas interferências de ionização nem a generalidade das interferências químicas. Também não evita as perdas de radiação de fundo devidas à dispersão da radiação e à absorção nuclear.

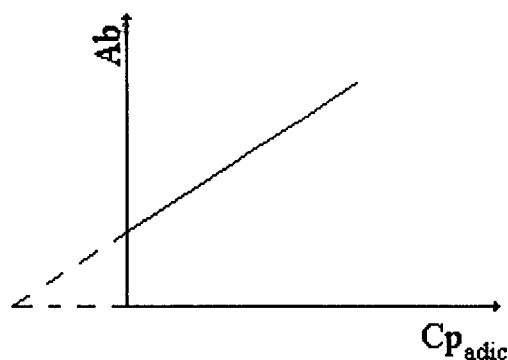


Figura 2.6- Representação gráfica da recta de calibração no método da adição padrão.

Para que o método se possa aplicar é essencial que se verifiquem duas condições:

- Que a recta não passe pela origem quando a concentração do elemento em estudo é nula;
- Que a relação (absorvância/concentração) seja linear para se fazer convenientemente a extrapolação (Tyson, 1991), (Haswell, 1991).

O método é muito útil quando a concentração do elemento em estudo é muito baixa, pois, ao adicionar-se o padrão, eleva-se a concentração, fazendo com que o valor da absorvância lida caia dentro dos limites de maior precisão. No entanto, não convém, adicionar quantidades excessivas do elemento em estudo porque, de contrário, este é determinado a partir de pontos experimentais muito afastados da intersecção da recta com o eixo das abcissas, razão porque um pequeno erro na determinação experimental da recta afecta muito o ponto de intersecção, logo a exactidão, na determinação da concentração, do elemento em estudo (*Delves, 1991*).

Embora não com muita frequência, por vezes usa-se o método do padrão interno. Neste, adiciona-se à amostra e aos padrões um elemento de referência de concentração conhecida. O desvio de absorvância do elemento em estudo para a amostra em relação ao padrão pode ser corrigido representando a razão das absorvâncias da espécie a analisar e da espécie de referência em função da concentração do elemento ou das razões das duas concentrações.

São necessárias duas condições para que este método se possa aplicar:

- Que o elemento de referência não esteja presente na amostra;
- Que o comportamento dos dois elementos (a analisar e de referência) seja idêntico;

Isto significa que ambos os elementos devem estar isentos de interferências químicas ou que as interferências sejam idênticas sob o ponto de vista quantitativo. Na prática, tal facto, raramente se consegue, sendo este um dos pontos em que o método falha. Contudo, com este método, conseguem-se eliminar as interferências físicas da matriz e as provocadas por oscilações do caudal do gás de aspiração em EAA com chama, uma vez que os elementos são aspirados ao mesmo tempo por fazerem parte da mesma

solução (*Tyson, 1991*), (*Skoog, 1995*).

Em EAA com chama, o gás que aspira a solução costuma ser o comburente, pelo que, se o seu caudal variar, as proporções dos óxidos formados podem ser diferentes e os dois elementos (a analisar e o de referência) podem não se comportar de maneira idêntica na chama, embora se escolha o padrão interno de modo a ter propriedades o mais semelhantes possível às da espécie em estudo. Este método é de execução experimental muito trabalhosa (*Bankly, 1991*).

2.3. INSTRUMENTAÇÃO

Em qualquer espectrómetro de absorção atômica podemos distinguir os seguintes sistemas instrumentais:

SISTEMA DE EMISSÃO

Este sistema consiste basicamente numa fonte de radiação que emite o espectro do elemento a analisar; a radiação emitida é dirigida para o meio absorvente formado pelos átomos da amostra (*Marr, 1975*), (*Kirkbright, 1975*).

SISTEMA DE ABSORÇÃO

O principal componente deste sistema é o vapor atômico que vai absorver parte da energia emitida pela fonte. O sistema de absorção compreende ainda todos os sistemas e acessórios que estão envolvidos na produção do vapor atômico, começando pelos meios de introdução da amostra. Na espectrometria de absorção atômica, o sistema de

absorção consiste ou na chama, queimador e nebulizador, ou no forno e câmara de grafite, capilares, tubos ou sistemas de injeção, reguladores e manómetros para controlar a pressão dos gases, chaminé, etc.(*Haswell, 1991*).

SISTEMA DE SELECÇÃO

Este sistema inclui a parte óptica para selecção espectral (filtros, monocromador com prisma ou rede) e acessórios mecânicos, como as fendas (*Haswell, 1991*).

SISTEMA DE DETECÇÃO, MEDIDA E REGISTO

Consiste num fotomultiplicador associado a um amplificador e um aparelho de medida, com um mostrador digitalizado ou analógico, nos equipamentos mais antigos. Nos aparelhos mais recentes pode ligar-se um instrumento de registo ou de aquisição automática de dados, indicando-se os seus componentes (*Haswell, 1991*).

A figura 2.7, que se segue, mostra esquematicamente um espectrómetro de absorção atómica.

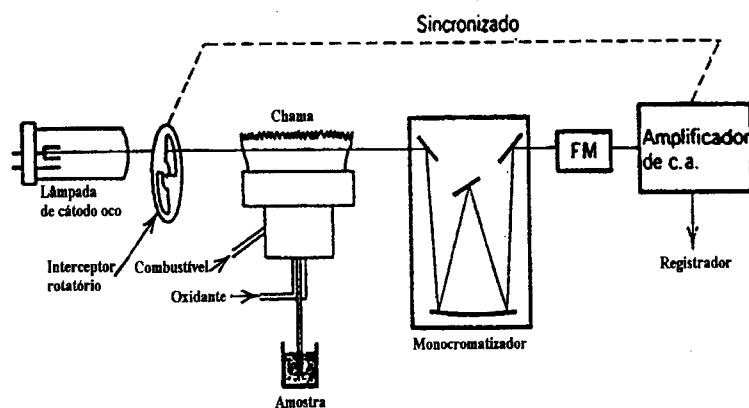


Figura 2.7- Esboço de um espectrómetro de absorção atómica (*Skoog, 1995*)

2.3.1. Fontes de emissão

Como as riscas em absorção atómica são estreitas e as transições são únicas para cada elemento, a absorção atómica é altamente específica. Por outro lado, a lei de Beer só se aplica a radiação monocromática e esta não se consegue na prática. Aquela lei só se pode aplicar se a largura da banda seleccionada for estreita em relação à largura do pico de absorção, para que as absorptividades se mantenham aproximadamente constantes naquela gama. Nenhum monocromador é capaz de seleccionar uma banda tão estreita quanto a necessária para a absorção atómica (*Haswell, 1991*).

Assim, é necessário dispor de uma fonte que emita a risca de ressonância do elemento em estudo com uma largura consideravelmente menor do que a largura da risca de absorção e com intensidade de radiação e estabilidade suficientes para permitir medidas exactas de absorção (*Kirkbright, 1975*), (*Tyson, 1991*).

2.3.1.1. Fontes contínuas

As fontes contínuas são aquelas que emitem bandas largas de radiação, das quais, a radiação de comprimento de onda desejado é seleccionada com um monocromador. Uma lâmpada deste tipo vulgarmente conhecida é a lâmpada de arco de Xénon. Esta lâmpada emite num intervalo de comprimento de onda desde os 200 aos 700 nm e é, muitas vezes, escolhida para usar em espectrometria de absorção atómica devido à alta intensidade da radiação emitida. Contudo, considera-se menos intensa do que uma fonte que emita a linha apropriada (*Kirkbright, 1975*), (*Tyson, 1991*).

A vantagem do uso de uma fonte contínua é o facto de uma única lâmpada poder ser usada em diferentes comprimentos de onda, para a análise de muitos elementos.

A maior desvantagem destas fontes são as relativamente baixas intensidades de emissão nas larguras da banda de absorção dos átomos e a necessidade de usar monocromadores de alta qualidade para limitar a banda de comprimento de onda que é usada no estudo. Mesmo assim, a banda usada é mais larga do que a banda de absorção dos átomos do elemento em estudo. Por esta razão, normalmente preferem-se fontes de emissão de linha (*Tyson, 1991*).

2.3.1.2 . Fontes de emissão de linha

Estas fontes emitem radiação muito intensa só no intervalo de comprimentos de onda que corresponde à banda de absorção de um átomo ou grupo de átomos. Elas não emitem um contínuo de radiação.

A principal vantagem desta fonte é a alta intensidade conseguida numa largura de banda estreita.

A maior desvantagem é a necessidade de mudar de fonte sempre que o elemento a analisar é mudado (*Tyson, 1991*), (*Skoog, 1995*).

2.3.1.2.1. Lâmpadas de descarga sem eléctrodos

Uma lâmpada de descarga sem eléctrodos é preparada colocando uma pequena quantidade de um elemento ou um halogeneto do elemento num tubo de quartzo. Muitas vezes são usados alguns miligramas de iodeto de chumbo. O tubo de quartzo é evacuado sob uma atmosfera de um gás inerte até uma pressão normalmente de 0,1 e 5 torr. Para a maioria destas lâmpadas a pressão óptima está entre os 0,3 e os 3 torr.

Depois da evacuação o tubo é selado e colocado numa cavidade de micro-ondas. As

pressão de vapor dos elementos que são utilizados nestas lâmpadas é suficientemente elevada para permitir a formação de alguns átomos gasosos do elemento no ambiente de baixa pressão da lâmpada.

A aplicação de um campo de micro-ondas (a uma frequência de 2450 MHz) causa excitação de alguns átomos gasosos. Estes átomos excitados, ao transitarem para estados excitados de menor energia ou para o estado fundamental, emitem radiação característica que passa através da janela de quartzo.

Na figura 2.8, que se segue, mostra-se um esboço de uma lâmpada de descarga sem eléctrodos.

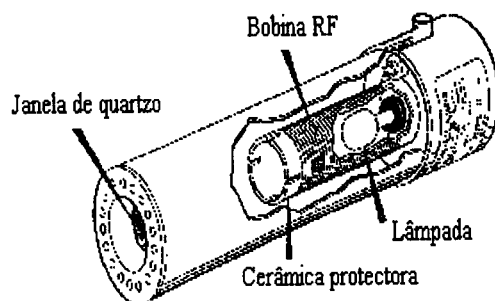


Figura 2.8- Lâmpada de descarga sem eléctrodos (Skoog, 1995)

A maioria destas lâmpadas emitem radiação que é no mínimo 10 vezes mais intensa que a correspondente lâmpada de cátodo oco. Consequentemente, as lâmpadas de descarga sem eléctrodos são mais usadas para medidas de fluorescência do que para medidas de absorção (Marr, 1975), (Kirkbright, 1985), (Tyson, 1991).

2.3.1.2.2. Lâmpadas de cátodo oco

Numa lâmpada de cátodo oco, os componentes activos são o cátodo, constituído

meramente por um fio metálico feito ou revestido pelo elemento em estudo, geralmente na forma de um cilindro fechado numa extremidade com 1 cm de profundidade e 1 cm de diâmetro e um ânodo (Kirkbright, 1985).

A lâmpada é cheia com néon ou argon, gasosos a baixa pressão. Estes gases são utilizados porque não reagem com o metal do cátodo e apresentam espectros de emissão muito simples.

Ao passar a corrente (100 - 200 V; 5 - 100 mA), dá-se uma descarga eléctrica que provoca a ionização do gás nobre; os iões resultantes bombardeiam o cátodo, que emite os átomos do metal. O vapor atómico do metal daí resultante é, por sua vez, excitado por colisões com os iões do gás nobre e emite a sua radiação característica.

A corrente deve ser ajustada pelo analista para estar de acordo com o valor recomendado pelo fabricante (Kirkbright, 1985), (Tyson, 1991).

Na figura (2.9 e 2.10) que se segue mostra-se dois esquemas da lâmpada de cátodo oco.

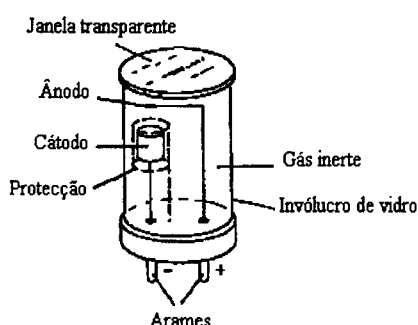


Figura 2.9- Esquema da lâmpada vista de lado (Welz, 1985)

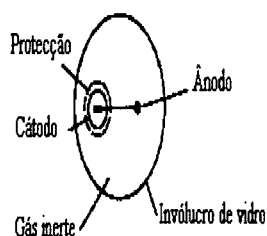


Figura 2.10- Esquema da lâmpada vista de frente (Welz, 1985)

A maior desvantagem do uso das lâmpadas de cátodo oco é a necessidade de usar uma lâmpada diferente para cada elemento a analisar. Esta desvantagem pode ser parcialmente ultrapassada usando cátodos que são feitos usando mais de um elemento.

O cátodo das lâmpadas de cátodo oco de *multi-elementos* ou simplesmente *lâmpadas multi-elementos*, é feito a partir de uma liga ou anéis dos elementos desejados.

As lâmpadas multi-elementos comerciais podem ser usadas para experiências entre 2 a 7 elementos .

A concentração dos componentes menos voláteis no cátodo aumenta com a utilização da lâmpada, devido à conversão em vapor dos elementos mais voláteis. Depois do arrefecimento da lâmpada, após a sua utilização, os elementos não se condensam necessariamente de novo no cátodo pelo que a composição deste muda com o uso. Isto leva a uma variação na razão das intensidades da radiação emitidas dos elementos do cátodo (*Marr, 1975*).

2.3.1.2.3 Lâmpadas de gradiente de temperatura

Estas lâmpadas usam um aquecedor eléctrico para converter um elemento em vapor atómico.

A temperatura destas lâmpadas é cuidadosamente controlada por um circuito eléctrico.

Uma corrente relativamente alta (cerca de 0,5 A) passa através do vapor entre um filamento e um ânodo, provocando a excitação de alguns átomos que, subsequentemente, emitem radiação nos comprimentos de onda característicos do elemento da lâmpada (*Marr, 1975*).

O filamento é revestido com um óxido de bário, cálcio ou estrôncio, com vista a tornar o filamento mais electro-emissivo (*Welz, 1985*).

Este tipo de lâmpada é mostrado na figura 2.11:

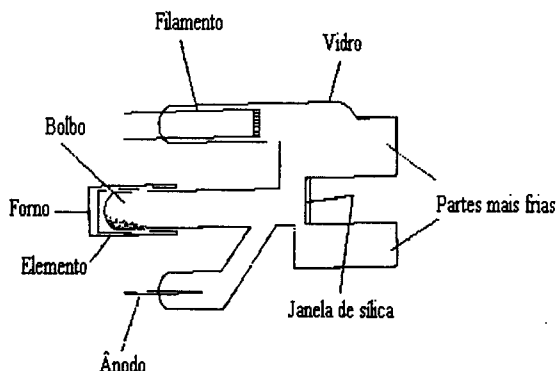


Figura 2.11- Esquema de uma lâmpada de gradiente de temperatura (Skoog, 1995)

O elemento cujo espectro emissivo se deseja é colocado no bolbo da lâmpada. Este é electricamente aquecido para uma temperatura que produz a quantidade desejada de vapor atômico. O corpo da lâmpada é constituído por vidro, mas a janela transparente é construída de sílica. Esta janela é colocada perto da secção quente da lâmpada para evitar a condensação do vapor quente.

A lâmpada contém também uma parte relativamente fria, que serve para proteger a janela e onde o vapor atômico pode condensar-se.

A intensidade da radiação emitida por estas lâmpadas é consideravelmente superior à emitida pelas lâmpadas de cátodo oco.

Estas lâmpadas são utilizadas principalmente em EAA para estudos a comprimentos de onda abaixo dos 200 nm com elementos, como o arsénio e selénio, para os quais as lâmpadas de cátodo oco não são adequadas (Marr, 1975), (Welz, 1985), (Skoog, 1995).

2.3.2. Atomizadores

São componentes de grande importância em absorção atômica. São os dispositivos

de vaporização e atomização da amostra que produzem o vapor atômico.

O sistema mais usado é o do nebulizador-queimador, que introduz a amostra em forma de aerossol na chama do queimador (*Kirkbright, 1975*).

A chama é um meio ideal para converter uma solução em vapor atômico .

2.3.2.1. A chama

A amostra, antes de ser aspirada para a chama, é sugada através de um tubo de pequeno diâmetro para uma corrente de oxidante que flue para a chama. A fluência do oxidante provoca um vácuo parcial no tubo da amostra (princípio de Venturi) que é necessário para sugar a solução da amostra para a corrente de oxidante. Depois da amostra estar nessa corrente é misturada com o combustível e inflamada para formar a chama (*Haswell, 1991*).

A amostra é introduzida na chama sob a forma de aerossol.

As funções da chama são: converter os constituintes da amostra em estado de vapor; atomizar a amostra, ou seja decompor os constituintes em átomos; excitar uma fracção dos átomos resultantes.

A chama deve possuir uma temperatura suficiente para cumprir as funções enumeradas (*Haswell, 1991*).

Tal como foi referido, a amostra é aspirada para a chama sob a forma de pequenas gotas. O solvente na solução da amostra evapora-se rapidamente devido ao calor da chama. As partículas sólidas do soluto que restam da evaporação do solvente fundem para formar um líquido que rapidamente se evapora formando um gás e, por fim, dissociam-se em átomos.

A radiação proveniente da lâmpada passa através da chama e é facilmente absorvida pelos átomos da amostra.

A chama emite um espectro mais ou menos contínuo de radiação, resultante da excitação molecular do combustível, além de poder conter o espectro de riscas devido à excitação dos átomos metálicos da amostra. Embora a fracção dos átomos que sofre excitação térmica seja pequena à temperatura da chama, os poucos que são excitados emitem radiação correspondente às riscas de ressonância de absorção seleccionadas para a análise, pelo que representam uma fonte de interferências, embora a emissão se dê em todos os sentidos (*Haswell, 1991*).

Assim, a intensidade observada I não será $I = I_0 - I_a$, onde I_a é a intensidade da radiação absorvida, mas será $I = I_0 + I_e$, onde I_e é a intensidade da risca emitida pela chama mais a sua emissão de fundo (*Skoog, 1995*).

2.3.2.1.1. Queimadores

Existem dois tipos de queimadores: os de *consumo total* e os de *pré-mistura*.

No queimador de consumo total, o oxidante, o combustível e a amostra passam directamente para a chama, tal como se mostra na figura 2.12.

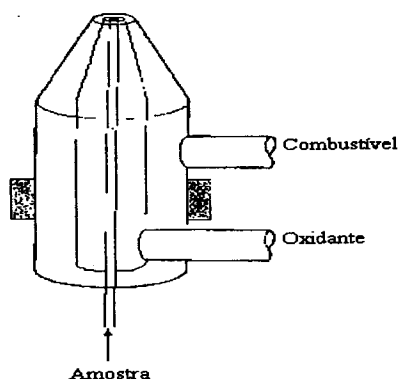


Figura 2.12- Queimador de consumo total

Uma vantagem deste queimador é que os gases para a chama não são misturados antes de serem queimados na chama (*Skoog, 1995*).

Isto previne a possibilidade de explosão e, ao mesmo tempo, torna possível usar seguramente gases que queimam a velocidades elevadas.

Nestes queimadores, uma grande quantidade de amostra passa para a chama, durante o período fixo, o que leva a uma concentração relativamente elevada de amostra na chama.

Uma desvantagem deste queimador é o facto de a chama ser turbulenta, devido à entrada para a chama de gotas de amostra de maior tamanho.

Essas gotas, não sendo completamente vaporizadas na chama, podem dispersar a radiação.

A turbulência na chama aumenta o ruído captado pelo detector e leva a uma leitura instrumental instável. Esta pode ser significativamente diminuída removendo as gotas da amostra de maior tamanho antes da entrada da amostra para a chama (*Haswell, 1991*).

No queimador de consumo total entra mais amostra. No entanto, devido a uma vaporização incompleta, uma menor proporção de amostra é atomizada.

A forma do queimador de consumo total não é a ideal para a EAA porque o comprimento da chama a ser atravessado pela radiação é muito pequeno para obter uma boa sensibilidade.

No queimador de pré-mistura, como se mostra na figura 2.13, a mistura amostra-oxidante flue para dentro da câmara, localizada na direcção ascendente da chama, onde

as gotas maiores são separadas e anuladas da mistura pelos deflectores.

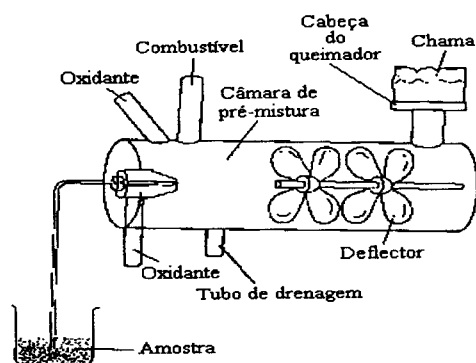


Figura 2.13- Queimador de Pré-Mistura (Skoog, 1995)

A câmara é também usada para misturar o combustível com o oxidante e a amostra. Como a amostra é transportada, através da câmara pela mistura gasosa, excepto as pequenas gotas, toda ela choca com os obstáculos colocados no percurso da fluência e cai para o fundo da câmara. As gotas caídas são canalizadas através de um tubo de drenagem, *dreno*, para um recipiente.

As pequenas gotas são transportadas através da câmara para a cabeça do queimador e para dentro da chama (Marr, 1975), (Skoog, 1995).

Embora entre menor quantidade de amostra para a chama do que num queimador de consumo total, isso não provoca necessariamente um decréscimo significativo da população atômica na chama.

Uma desvantagem deste queimador é o risco de explosão quando o oxidante e o combustível são misturados na câmara de pré-mistura.

Contudo, devido às razões acima expostas, o queimador de pré-mistura é preferido para a maioria das análises quantitativas (Marr, 1975)

2.3.2.2. Câmara de grafite

A técnica de câmara de grafite é vulgarmente designada por *atomização electro-térmica*.

Esta técnica oferece algumas vantagens: alta selectividade, alta sensibilidade, exactidão, rapidez e baixo consumo da amostra durante a análise (Varna, 1984).

Na figura 2.14 mostra-se a secção transversal de um atomizador electro-térmico comercial ou de uma câmara de grafite.

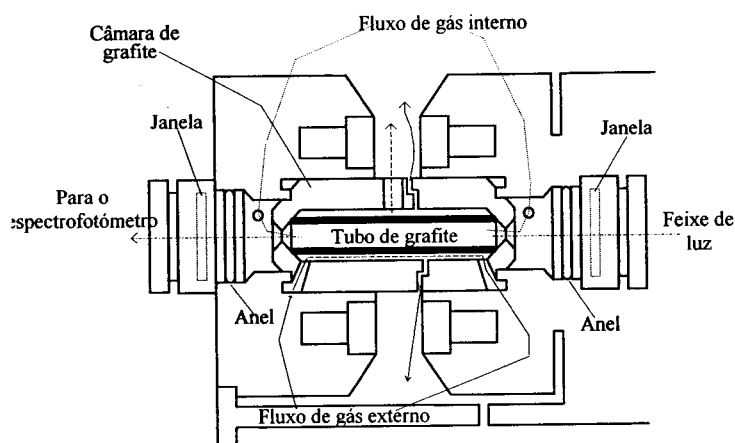


Figura 2.14- Secção transversal de uma câmara de grafite (Welz, 1985)

Em contraste com a EAA de chama, as absorções de sinais com câmara de grafite são função da quantidade total do elemento a analisar presente no tubo de grafite e não da concentração da solução em estudo.

Nesta técnica, há um vapor atómico transitório na trajectória óptica. Muitas vezes o vapor permanece na trajectória óptica por períodos superiores a dois segundos e esta permanência comparativamente longa é a base para o aumento dos limites de detecção, em relação às técnicas de chama (Welz, 1985).

Na produção da absorção em câmara de grafite existem, tipicamente, quatro etapas: *secagem, calcinação, atomização e limpeza da câmara de grafite.*

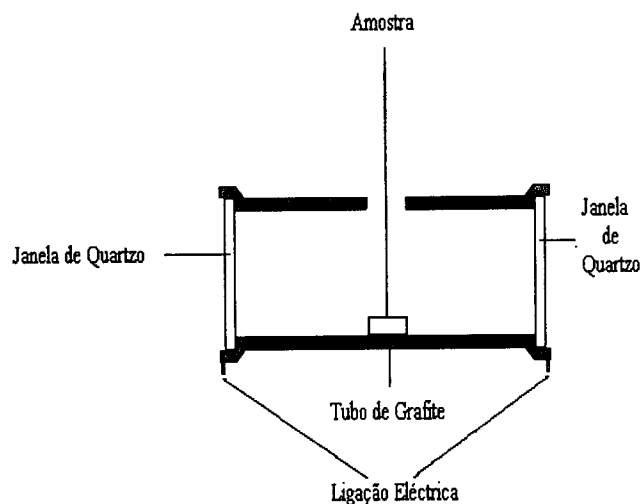


Figura 2.15- Esquema de uma câmara de grafite

A etapa de secagem serve para volatilizar o solvente da amostra. No fim desta etapa resulta a produção de um precipitado seco composto de catiões, aniões e materiais orgânicos que se encontram em solução (Welz, 1985).

Modelos mais recentes de programação de temperaturas para a instrumentação da câmara de grafite oferecem tempos variáveis, em comparação com a taxa de condições de subsequente calcinação.

Na figura 2.15, esquematizou-se uma câmara de grafite.

A calcinação serve para remover resíduos voláteis da matriz na maior quantidade possível antes da atomização (Welz, 1985).

É desejável usar uma temperatura de calcinação suficientemente alta para volatilizar o mais completamente possível qualquer material da amostra que produza interferências, mas suficientemente baixa para assegurar que não haja perdas do

elemento a analisar, antes de se dar a atomização.

O uso de temperaturas de calcinação acima do ponto de fusão, resulta num aumento da volatilização do elemento a analisar, antes da atomização, levando às reduções das medidas de absorvância e a resultados incorrectos.

A etapa de atomização é o acontecimento analítico mais importante.

O resíduo que sobra da calcinação é aquecido a uma temperatura suficientemente alta para volatilizar o elemento, criando o vapor atómico do qual vai ser medida a absorvância (*Brankley et al., 1991*).

Uma vez estabelecida a temperatura óptima de atomização fica assegurado o uso de uma temperatura suficientemente alta para volatilizar todo o elemento, fornecendo deste modo, os limites mínimos de detecção.

A limpeza da câmara de grafite a uma temperatura superior à de atomização, durante cerca de 5 segundos depois da atomização, garante a remoção de qualquer resto do elemento e o sistema fica assim preparado para a medição seguinte.

Uma desvantagem da câmara de grafite é que depois de utilizada para analisar um elemento, muito dificilmente poderá ser utilizada para analisar um outro (*Brankley et al., 1991*).

2.3.3. MONOCROMADORES

Um monocromador é um instrumento óptico destinado à obtenção de um espectro contínuo, constituído por uma caixa negra, como se mostra na figura 2.16, que se segue, que inclui os seguintes elementos ópticos: duas fendas, uma de entrada (1) e outra de saída (5) da radiação; dois espelhos, um colimador (2) que produz um feixe de

radiação paralelo e outro de focagem (4) que encaminha a radiação para a fenda de saída; e uma rede de difracção por reflexão (3) que consiste numa superfície metálica reflectora na qual existem uma série de sulcos paralelos e igualmente distanciados.

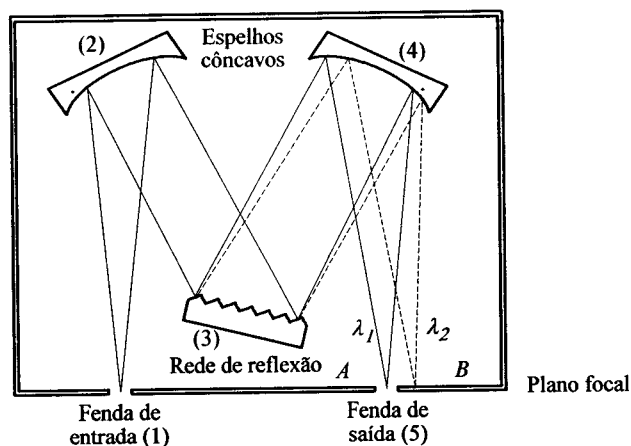


Figura 2.16- Monocromador de rede de difracção (Skoog, 1995)

Quando uma rede é iluminada pela radiação vinda de uma fenda, cada sulco actua como uma nova fonte de radiação dando-se a interferência entre os feixes de radiação dispersada. Esta interferência só é construtiva, isto é, as ondas electromagnéticas de um dado comprimento de onda só conduzem a uma onda resultante de amplitude máxima quando a diferença do percurso óptico é igual a um número inteiro de comprimento de onda, ou seja, há interferência construtiva quando:

$$n \cdot \lambda = d \cdot (\text{sen } i - \text{sen } \theta)$$

Onde n representa o número de ordem inteiro, λ o comprimento de onda, d a distância entre os sulcos, $\text{sen } i$ o seno do ângulo definido pela radiação incidente na rede e a normal à base da rede de difracção e o $\text{sen } \theta$ o seno do ângulo definido pela radiação que irá ser focada na fenda de saída e a normal à base da rede (Marr, 1975).

Na figura 2.17 esquematiza-se uma rede de difracção:

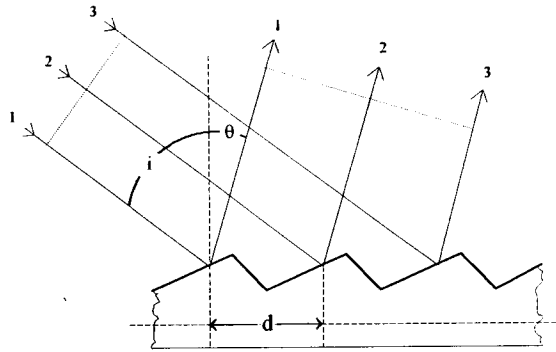


Figura 2.17- Esquema do mecanismo de uma rede de difracção (Skoog, 1995)

Assim, se a radiação dispersada é focada num plano, obtém-se um espectro com uma série de imagens da fenda de saída.

Para uma dada direcção θ , nota-se a risca de interferência de primeira ordem, a risca de segunda ordem, com metade do comprimento de onda, aparecendo também a de terceira ordem para o comprimento de onda de um terço.

Geralmente, as riscas de interferência de primeira ordem são as mais intensas, sendo possível eliminar as outras por intermédio de filtros (Marr, 1975).

O vidro, por exemplo, que absorve radiação abaixo dos 350 nm elimina as riscas de interferência de ordem superior a um, para a maior parte da zona do visível (Skoog, 1995).

2.3.4. Detectores e amplificadores

Um detector para espectrometria deve possuir as seguintes características:

- Elevada sensibilidade;
- Responder numa larga gama de comprimentos de onda;

- Produzir um sinal eléctrico que possa ser facilmente amplificado;
- Ter pequeno ruído de fundo.

Para a detecção da intensidade da radiação na zona do UV/Vis são utilizados vários instrumentos designados por *detectores* e o utilizado em EAA é um *fotomultiplicador*.

Um fotomultiplicador consiste numa caixa circular onde se fez o vácuo, com uma janela de entrada e no seu interior possui um cátodo, um ânodo e, entre eles, eléctrodos adicionais, geralmente 9.

O cátodo tem a forma de uma folha de metal e é suficientemente grande para interceptar todo o feixe de radiação que passou através da janela, está revestido por um segundo metal que emite electrões quando iluminado, sendo a natureza destes que determina a gama de comprimento de onda para a qual se pode usar o detector. Quando se aplica uma diferença de potencial entre os eléctrodos, os electrões emitidos pelo cátodo iluminado são atraídos pelo primeiro eléctrodo adicional mantido a um potencial mais positivo (*Kirkbright, 1975*).

Este, por sua vez, emite um maior número de electrões que são atraídos para a superfície de um segundo eléctrodo adicional e, assim sucessivamente, até atingir o ânodo, constituído por um filamento metálico.

A diferença de potencial entre o cátodo e o primeiro eléctrodo adicional, entre os sucessivos eléctrodos adicionais e entre o último eléctrodo adicional e o ânodo é sucessivamente de +90 V.

A fotocorrente obtida no ânodo pode ser mais intensa, 10^6 a 10^7 vezes, que a corrente obtida entre o cátodo e o primeiro eléctrodo adicional.

A expressão matemática que nos dá a corrente gerada no interior de um

fotomultiplicador por cada fóton que atinge o cátodo é:

$$n^d$$

em que n é o número de electrões destacados pela superfície do 1º eléctrodo adicional, por cada electrão que o atinge e, d é o número de eléctrodos adicionais (Skoog, 1995).

Assim, os fotomultiplicadores são, geralmente, usados mesmo em espectrómetros vulgares, pela maior sensibilidade possibilitando utilizar, muitas vezes, fendas bastante mais estreitas do que poderiam empregar-se com outro tipo de detector fotoeléctrico.

Na figura 2.18 mostra-se a secção transversal de um tubo fotomultiplicador:

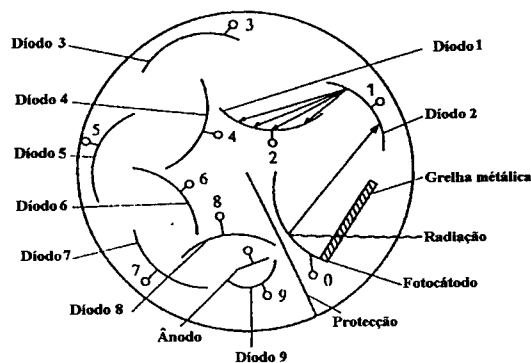


Figura 2.18- Secção transversal de um tubo fotomultiplicador (Welz, 1985)

Contudo, é necessário ter certos cuidados com os fotomultiplicadores porque podem-se danificar quando sobre eles incide energia radiante muito intensa (como a da luz da sala onde o aparelho está instalado) (Kirkbright, 1975).

2.4.PROCEDIMENTO A SEGUIR AO UTILIZAR UM ESPECTRÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÓMICA.

As instruções gerais para a instalação dos aparelhos de EAA (espectrometria de absorção atômica) são, geralmente, fornecidas pelos seus fabricantes.

Estas instruções incluem conselhos no posicionamento dos aparelhos no laboratório para evitar correntes de ar ou a luz solar, e a provisão de uma chaminé exaustora a fim de remover os gases queimados que, frequentemente, contêm materiais tóxicos dos ensaios feitos na chama.

Em EAA são seguidas as seguintes operações como procedimento experimental:

- 1- A fonte e o detector são ligados de acordo com os valores recomendadas. Com as lâmpadas de cátodo oco modernas e os sistemas de amplificação do fotomultiplicador é requerido muito pouco tempo para aquecimento.
- 2- A linha analítica e a largura da abertura espectral a ser utilizada, são seleccionadas pelo monocromador.
- 3- Acende-se a chama e a razão da proporção do fluxo do oxidante-combustível é ajustada de acordo com as regras recomendadas.

A posição do raio de luz que incide na chama é otimizada pela variação da altura do bico do queimador no raio de luz. As informações respeitantes aos procedimentos correctos de acender e apagar a chama são fornecidas no manual de instruções juntamente com o aparelho.

- 4- A sensibilidade do aparelho é ajustada de modo obter-se uma leitura de transmissão a 100% (0% de absorção) no medidor. A colocação da transmissão zero (0) é verificada obstruindo o trajecto entre a fonte e o detector.

5- Nebuliza-se o solvente puro na chama e, verifica-se de novo o 100% e o 0% de transmissão. O aparelho está, então, pronto para medir.

6- Nebuliza-se a solução a analisar, na chama, e anota-se a leitura. A solução deve ser aspirada durante o tempo suficiente, para produzir na chama um número de átomos suficientes para a análise.

7- A tubagem do nebulizador e do queimador são lavadas entre cada análise, através da aspiração do solvente puro.

8- Quando as análises terminarem, apaga-se a chama desligando em primeiro lugar o combustível e só depois o oxidante.

9- Desliga-se o aparelho.

10- Retira-se a lâmpada.

A concentração ideal para a determinação de um elemento através da espectrometria de absorção atômica é decidida através da sensibilidade obtida nas condições de trabalho. Por isso, é necessário preparar amostra de soluções nas quais se mantém a concentração do elemento a analisar.

3. PRINCÍPIOS GERAIS DA ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação electromagnética e reemitir ao mesmo ou a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se luminiscentes.

A fluorescência é uma forma de luminiscência.

A fluorescência tem lugar em sistemas químicos gasosos, líquidos e sólidos e tanto podem ser sistemas simples como complexos.

A intensidade da radiação fluorescente permite determinar quantitativamente vestígios de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção muito baixos, geralmente da ordem dos $\mu\text{g/L}$ (Skoog, 1995).

Se fizermos incidir sobre as moléculas de uma solução energia radiante, estas são excitadas para um estado electrónico superior. Contudo, perdem o excesso de energia absorvida por relaxação vibracional, conversão interna ou emissão de radiação electromagnética e regressam ao estado electrónico fundamental. A fluorescência é observada quando ocorre a emissão imediata, total ou parcial, dessa energia absorvida (*tempo da ordem dos 10^{-8} segundos*), por uma molécula.

A fluorescência ocorre quando o electrão excitado regressa ao estado fundamental com emissão simultânea de radiação electromagnética, sem alterar o seu estado de spin.

Enquanto se encontra no seu estado excitado o electrão pode inverter o seu estado de spin (*Skoog, 1995*).

Podemos agrupar os estados electrónicos da maior parte das moléculas orgânicas em dois tipos principais:

- estado singlete;
- estado triplete.

ESTADO SINGLETE

Todos os electrões da molécula têm os spins electrónicos emparelhados.

O valor total de spin na molécula é de zero (*Atkins, 1982*).

ESTADO TRIPLETE

Nem todos os electrões da molécula têm os spins electrónicos emparelhados.

A molécula possui um electrão desemparelhado no estado excitado cujo valor do spin é idêntico ao do outro electrão desemparelhado da mesma molécula. O valor total de spin na molécula é de um (*Atkins, 1982*).

Estes estados podem representar-se como se segue, na figura 3.1.

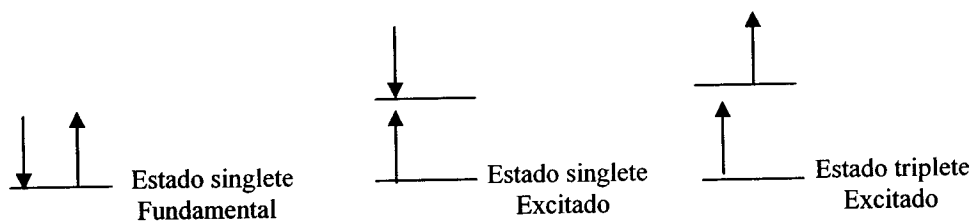


Fig 3.1- Esquema dos estados, singlete fundamental e excitado e triplete excitado.

De acordo com a regra de Hund, a energia de uma molécula que possui dois electrões com estados de spin idênticos é inferior ao de uma molécula com electrões nos mesmos orbitais moleculares mas com estados de spin opostos. Daqui resulta que uma molécula num estado triplete possui um valor de energia potencial inferior ao de uma molécula num estado de singlete. Consequentemente, os níveis de energia vibracional do primeiro estado triplete, são aproximadamente idênticos, ao nível de energia vibracional mais baixo do primeiro estado singlete excitado, o que torna possível a transição electrónica do estado singlete excitado para o estado triplete excitado (*Atkins, 1982*).

Na figura 3.2 representa-se, parcialmente, o diagrama esquemático dos níveis de energéticos de uma molécula .

A linha horizontal em baixo (*a grosso*) representa a energia do estado fundamental da molécula, a qual é, normalmente, um estado singlete e representa-se por S_0 .

As linhas em cima (*a grosso*) representam os níveis de energia vibracionais dos três estados electrónicos excitados (*Atkins, 1982*).

As duas linhas da esquerda, representam os estados electrónicos singlete, o primeiro

S_1 e o segundo S_2 . A da direita (T_1) representa a energia do primeiro estado electrónico triplete (Atkins, 1982).

A energia do primeiro estado excitado, triplete, é menor que a energia, do correspondente, estado singlete.

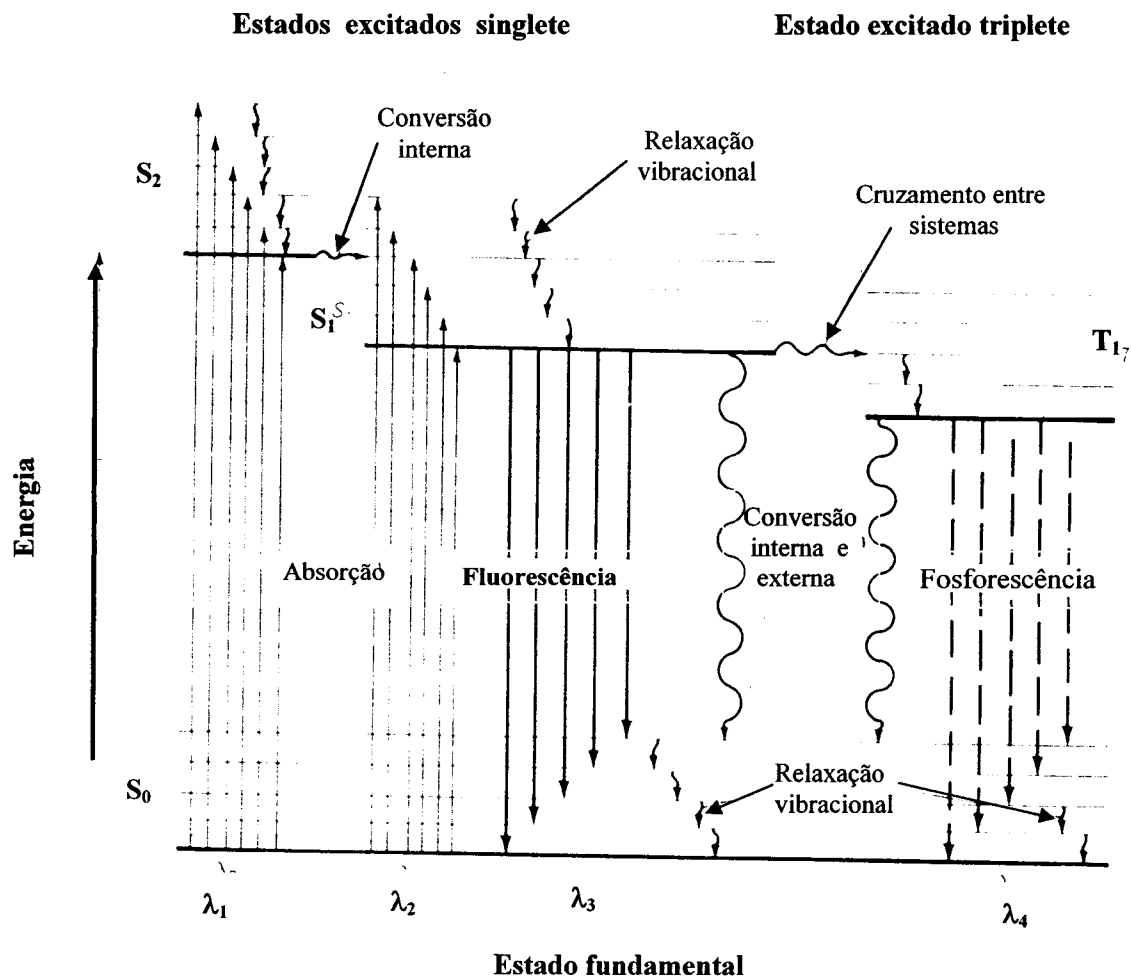


Figura 3.2-Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente (Skoog, 1995).

A excitação molecular, tal como se verifica na figura 6.2, pode ter lugar por absorção de duas faixas energéticas, uma de comprimento de onda λ_1 ($S_0 \rightarrow S_1$) e outra de comprimento de onda λ_2 ($S_1 \rightarrow S_2$). O processo de excitação pode levar a molécula a

qualquer dos diversos estados excitados, vibracionais, contudo na figura não se mostra a transição directa para um estado tripleto, uma vez que a probabilidade de acontecer é muito pequena (*Atkins, 1982*).

A velocidade de absorção de um fóton de energia pela molécula é muito grande, por outro lado, a emissão fluorescente dá-se a uma velocidade mais pequena.

Existe uma relação inversa entre o tempo de vida do estado excitado e a absorvidade molar, correspondente ao processo de excitação. Deste modo, os tempos de vida típicos dos estados excitados (*de 10^{-7} a 10^{-9} segundos*) têm absorvidades molares de 10^3 a 10^5 , e para sistemas absorventes onde a probabilidade de transição é baixa os tempos de vida são de 10^{-6} a 10^{-5} segundos, razão pela qual, qualquer processo de desactivação que se dê num intervalo de tempo mais curto reduz a intensidade de fluorescência (*Skoog, 1995*).

Tal como afirmamos anteriormente, durante o mecanismo de excitação electrónico, uma molécula pode passar para diferentes níveis vibracionais, mas em solução, devido às colisões das moléculas excitadas com as do solvente, o excesso de energia vibracional é perdido dando-se uma transferência de energia com um aumento mínimo de temperatura (processo de *relaxação*) (*Skoog, 1995*).

Deste modo, o tempo de vida médio de uma molécula excitada, sob o ponto de vista vibracional, é somente de 10^{-13} a 10^{-10} segundos, o que é muito menor do que o tempo de vida dum estado excitado electronicamente. Assim a fluorescência numa substância em solução só envolve o estado vibracional da mais baixa energia do estado excitado. Produzem-se no entanto picos próximos se o electrão pode regressar a qualquer dos níveis vibracionais do estado fundamental.

Como se mostra na figura 6.2, com as setas verticais, uma molécula excitada pode

regressar ao seu estado fundamental por combinação de várias etapas. Duas destas etapas, fluorescência e fosforescência, implicam a emissão de um fóton de energia. As outras etapas de desactivação, indicadas por setas onduladas, são processos que não envolvem emissão de radiação (*conversão interna ou externa, relaxação vibracional ou cruzamento entre sistemas*). O caminho mais provável a seguir até ao estado fundamental é aquele que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, observa-se a desactivação por fluorescência, quando esta é rápida em comparação com os outros processos que não envolvem emissão de radiação. Por outro lado se algum destes processos têm uma constante de velocidade favorável, a fluorescência não tem lugar ou é pouco intensa (*Skoog, 1995*).

O método fluorimétrico está relacionado com a espectrometria de absorção molecular. A quantidade de radiação electromagnética emitida durante a emissão de fluorescência depende da quantidade de radiação absorvida.

Quando uma molécula excitada volta ao seu estado fundamental com perda de energia por irradiação, o número de fótons da radiação emitida é normalmente inferior ao número de fótons da radiação absorvida.

A potência da radiação fluorescente (F), proporcional à potência do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, é dada pela expressão :

$$F = K' (P_0 - P) \quad (1)$$

onde (P_0) é a potência da radiação de excitação incidente e (P) a potência da radiação transmitida. A constante (K') depende do coeficiente de eficiência quântico (ϕ) (*quociente*

entre o número de fótons luminescentes e a quantidade de fótons absorvidos), que é constante para uma determinada substância a analisar numa determinada célula e com um determinado aparelho, do processo de fluorescência (Skoog, 1995).

Com o objectivo de relacionar (F) com a concentração (c) da partícula fluorescente, podemos escrever a lei de Lambert – Beer da seguinte forma :

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-abc} \quad (2)$$

onde :

$$A \text{ (absorvência)} = abc = - \log \frac{P}{P_0} \quad (3)$$

Substituindo a expressão (1) na expressão (2) obtém-se :

$$F = K' P_0 (1 - e^{-2,303 abc}) \quad (4)$$

Em que o termo exponencial pode ser desenvolvido em série de Taylor recorrendo à expressão :

$$e^x = 1 - 1 + 2,303 abc - \frac{x^2}{2!} \quad (5)$$

Ao substituírmos na equação (4) o termo exponencial pelo desenvolvimento em série obtém-se a expressão :

$$F = K' P_0 \left[1 - 1 + 2,303 abc - \frac{(2,303 abc)^2}{2} + \frac{(2,303 abc)^3}{6} + \dots \right] =$$

(6)

$$= K' P_0 \left[2,303 abc - \frac{(2,303 abc)^2}{2} + \frac{(2,303 abc)^3}{6} + \dots \right]$$

Se tivermos em conta que a absorvência (A) tem um valor baixo para soluções diluídas, por exemplo $A = 0,05$, o segundo termo da série da expressão (6) corresponderá a 2,5% do valor do primeiro termo e os seguintes apresentarão valores menores (Skoog, 1995).

Para valores da absorvência da amostra inferiores a 0,05, mantendo baixa a concentração da mesma, todos os termos da série, com excepção do primeiro podem ser desprezados e a equação (6) simplifica-se para a seguinte forma :

$$F = K' P_0 2,303 abc \quad (7)$$

Daqui podemos concluir que a potência da radiação fluorescente (F) é proporcional à potência da radiação de excitação incidente (P_0) e à concentração da substância a analisar (c). Chega-se à expressão:

$$F = K' P_0 c \quad (8)$$

3.1. INTERFERÊNCIAS

A análise por fluorescência é muitas vezes, utilizada para dosear amostras cujas concentrações estão compreendidas num intervalo que varia entre 10^{-5} e 10^{-8} M (*molaridade*). Para valores de concentração tão baixos, é necessário tomar precauções que minimizem as interferências no ensaio. A radiação difundida ou a presença de compostos luminescentes, como impurezas podem interferir com o ensaio.

A contaminação pode ocorrer por contacto com o material de laboratório em que exista por exemplo vestígios de detergentes que emitam fluorescência. A adsorção dos compostos luminescentes às paredes dos balões ou dos frascos contentores poderá também constituir outro factor de interferências. Por esse motivo, as soluções padrão deverão ser preparadas diariamente, de novo, a partir de soluções concentradas (*Ewing, 1987*) (*Skoog, 1995*).

3.2. VARIÁVEIS QUE AFECTAM A FLUORESCÊNCIA

As variáveis que podem interferir nas transições electrónicas de uma molécula afectam a emissão de luminiscência. Esta é manifestamente favorecida quando ocorre uma absorção de radiação electromagnética eficiente (*compostos com uma absorvidade elevada*) (*Ewing, 1987*).

A fluorescência é também favorecida quando existe uma grande diferença entre os níveis de energia do estado singlete excitado da molécula e os seus níveis de energia do estado triplete

Quando a diferença entre os níveis de energia do primeiro estado singelo excitado e do estado fundamental são suficientemente elevados para evitar uma relaxação

apreciável para o estado fundamental, podemos dizer que a fluorescência se verifica .

3.2.1. Rigidez estrutural

Os compostos com maior probabilidade para emitir fluorescência possuem geralmente moléculas com estruturas rígidas, talvez porque quando tal não acontece há um aumento de velocidade do mecanismo de conversão interna..

Qualquer substituinte que provoque o aumento do estado rotacional e vibracional da molécula pode levar a uma redução da fluorescência devido a efeitos específicos dos constituintes de uma solução, ou seja, dão-se frequentemente interações e transferência de energia entre as moléculas excitadas e as do solvente, ou outros solutos, por colisões.

Os compostos orgânicos que possuam, somente, ligações simples entre átomos de carbono não apresentam luminiscência porque, apesar de possuírem uma estrutura planar rígida, não possuem condições para que ocorram transições electrónicas adequadas (*Ewing, 1987*), (*Skoog, 1995*).

As ligações σ entre os átomos de carbono dos anéis, são responsáveis pela estrutura planar rígida e as ligações conjugadas providenciam a deslocalização electrónica necessária para que se observe a luminiscência (*Gonçalves, 1983*).

3.2.2. Heteroátomos e grupos substituintes

A presença de heteroátomos substituintes em compostos que emitem fluorescência favorecem, em geral, a probabilidade de ocorrência de transições electrónicas do estado excitado singlete para o estado fundamental, promovendo, por este motivo, a emissão de

radiação por fluorescência (Skoog, 1995).

Quando os heteroátomos substituintes se encontram localizados em posição *orto* ou *para*, doam electrões ao anel aumentando por isso, a probabilidade de emissão de fluorescência. Pelo contrário, os heteroátomos localizados em posição *meta* retiram electrões ao anel, diminuindo por esse motivo, a probabilidade da emissão de fluorescência.

Na tabela que se segue, apresentam-se os efeitos de alguns substituintes mais comuns na emissão de fluorescência:

<i>Substituinte</i>	<i>Efeito no λ</i>	<i>Efeito na fluorescência</i>
<i>Alquilo</i>	<i>Nenhum</i>	<i>Tendência para decréscimo</i>
<i>COOH, CHO, COOR, CRO</i>	<i>Aumento</i>	<i>Decréscimo</i>
<i>HO</i>	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>
<i>CN</i>	<i>Nenhum</i>	<i>Aumento</i>
<i>NH₂, NHR, NR₂</i>	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>
<i>NO₂, NO</i>	<i>Grand. aumento</i>	<i>Grande decréscimo</i>
<i>SH</i>	<i>Aumento</i>	<i>Decréscimo</i>
<i>SO₃H</i>	<i>Nenhum</i>	<i>Nenhum</i>
<i>F, Cl, Br, I</i>	<i>Aumento</i>	<i>Decréscimo</i>

Tabela3.1. Grupos substituintes e efeitos causados na fluorescência

Os grupos *alquilo*, normalmente, não afectam a emissão de fluorescência, a menos que possuam uma dimensão suficientemente grande que lhes facilite o contacto com uma parte da molécula, o que pode levar, juntamente com a localização da ligação, à diminuição da fluorescência (Ewing, 1987).

Os grupos *carbonilo* que possuem o heteroátomo oxigênio, acrescentam uma transição $n \rightarrow \pi^*$ à molécula e provocam um decréscimo da fluorescência, facilitando o aparecimento da fosforescência.

A presença de um grupo *ciano* também acrescenta à molécula uma transição $n \rightarrow \pi^*$, mas ao contrário do que acontece com o substituinte *carbonilo*, a transição é energeticamente superior a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, o que faz com que a presença do grupo *ciano* tenha um efeito desprezável, quer na intensidade da fluorescência quer no comprimento de onda de emissão (Skoog, 1995).

Os grupos *amino* e *oxidrilo* podem afectar a emissão de fluorescência, devido às interações que podem estabelecer com alguns solventes.

Os grupos *nitroilo* também estão associados a uma transição de baixa energia do tipo $n \rightarrow \pi^*$, responsável pela diminuição da intensidade da fluorescência, nesses compostos.

Os grupos *sulfonilo*, em geral não produzem qualquer efeito na emissão da fluorescência. A adição destes grupos tem por objectivo, aumentar a solubilidade da molécula luminescente (Gonçalves, 1983).

Com os *halogénios*, verifica-se uma diminuição da intensidade da fluorescência com o aumento do número atómico, devido a um aumento da velocidade do processo de transição para o estado triplete (Atkins, 1982).

A adição de um átomo pesado a uma molécula faz com que os estados excitados, singlete e triplete, se tornem, do ponto de vista energético, idênticos. Assim, a probabilidade de ocorrência de fluorescência diminui, aumentando a probabilidade da desactivação ser através da fosforescência (Skoog, 1995).

Quando o átomo pesado faz parte da estrutura da molécula luminescente, o processo

designa-se por *efeito do átomo pesado interno* (é o que se passa quando os substituintes são halogénios). Pelo contrário, quando o átomo pesado faz parte da solução, o processo toma o nome de *efeito do átomo pesado externo*. Aqui, verifica-se um aumento na velocidade de formação do triplete e uma conseqüente diminuição de fluorescência.

3.2.3. Factores ambientais

São sete os factores ambientais que vulgarmente afectam a fluorescência.

POLARIDADE DO SOLVENTE

A maior parte dos ensaios flurimétricos são realizados em meio líquido. A polaridade do solvente pode influenciar, as energias das transições aumentando por exemplo as $n \rightarrow \pi^*$ com a polaridade do solvente e sofrendo as $\pi \rightarrow \pi^*$ um efeito oposto. Se tal tornar a energia do processo $\pi \rightarrow \pi^*$ inferior à da transição $n \rightarrow \pi^*$, verifica-se um aumento na intensidade da radiação emitida por fluorescência (gonçalves, 1983).

TEMPERATURA

Um aumento de temperatura diminui a emissão de fluorescência.

Quando a temperatura aumenta, provoca um acréscimo na energia cinética das partículas, o que implica um aumento da probabilidade de colisões entre elas e também um aumento da possibilidade de desactivação molecular por processos que não envolvam a emissão de radiação (*conversão interna*).

pH

A variação do pH de uma solução pode afectar a emissão de fluorescência, se o composto em estudo possuir grupos funcionais ácidos ou básicos, uma vez que ocorrem alterações estruturais das espécies fluorescentes à medida que aqueles grupos se ionizam (*Skoog, 1995*).

A fluorescência de um composto aromático com substituintes ácidos ou básicos, no anel é geralmente dependente do pH. Tanto o comprimento de onda como as intensidades de emissão são diferentes para as duas formas ácido-base.

Dum modo geral pode afirmar-se que a constante de dissociação ácida para a molécula excitada é menor do que para a mesma espécie no seu estado fundamental.

Nos procedimentos analíticos, baseados na fluorescência, deve-se ter sempre um controle sobre o pH (*Gonçalves, 1983*).

PRESENÇA DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO

A presença de oxigénio dissolvido na solução, a analisar, diminui a intensidade da fluorescência. Este efeito pode ser o resultado de uma oxidação, induzida fotoquimicamente, das espécies fluorescente.

Contudo, é mais frequente uma atenuação energética (*relaxação interna*) como consequência das propriedades do oxigénio molecular, o que provoca *cruzamentos entre sistemas* e a conversão das moléculas excitadas ao estado tripleto. Este efeito, deve-se às interacções que se estabelecem entre os electrões desemparelhados do estado tripleto fundamental do oxigénio e os electrões do estado excitado do composto luminescente (*Skoog, 1995*).

Assim, deve remover-se o oxigénio dissolvido, fazendo borbulhar azoto ou argon através da solução durante alguns minutos.

LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO

Quando o soluto é capaz de estabelecer ligações de hidrogénio com o solvente, a emissão de fluorescência pelo composto pode ser afectada. Este efeito manifesta-se especialmente sobre os átomos de hidrogénio ligados a um heteroátomo da molécula luminescente, uma vez que os electrões não ligantes sobre os heteroátomos são estabilizados pela ligação de hidrogénio (*Skoog, 1995*).

PRESENÇA DE OUTROS SOLUTOS

A presença de um segundo soluto, na solução a analisar, pode ser também um factor que diminua a intensidade da fluorescência nas seguintes situações :

- Quando o segundo soluto absorver radiação ao mesmo comprimento de onda que o primeiro, pode provocar um decréscimo da excitação da substância que se pretende analisar.

- Quando o segundo soluto absorve radiação ao comprimento de onda a que o primeiro emite luminiscência, alguma dessa luminiscência pode ser absorvida antes de ser transmitida da célula para o detector (*Skoog, 1995*).

Um soluto adicional, mesmo que não absorva radiação, pode também reduzir completamente a luminiscência de uma solução minimizando o número de colisões moleculares.

Em qualquer dos casos ocorre sempre uma diminuição da quantidade de radiação

emitida a partir da célula (*efeito do filtro interno*).

Uma das formas utilizadas para compensar este efeito é utilizar-se um padrão interno (*Skoog, 1995*).

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NA INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA

Se a absorvência tomar valores superiores a 0,05, os termos entre parêntesis da equação (6) tornam-se insignificantes e passa a observar-se uma relação não linear entre a fluorescência e a concentração. Para valores muito elevados de absorvência, a expressão (6) assume a seguinte forma :

$$F = K' P_0$$

e a intensidade da fluorescência torna-se independente da concentração.

A maioria dos aparelhos são construídos com o objectivo de medirem a intensidade da luminiscência no centro da célula. Assim, para soluções de concentração elevada, essa localização, conduz a um decréscimo da intensidade da luminiscência.

É possível que soluções com concentrações diferentes do composto, apresentem potência de emissão idênticas. Ao suspeitar-se deste problema, num determinado ensaio, deve proceder-se à diluição da amostra e á determinação do novo valor da potência de fluorescência (*Ewing, 1987*).

Contudo, se observarmos um decréscimo proporcional à diluição, a concentração deverá ser calculada com o valor mais baixo. Se a fluorescência aumentar, ou não diminuir tanto como era de esperar, deveremos suspeitar que o valor da concentração da solução excede o intervalo em que se observa uma relação linear, entre a potência da fluorescência e a concentração.

3.3.MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

A fotoluminiscência raramente é utilizada em análise qualitativa uma vez que, muitos compostos apresentam fotoluminiscência na presença de radiação com o mesmo comprimento de onda (*Gonçalves, 1983*).

Deve utilizar-se a análise qualitativa quando o número de compostos da amostra é limitado e os comprimentos de onda de emissão ou de excitação de cada composto diferem significativamente uns dos outros.

De uma maneira geral podemos afirmar que os métodos fluorimétricos são aplicáveis a concentrações menores que os espectrofotométricos e estão dentro das técnicas analíticas dos menores limites de detecção.

Em muitas análises de fluorescência o limite de detecção está situado entre 0,001 e os 2 µg /mL (*Skoog, 1995*).

Contudo, tal como já foi referido, deve ter-se alguns cuidados na utilização da fluorimetria. Por exemplo, os compostos fluorescentes são muitas vezes dependentes do pH da solução, tal como acontece em espectrometria de absorção. Também a intensidade da radiação fluorescente depende da temperatura.

Por último é de salientar os cuidados a ter com as possíveis contaminações de substâncias fluorescentes em teores não detectáveis por outros métodos. Assim, por exemplo, a própria água pode extrair substâncias fluorescentes da borracha e dos plásticos dos próprios recipientes, pelo que se deverão tomar algumas precauções na execução das análises (*Gonçalves, 1983*).

3.3.1. Técnicas utilizadas

Em análise quantitativa prepara-se, normalmente, uma curva de calibração para uma série de soluções padrão e determina-se a concentração da amostra por interpolação gráfica.

Em alguns casos as amostras a analisar não apresentam luminiscência, mas podem ser convertidas em espécies luminiscentes se as fizermos reagir com reagentes que emitem fluorescência. A reacção química é realizada com as amostras e com os padrões da amostra, nunca esquecendo o branco.

Muitas substâncias inorgânicas podem ser analisadas fazendo-as reagir com um reagente fluorescente para formar um produto de reacção fotoluminiscente.

Alguns metais podem ser doseados fazendo-os reagir com um ligando não luminiscente para produzir um produto luminiscente ou, em alternativa, o ligando pode ser doseado por reacção com o ião metálico apropriado (*Skoog, 1995*).

De entre os vários elementos inorgânicos que podem ser determinados por adição de um reagente fluorimétrico, salientam-se os seguintes:

Al, Au, B, Be, Ca, Cd, Cu, Ga, Mg, S, Se, Sn, Ta, Te e o Zn

Os compostos orgânicos e bioquímicos podem também ser doseados por fluorimetria quando é possível preparar quantitativamente um derivado que apresente fluorescência. Muitas vezes adiciona-se um ião metálico para se formar um complexo fluorescente, outras vezes, faz-se reagir o composto bioquímico com um marcador fluorescente. Contudo, é necessário não esquecer, que antes de se proceder às leituras de fluorescência se torna necessário separar (*geralmente por cromatografia ou electroforese em gel*) o marcador (*Gonçalves, 1983*).

3.4. INSTRUMENTAÇÃO

Em todos os fluorímetros, de filtro ou espectrofluorímetros, podem-se considerar quatro elementos principais:

- Fonte de excitação;
- Célula da amostra;
- Detector, mede a fotoluminiscência;
- Filtros (*dois*) ou monocromadores, para seleccionar os comprimentos de onda de excitação e de emissão.

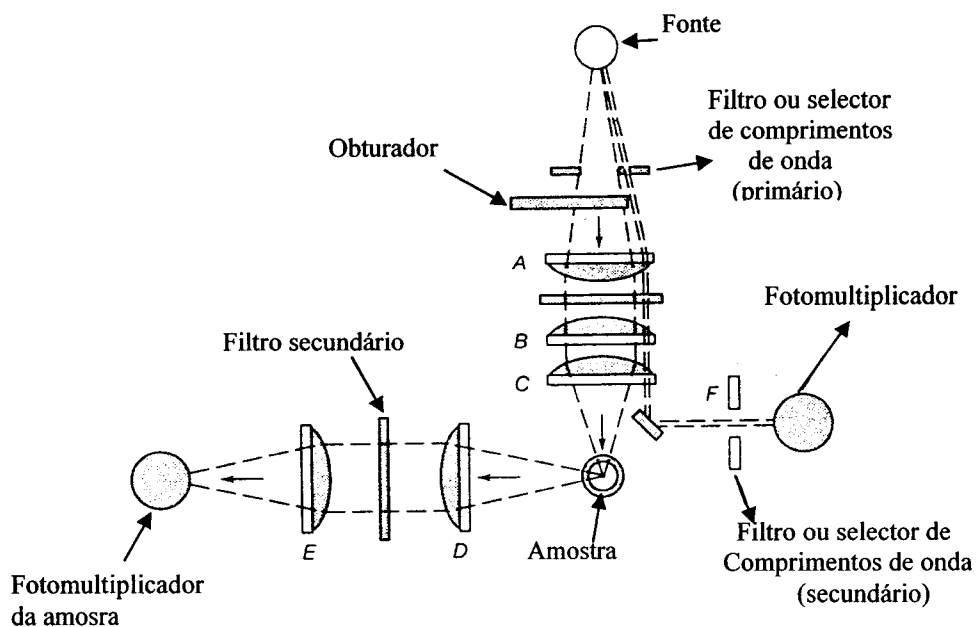


Figura 3.3. Esquema de um fluorímetro (Skoog, 1995).

A radiação electromagnética proveniente da fonte passa através do filtro (*de excitação*) e do obturador para a amostra.

Os filtros ou os selectores de comprimento de onda, transmitem apenas os

comprimentos de onda específicos, de excitação.

A luz emitida quando a radiação excitadora incide sobre a amostra, passa através do filtro secundário que transmite apenas os comprimentos de onda correspondentes ao máximo de emissão da fluorescência, rejeitando a eventual luz parasita, de excitação.

A radiação emitida não é medida “in-line” como a radiação absorvida, uma vez que pode ser lida nas várias direcções possíveis, relativamente à direcção da radiação excitante, e em vários locais no interior da célula. Normalmente escolhe-se um percurso para a leitura da radiação emitida, que seja perpendicular ao da radiação excitante e no centro da célula (*Skoog, 1995*).

Quase todos os instrumentos de fluorescência utilizam ópticas de feixe duplo para compensar as variações da fonte. Nestes a radiação proveniente da fonte é dividida em dois feixes. Um dos feixes passa através da célula enquanto o outro é utilizado como referência. Estes aparelhos designam-se por espectroflurímetros de feixe duplo.

Na figura 3.4 mostra-se um esquema óptico de um espectrofluorímetro.

A radiação do primeiro monocromador divide-se em duas, uma delas passa através do fotomultiplicador de referência e a outra pelo da amostra. A radiação fluorescente resultante, depois de ser dispersada no segundo monocromador, é detectada no segundo fotomultiplicador (*Ewing, 1987*).

Os resultados obtidos com estes instrumentos não dependem apenas da intensidade da fluorescência mas também das características da lâmpada do detector e dos

monocromadores. Todas estas características variam com o comprimento de onda e são específicas de cada aparelho.

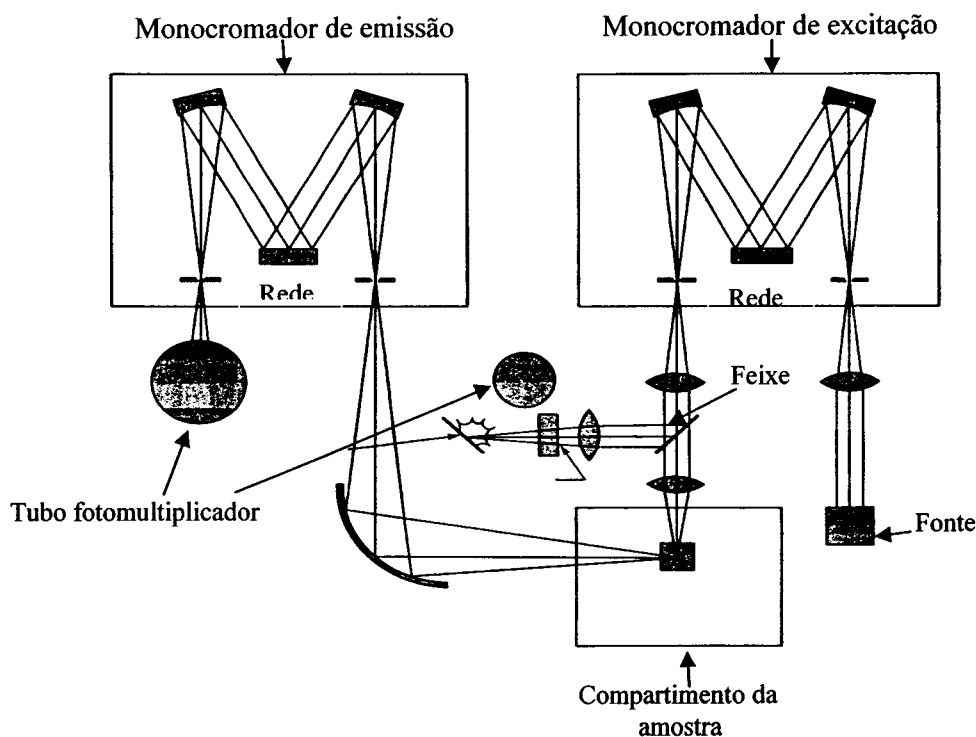


Figura 3.4. Esquema de um espectrofluorímetro de feixe duplo (Skoog, 1995).

3.4.1. Fontes de excitação

Normalmente as fontes de radiação que são utilizadas para medições de fotoluminescência são as lâmpadas em arco de mercúrio e a lâmpada de descarga de xénon.

A lâmpada de mercúrio é utilizada especialmente em aparelhos que utilizam filtros, como selectores do comprimento de onda, entre a fonte e a célula, devido ao facto daquela emitir uma linha espectral e não um feixe de radiação contínua.

As lâmpadas de xénon emitem uma radiação contínua num intervalo de comprimentos de onda que se estende desde o ultra-violeta até às regiões próximas do infra-vermelho (*Ewing, 1987*).

Este tipo de lâmpadas emite em contínuo, o que permite que sejam efectuados varrimentos de comprimento de onda. A radiação emitida é mais intensa na região do ultra-violeta do que por exemplo a emitida por lâmpadas de filamento de tungsténio.

As lâmpadas de xénon enquanto estão a funcionar geram ozono, que deve ser removido por um sistema de ventilação conveniente, do local onde o aparelho está instalado.

3.4.2. Selectores de comprimentos de onda

Os dispositivos utilizados para selecção dos comprimentos de onda nas medições fluorimétricas são os filtros, os monocromadores de rede e combinações de filtros com monocromadores (*Skoog, 1995*).

O aparelho designa-se de fluorímetro no caso de serem utilizados filtros e espectrofluorímetro se forem utilizados monocromadores.

Quando são utilizados filtros, o primário é colocado entre a fonte e a célula, enquanto que o secundário é colocado entre esta e o detector.

Normalmente, os fluorímetros são utilizados em ensaios para os quais sejam já conhecidos os comprimentos de onda de emissão e de excitação (*Skoog, 1995*).

Os espectrofluorímetros são utilizados quando é necessário fazer varrimentos de comprimentos de onda, tanto da radiação de excitação como da luminescente.

Os monocromadores utilizados nos aparelhos mais modernos são quase sempre redes

de difracção (*Skoog, 1995*).

3.4.3.Células

As células utilizadas em fluorimetria são idênticas às utilizadas em espectrofotometria do UV/Vis.

Tal como nas medições espectrofotométricas, as células possuem janelas transparentes à radiação incidente e à radiação emitida.

Normalmente, podem ser utilizados dois tipos de células:

- de vidro, tipo pyrex;
- com janelas de sílica fundida.

As primeiras são utilizadas em estudos realizados com comprimentos de onda superiores a 320 nm, enquanto que as segundas se aplicam para comprimentos de onda inferiores (*Ewing, 1987*).

3.4.4.Detectores

O sinal de fluorescência, tipicamente, é de baixa intensidade, necessitando-se da sua amplificação para se efectuarem as medições. Os tubos fotomultiplicadores são muito utilizados como detectores em aparelhos de fluorescência.

Contudo, os detectores de díodos também têm sido propostos para os espectrofluorímetros.

Os dispositivos de leitura podem ter tanto digitais como analógicos. A maioria dos

aparelhos hoje fabricados são controlados por computadores com software específico, ligados a impressoras ou plotters (*Skoog, 1995*).

4. METODOLOGIA

Após a pesquisa bibliográfica, tendo em vista estudar as condições analíticas para a determinação do cloreto de TBT por espectrometria de absorção atômica e fluorimetria, demos início a estudos experimentais preliminares por espectrometria de absorção atômica utilizando a câmara de grafite e posteriormente por fluorimetria.

Começámos por nos familiarizar com o equipamento.

Seguidamente, prepararam-se soluções de urina com várias concentrações de cloreto de TBT para determinar, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite, a sua concentração naquele fluido (*H. Boiteau et al., 1978*).

Devido à insuficiência dos resultados que o Laboratório (*IPIMAR*) nos pôde fornecer enveredámos pelo método fluorimétrico (*R. Companó et al., 1995*).

A metodologia que usámos neste trabalho dividiu-se em três fases:

1ª Fase : — ESTUDO DO MÉTODO

Nesta fase, realizámos alguns estudos experimentais prévios sobre vários parâmetros em solução aquosa que poderiam afectar o método de análise do cloreto de TBT, por fluorimetria. Estudámos a variação da concentração do fisetine para determinados valores de pH, fazendo as leituras a duas aberturas diferentes (*5 e 10 nanómetros*) da janela do fluorímetro.

2ª Fase : — ESTUDO *In Vitro*

Nesta fase, prepararam-se soluções de urina com várias concentrações de cloreto de TBT e estudámos o método de extracção deste composto no fluido utilizando diversos solventes, com o objectivo de otimizar a extracção tendo em vista construir uma curva de calibração e analisar a urina obtida no estudo “*In Vivo*”.

3ª Fase : — ESTUDO *In Vivo*

Na terceira e última fase, colocámos três ratos machos Wistar em gaiolas individuais de metabolismo, durante quatro dias com água *ad libitum* e comida disponibilizada das 9 às 12 horas.

No quinto dia, após 21 horas de jejum, os ratos foram injectados intraperitonealmente com uma solução de cloreto de TBT. Nos quatro dias seguintes, amostras de urina de cada rato, recolhidas diariamente, foram juntas no mesmo recipiente. A fracção contendo TBT foi extraída e com ela preparadas amostras para leitura no fluorímetro com o objectivo de quantificar, face à curva de calibração, o cloreto de TBT excretado pelo organismo do rato.

Além disso, procedemos diariamente ao estudo do comportamento geral dos animais e ao controlo dos seguintes parâmetros:

- volume de água ingerido;
- quantidade de comida ingerida;
- volume de urina produzido
- massa corporal;
- peso das fezes produzidas

4.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Durante o trabalho (*análises e preparação das amostras*), utilizamos essencialmente 6 equipamentos:

- Um espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite;
- um espectrofluorímetro associado a um computador;
- um eléctrodo medidor do pH associado a uma placa de agitação magnética;
- uma centrífuga;
- um evaporador rotativo ligado a uma bomba de vácuo;
- um bidestilador;

O espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite utilizado era da marca “PERKINELMER” em modelo “4100ZL”, como se segue:

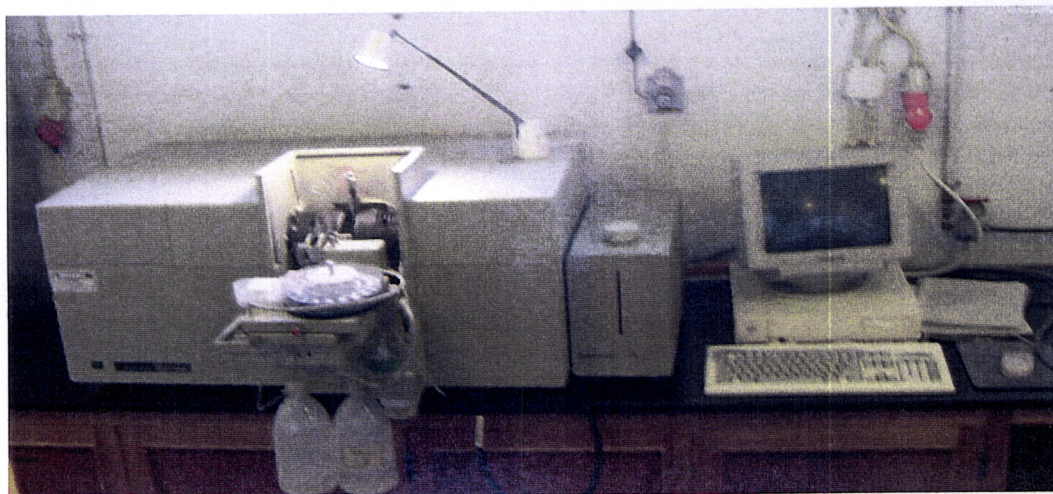


Figura 4.1. Espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite (*existente no Laboratório de solos da Univ. Évora, localizado na Mitra*)

O espectrofluorímetro utilizado para as análises era da marca “SHIMADZU” e modelo “RF-5001PC”, como se mostra na figura que se segue:

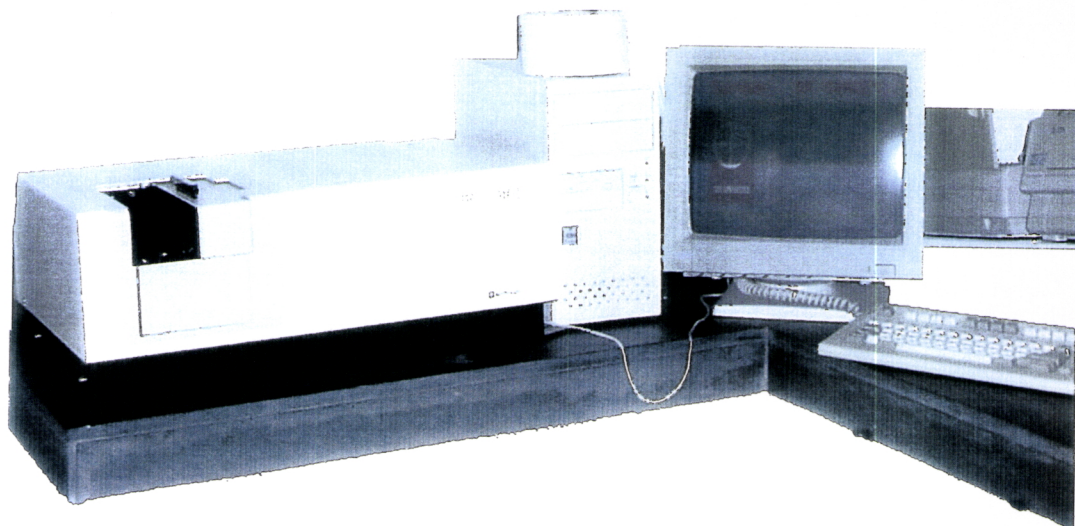


Figura 4.2. Espectrofluorímetro (existente no Laboratório de Química da Univ. de Évora)

O eléctrodo medidor de pH utilizado era da marca “METTROHM” e modelo “691 pH METTER” associado a uma placa de agitação magnética de marca “HANNA” e modelo “HI 305N” que se encontra na figura 4.3.

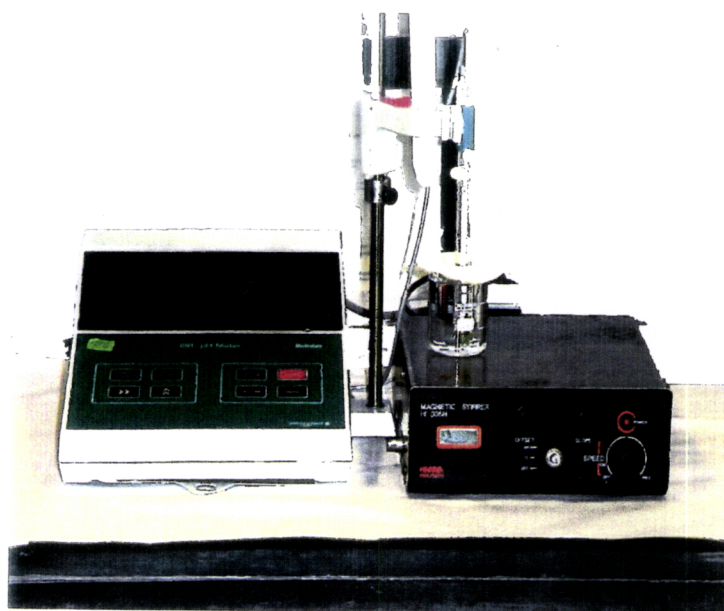


Figura 4.3. Medidor de pH (existente no Laboratório de Química da Univ. de Évora)

A centrífuga utilizada para a preparação das amostra para análise era da marca “HERMLE” e modelo “Z 380”, como se mostra na figura seguinte:



Figura 4.4.Centrífuga (existente no Laboratório de Química da Univ. de Évora)

O evaporador rotativo com que trabalhamos era da marca “HEIDOLPH” e modelo “WB 2000” acoplado a uma bomba de vácuo de marca “WALTERS” e modelo “DDA—V130—BN” como se mostra na figura 4.5.

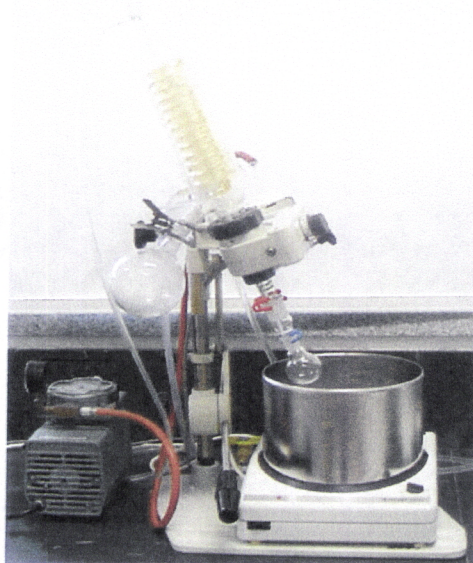


Figura 4.5.Evaporador rotativo(existente no Laboratório de Química da Univ. de Évora)

A centrífuga utilizada para a preparação das amostras para análise era da marca “HERMLE” e modelo “Z 380”, como se mostra na figura seguinte:

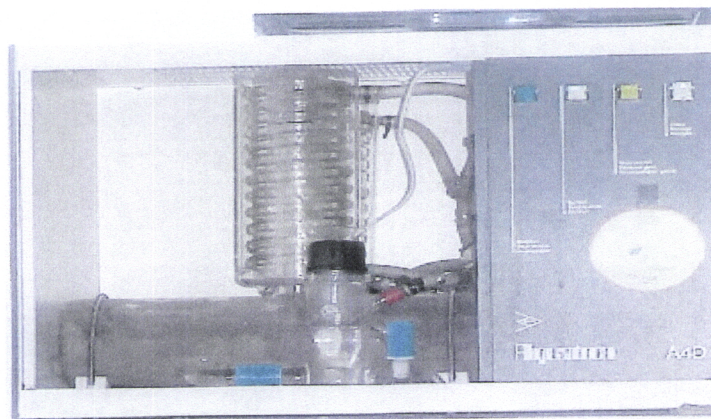


Figura 4.6. Bidestilador (existente no Laboratório de Química da Univ. de Évora)

Utilizamos ainda um ultra-som para a dissolução das amostras como iremos referir mais à frente.

4.2. REAGENTES UTILIZADOS

Utilizamos durante o trabalho os seguintes reagentes:

- Cloreto de TBT ($C_{12}H_{27}ClSn$; $M=325,49$ g/mol, $d=1,20$ Kg/L e um grau de pureza de 96%) da Riedel;
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; $M=98,08$ g/mol, $d=1,84$ Kg/L) da Merck
- Ácido nítrico (HNO_3 ; $M=63,01$ g/mol, $d=1,40$ Kg/L e um grau de pureza de 65%) da Merck
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2 ; $M=34$ g/mol, $d=1,11$ Kg/L e um grau de pureza de 30%) da Riedel;
- Iodeto de potássio (KI ; $M=166$ g/mol) da Riedel

- Fisetine hidrate (3,3',4',7 - tetrahidroxiflavona ; $M = 286,24 \text{ g/mol}$) da Aldrich Chem;
- Triton X-100 ($C_{34}H_{62}O_{11}$; $M=646,86 \text{ g/mol}$ e $d=1,07 \text{ Kg/L}$) da Riedel;
- Diclorometano (CH_2Cl_2 ; $M=84,93 \text{ g/mol}$ e $d=1,33 \text{ Kg/L}$) da Merck;
- Metanol (CH_3OH ; $M=32,04 \text{ g/mol}$ e $d=0,79 \text{ Kg/L}$) da Merck;
- Tolueno (C_7H_8 ; $M=91,14 \text{ g/mol}$) da Riedel;
- Acetato de amónia (CH_3COONH_4 ; $M=77,08 \text{ g/mol}$) da Merck;
- Hidróxido de sódio ($NaHO$; $M=58,44 \text{ g/mol}$) da Merck.
- Ácido nítrico (HNO_3 ; $M=63,01 \text{ g/mol}$, $d=1,40 \text{ Kg/L}$ e um grau de pureza de 65%) da Merck .

4.2.1. Preparação e conservação das soluções

Preparámos as seguintes soluções:

- Solução padrão de cloreto de TBT na concentração $2,86 \times 10^2 \text{ } \mu\text{g/L}$ (contem $1 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ em estanho) — utilizada nas análises por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite;
- solução de ácido sulfúrico na concentração 3 M;
- solução de iodeto de potássio na concentração 5 M
- solução padrão de cloreto de TBT na concentração $1,43 \times 10^6 \text{ } \mu\text{g/L}$ (contem $5 \times 10^{-1} \text{ g/L}$ em estanho) — utilizada nas análises por fluorimetria;
- solução do fisetina na concentração $1,75 \times 10^{-3} \text{ M}$;

- solução de triton X-100 na concentração $2,000 \times 10^{-1}$ M;
- solução de acetato de amónia na concentração $2,25 \times 10^{-1}$ M;
- solução de hidróxido de sódio na concentração $2,000 \times 10^{-1}$ M;
- solução de ácido nítrico na concentração 2,22 M

Com excepção da solução de cloreto de TBT, todas as outras soluções foram utilizadas nas três fases do trabalho, anteriormente descritas.

A solução de Triton X-100 foi preparada com água bidestilada, sob agitação, com um magneto durante um intervalo de tempo de 4-5 minutos.

A solução do fisetine e a solução padrão de cloreto de TBT foram preparadas em metanol e mantidas no congelador. Todas as outras soluções incluindo as diluições, foram preparadas com água bidestilada e mantidas no frigorífico em frascos de vidro escuro. Estas só foram retiradas do frigorífico ou do congelador para serem utilizadas, voltando a ser colocadas no mesmo local, logo de seguida.

Todo o material de vidro utilizado no trabalho, depois de lavado, foi mantido em solução do ácido nítrico durante 24 h. Seguidamente, foi enxaguado várias vezes com água bidestilada e posto a secar na estufa.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho, como já foi referido anteriormente, pretendemos estudar as condições analíticas para a determinação do cloreto de TBT por dois métodos:

- espectrometria de absorção atómica utilizando a câmara de grafite;
- fluorimetria.

5.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

Como referimos anteriormente, começámos por trabalhar em espectrometria de absorção atómica utilizando câmara de grafite com o objectivo de determinar a concentração do cloreto de TBT em amostras biológicas. Assim, utilizámos o seguinte protocolo experimental dividido em três fases:

MINERALIZAÇÃO

Nesta fase do protocolo experimental mantivemos 1 rato Wistar, macho, numa gaiola individual de metabolismo, sem comida com água *ad libitum* para recolhermos a urina de 16 horas.

Uma vez recolhida a urina, procedemos de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Centrifugar a urina durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m.

2- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;

Após termos obtido o sobrenadante, retirámos 1 mL e introduzimo-lo num tubo rolhado com uma rolha de politileno. Seguidamente adicionámos-lhe 1 mL de ácido sulfúrico e 0,5 mL de ácido nítrico e perfizemos o volume de 4 mL com água bidestilada. Preparámos nas mesmas condições um ensaio para o branco, e três amostras de referência com 0,25, 0,5 e 1 mL da solução de cloreto de TBT (*solução especificada na secção 4.2.1*). Fizemos duas réplicas para as amostras e para o padrão.

Seguidamente fechámos os tubos e mantivemo-los durante 2 horas a 150 ° C.

Depois de os deixarmos arrefecer durante 10-15 minutos, adicionámos-lhes 0,5 mL de peróxido de hidrogénio e mantivemo-los a 250° C durante 1 hora. No final deste processo o conteúdo dos tubos deve estar incolor, caso contrário, deve adicionar-se novamente, a cada um deles, 0,5 mL de peróxido de hidrogénio seguido de um novo aquecimento a 250° C.

EXTRACÇÃO

Começámos por deixar arrefecer durante 15 minutos os tubos e adicionámos-lhes 3 mL de água bidestilada. Seguidamente, mergulhámos os tubos num banho de água fria durante 30 minutos e adicionámos-lhes 1 mL da solução de iodeto de potássio e 1 mL de tolueno. Agitámos no vortex durante 3 minutos cada um dos tubos. Vazámos o seu conteúdo para ampolas de decantação e deixámos decantar a fase aquosa.

DETERMINAÇÃO ESPECTROMÉTRICA

Uma vez obtida a fase orgânica enviámo-la para o IPIMAR.

Pensamos que as condições de trabalho para as leituras no espectrómetro de absorção atômica utilizando a câmara de grafite tenham sido as seguintes (*H. Boiteau et al., 1978*):

- comprimento de onda — 224,6 nanómetros;
- tempo de secagem — 30 segundos
- temperatura de secagem — 25° C;
- tempo de mineralização — 30 segundos;
- temperatura de mineralização — 680 ° C
- tempo de atomização — 6 segundos;
- temperatura de atomização — 2660° C

No entanto, o IPIMAR não disponibilizou esta informação.

5.2. FLUORIMETRIA

Em relação ao método da fluorimetria, dividimos o trabalho em três fases, em cada uma das quais apresentamos os respectivos protocolos experimentais.

5.2.1. Estudo do método

Nesta primeira fase, para cada valor de pH (6,9; 7,2 e 7,5), estudámos a variação da concentração do fisetine em solução aquosa, respectivamente $2,1875 \times 10^{-6}$; $4,375 \times 10^{-6}$ $8,75 \times 10^{-6}$; $17,5 \times 10^{-6}$ e $35,0 \times 10^{-6}$ M, feito em triplicado.

Todas as leituras, das amostras, foram feitas para duas aberturas diferentes (5 e 10 nanómetros) da janela do fluorímetro.

5.2.1.1. Doseamento do cloreto de TBT a pH 6,9 (*estudo do método*)

Neste estudo, em copos de 25 mL introduzimos, 10 mL da solução de acetato de amónia, 1500 µL da solução de triton X-100 e 3 mL de água bidestilada. Nas mesmas condições, preparámos um ensaio para o branco e cinco amostras de solução de fisetine respectivamente com 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 µL da sua solução padrão.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 6,9 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro, com a abertura de janela — 5 nm e seguidamente, com a abertura de janela — 10 nm.

Por cada amostra, seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

5.2.1.2. Doseamento do cloreto de TBT a pH 7,2 (*estudo do método*)

Neste estudo, em copos de 25 mL introduzimos, 10 mL da solução de acetato de amónia, 1500 µL da solução de triton X-100 e 3 mL de água bidestilada. Nas mesmas condições, preparámos um ensaio para o branco e cinco amostras de solução de fisetine respectivamente com 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 µL da sua solução padrão.

Para os ensaios em branco acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro, com a abertura de janela — 5 nm e seguidamente, com a abertura de janela — 10 nm.

Por cada amostra, seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

5.2.1.3. Doseamento do cloreto de TBT a pH 7,5 (*estudo do método*)

Neste estudo, em copos de 25 mL introduzimos, 10 mL da solução de acetato de amónia, 1500 µL da solução de triton X-100 e 3 mL de água bidestilada. Nas mesmas condições, preparámos um ensaio para o branco e cinco amostras de solução de fisetina respectivamente com 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 µL da sua solução padrão.

Para os ensaios em branco acertámos o valor do pH a 7,5 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. Procedendo de imediato à sua leitura no fluorímetro, com a abertura de janela — 5 nm e seguidamente com a abertura de janela — 10 nm.

Por cada amostra, seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetina.

5.2.2. Estudo *In Vitro*

Começámos por utilizar, a uma concentração fixa de cloreto de TBT, diversos solventes tendo em vista otimizar a extracção deste composto na urina.

Em seguida, fizemos variar a concentração do cloreto de TBT na urina respectivamente 3×10^4 , 6×10^4 , 9×10^4 , 12×10^4 e 15×10^4 µg/L e construímos a curva de calibração.

Finalmente, aferimos a metodologia desenvolvida no estudo de uma amostra problema.

5.2.2.1. Selecção do melhor solvente

Utilizámos para a mesma concentração de cloreto de TBT três solventes:

- tolueno;
- diclorometano;

- metanol.

com o objectivo de seleccionarmos aquele que melhor extraía o composto da urina.

Utilizámos três réplicas para cada solvente.

ESTUDO DA EXTRACÇÃO COM O TOLUENO

Para efectuarmos este estudo mantivemos 1 rato Wistar macho numa gaiola individual de metabolismo, sem comida com água *ad libitum* para recolhermos a urina de 16 horas.

Uma vez recolhida a urina, procedemos para cada amostra e cada réplica de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Centrifugar a urina durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m.
- 2- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;
- 3- Retirar amostras de 0,5 mL para tubos de centrífuga;
- 4- Adicionar a solução de cloreto de TBT, de modo a obter a concentração $3 \times 10^3 \mu\text{g/L}$;
- 5- Agitar no vortex;
- 6- Proceder à extracção do cloreto de TBT adicionando 0,5 mL de tolueno, em cada tubo e agitar suavemente;
- 7- Centrifugar a cerca de 2600 r.p.m. ;
- 8- Recolher, com o auxílio de uma micropipeta, a fase orgânica para balões de 25 mL;

9- Repetir o procedimento da extracção mais duas vezes, para cada tubo, recolhendo a fase orgânica;

10- Preparar nas mesmas condições o branco sem adição de cloreto de TBT;

11- Colocar, os balões com a fase orgânica, no rotavapor sob vácuo, a velocidade moderada e à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método, empregámos as seguintes condições de trabalho na continuidade do estudo para a selecção do solvente:

- Concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia e mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos, após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles, 1500 μ L da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 μ L da solução do fisetine.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro. Para cada amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

ESTUDO DA EXTRACÇÃO COM O DICLOROMETANO

Para efectuarmos este estudo mantivemos 1 rato Wistar macho numa gaiola individual de metabolismo, sem comida com água *ad libitum* para recolhemos a urina de 16 horas.

Uma vez recolhida a urina, procedemos para cada amostra e cada réplica de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Centrifugar a urina durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m.
- 2- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;
- 3- Retirar amostras de 0,5 mL para tubos de centrífuga;
- 4- Adicionar a solução de cloreto de TBT, de modo a obter a concentração $3 \times 10^3 \mu\text{g/L}$;
- 5- Agitar no vortex;
- 6- Proceder à extracção do cloreto de TBT adicionando 0,5 mL de diclorometano, em cada tubo e agitar suavemente;
- 7- Centrifugar a cerca de 2600 r.p.m. ;
- 8- Recolher, com o auxílio de uma micropipeta, a fase orgânica para balões de 25 mL;
- 9- Repetir o procedimento da extracção mais duas vezes, para cada tubo, recolhendo a fase orgânica;
- 10- Preparar nas mesmas condições o branco sem adição de cloreto de TBT;

11-Colocar, os balões com a fase orgânica, no rotavapor sob vácuo, a velocidade moderada e à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método, empregámos as seguintes condições de trabalho na continuidade do estudo do diclorometano como solvente:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia, mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos, após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles, 1500 µL da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 µL da solução do fisetine.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro. Para cada amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

ESTUDO DA EXTRACÇÃO COM O METANOL

Para efectuarmos este estudo mantivemos 1 rato Wistar macho numa gaiola

individual de metabolismo, sem comida com água *ad libitum* para recolhemos a urina de 16 horas.

Uma vez recolhida a urina, procedemos para cada amostra e cada réplica de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Centrifugar a urina durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m.
- 2- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;
- 3- Proceder à diluição do sobrenadante, com água ultrapura, na proporção de 1:25;
- 4- Retirar amostras de 5 mL para tubos de ensaio;
- 6- Adicionar a solução de cloreto de TBT, de modo a obter a concentração $3 \times 10^3 \mu\text{g/L}$;
- 7- Agitar no vortex;
- 8- Preparar nas mesmas condições o branco sem adição de cloreto de TBT;

PREPARAÇÃO DAS COLUNAS SEP PAK C₁₈ (*Waters-Millipore*)

Uma vez preparadas as três réplicas da amostra e o branco, procedemos de imediato à lavagem das colunas *Sep Pak C₁₈* de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Colocar 4 colunas no aparelho *Sep Pak Vac*;
- 2- Com a ajuda de uma pipeta Pasteur encher as 4 colunas com metanol, cerca de 3 mL, de forma a não deixar nenhuma bolha de ar;
- 3- Ligar o aparelho ao sistema de vácuo e abrir lentamente as torneiras das colunas

de forma a que o líquido possa escorrer lentamente ao longo das colunas;

- 4- Fechar a torneira quando a parte inferior do menisco do líquido estiver a tocar na sílica,
- 5- Tomar o devido cuidado para não deixar secar as colunas;
- 6- Desligar o vácuo;
- 7- Com a ajuda de uma pipeta Pasteur encher as colunas com água ultrapura de forma a não deixar nenhuma bolha de ar.

Seguidamente, procedemos à concentração e extracção do cloreto de TBT da amostra e das réplicas de acordo com os seguintes pontos:

- 1- Adaptar 4 agulhas de aço inoxidável uma para cada coluna no aparelho *Sep Pak Vac*;
- 2- Colocar 4 torneiras de polipropileno e sobre cada uma delas apoiar uma coluna *Sep Pak*, C_{18} , previamente lavadas, onde se irá concentrar a amostra e seguidamente extrair o cloreto de TBT;
- 3- Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur encher completamente 3 colunas com a amostra e as réplicas e uma com o branco, evitando introduzir bolhas de ar;
- 4- Ligar o aparelho ao sistema de vácuo e abrir ligeiramente a torneira de forma a que a velocidade de passagem da solução através da coluna seja inferior a 10 mL/min.;
- 5- Adicionar, após a passagem da solução pelas colunas, 5 mL de água ultrapura;

- 6- Deixar, mantendo a torneira aberta, a coluna secar durante 4-5 minutos;
- 7- Fechar a torneira e desligar o vácuo;
- 8- Colocar no suporte do aparelho *Sep Pak Vac* balões de 25 mL de capacidade, onde irão ser recolhidos os extractos;
- 9- Proceder à extracção com cerca de 2 mL de metanol;
- 10- Colocar os balões, com a fase orgânica, no rotavapor sob vácuo, a velocidade moderada e à temperatura ambiente;
- 11- Lavar as colunas com 5 mL de metanol, 5 mL de água e novamente com 5 mL de metanol;
- 12- Deixar secar as colunas para posteriores extracções.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método, empregámos as seguintes condições de trabalho na continuidade do estudo do metanol como solvente:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia,

mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles 1500 μL da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 μL da solução do fisetine.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro. Para cada amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

5.2.2.2. Construção da curva de calibração adicionando várias concentrações de cloreto de TBT à urina

Para dar prosseguimento a esta segunda fase do trabalho, estudo *in vitro*, mantivemos seis ratos machos Wistars em gaiolas individuais de metabolismo, sem comida, com água *ad libitum*, e recolhemos a urina de 16 horas.

Nesta fase do trabalho, utilizámos cinco réplicas para cada amostra.

Uma vez recolhida a urina, para cada amostra e cada réplica, procedemos de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Juntar a urina dos seis ratos;
- 2- Centrifugar a urina durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m.;
- 3- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;
- 4- Retirar amostras de 0,5 ml para tubos de centrifuga;
- 5- Adicionar a solução de cloreto de TBT, de modo a obter as seguintes concentrações: 3×10^4 ; 6×10^4 ; 9×10^4 ; 12×10^4 e 15×10^4 $\mu\text{g/L}$;

- 6- Agitar no vortex;
- 7- Proceder à extracção do cloreto de TBT adicionando 0,5 mL de diclorometano, em cada tubo e agitar suavemente;
- 8- Centrifugar a cerca de 2600 r.p.m. (*rotações por minuto*);
- 9- Recolher com o auxílio de uma micropipeta, a fase orgânica para balões de 25 mL;
- 10- Repetir o procedimento da extracção mais duas vezes, para cada tubo, recolhendo a fase orgânica;
- 11- Preparar nas mesmas condições o branco sem adição de cloreto de TBT;
- 12- Colocar os balões, com a fase orgânica, no rotavapor sob vácuo, a uma velocidade moderada e à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método e na escolha do solvente para a extracção, empregámos as seguintes condições de trabalho na construção da curva de calibração:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- melhor solvente para a extracção do cloreto de TBT — diclorometano;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e

496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia, mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos, após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles, 1500 µL da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 µL da solução do fisetine.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro. Para cada amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

5.2.2.3. Análise de uma amostra problema

Finalmente, testámos o método na análise de uma amostra de urina de rato contendo TBT em concentração que desconhecíamos e que foi preparada e fornecida pela Técnica Superior que apoiou e acompanhou o desenvolvimento deste trabalho.

A amostra foi preparada nas seguintes condições:

- a 0,5 mL de urina de rato adicionou-lhe 225 µL da solução de cloreto de TBT na concentração $1,5 \times 10^5$ µg/L;

Procedemos de acordo com os pontos que se seguem com a amostra que nos foi fornecida:

- 1- Proceder à extracção do cloreto de TBT adicionando 0,5 mL de diclorometano no tubo e agitar suavemente;
- 2- Centrifugar a cerca de 2600 r.p.m. (*rotações por minuto*);

- 3- Recolher, com o auxílio de uma micropipeta, a fase orgânica para um balão de 25 mL;
- 4- Repetir o procedimento da extração mais duas vezes, recolhendo a fase orgânica;
- 5- Preparar nas mesmas condições o branco sem adição de cloreto de TBT;
- 6- Colocar os balões, com a fase orgânica, no rotavapor sob vácuo a uma velocidade moderada e à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método e na escolha do solvente para a extração, empregámos as seguintes condições de trabalho na construção da curva de calibração:

- concentração do fisetina (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- melhor solvente para a extração do cloreto de TBT — diclorometano;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia, mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos, após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles 1500 μ L da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 μ L da solução do fisetina.

Para o ensaio em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15



mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro. Para a amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

5.2.3. Estudo *In Vivo*

Pretendemos nesta fase quantificar, através da curva de calibração, o cloreto de TBT eliminado pelo organismo dos Wistars.

Preparação dos animais

Nesta parte do trabalho mantivemos três ratos machos Wistar, da mesma ninhada, com 23 semanas de idade, nascidos no biotério do Colégio Luís Verney, em gaiolas individuais de metabolismo, onde permaneceram oito dias em adaptação às condições do ensaio, tendo em vista o controlo da quantidade de comida e o volume de água ingerida, assim como a massa corporal, o peso das fezes e o volume de urina produzidos.

Os animais foram mantidos, nas gaiolas individuais de metabolismo, numa sala com temperatura controlada a 20 ± 2 °C, a humidade mantida a $55 \pm 5\%$ sob um ciclo diário de 12 horas de luz – 12 horas de escuridão (R.Ferreira, 1999).

Diariamente, durante os oito dias de ensaio, foi-lhes disponibilizada água *ad libitum* e comida das 9 às 12 horas (R. Ferreira, 1999).

A composição da água está descrita no boletim nº 077/H/01 do Instituto Geológico e Mineiro apresentava as características químicas que constam na tabela 5.1:

Tabela 5.1. Composição da água (segundo o boletim do Instituto Geológico e Mineiro)

Anião	Concentração (mg dm ⁻³)	Catião	Concentração (mg dm ⁻³)
Cl ⁻	9,0 ± 0,6	Na ⁺	6,0 ± 0,2
HCO ³⁻	8,3 ± 1,2	Mg ²⁺	1,6 ± 0,2
SO ₄ ²⁻	1,2 ± 0,2	Ca ²⁺	0,6 ± 0,2
NO ₃ ⁻	1,9 ± 0,1		

Composto	Concentração (mg dm ⁻³)
SiO ₂	12,5 ± 0,8

pH	5,6 ± 0,1
----	-----------

A composição da ração dos ratos, segundo o fabricante, era a que consta na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Composição da ração dos ratos (segundo o fabricante)

Água (%)	9,000
Proteína bruta (%)	17,00
Lisina (%)	0,070
Metionina e cistina (%)	0,50
Lípidos totais (%)	3,000
Fibra bruta (%)	5,000
Cinza total (%)	5,000
Cálcio (%)	0,80
Fósforo (%)	0,65
Cloretos (%)	0,60

Ao quinto dia, após os ratos terem permanecido 21 horas em jejum, administrámos intraperitonealmente uma solução de cloreto de TBT na dose de $7,5 \times 10^2$ µg/Kg, tendo

em conta a DL₅₀: 160 – 349 mg Kg⁻¹ (*Liselotte Schebek and al. 1991*) Para além de continuarmos a controlar os parâmetro já referidos anteriormente (*quantidade de comida e volume de água ingerida, massa corporal, peso das fezes e volume de urina produzidos*), recolhemos a urina, diariamente, durante quatro dias, das 9 às 12 horas e das 12 às 9 horas do dia seguinte.

5.2.3.1. Quantificação do cloreto de TBT excretado pelos ratos

Após a recolha diária da urina de cada rato Wistar, procedemos de acordo com os pontos que se seguem:

- 1- Centrifugar a urina, de cada rato e de cada período de recolha, durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 r.p.m
- 2- Decantar, com cuidado, o sobrenadante para um copo;
- 3- Repartir toda a urina em amostras de 0,5 ml para tubos de centrífuga;
- 4- Proceder à extracção do cloreto de TBT adicionando 0,5 mL de diclorometano em cada tubo e agitar suavemente;
- 5-Centrifugar a cerca de 2600 r.p.m.;
- 6-Recolher, com o auxílio de uma micropipeta, a fase orgânica para balões de 50 mL(*um para cada rato e para cada período da recolha*);
- 7-Repetir o procedimento da extracção mais duas vezes, para cada tubo, recolhendo a fase orgânica para o respectivo balão;
- 8-Preparar nas mesmas condições o branco sem cloreto de TBT (*urina dos quatro dias anteriores à administração intraperitoneal*);

9-Colocar os balões, com a fase orgânica, no rotavapor a uma velocidade moderada e à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o resíduo sólido da fase orgânica e tendo em conta os resultados obtidos no estudo do método e na escolha do solvente para a extração, empregámos as seguintes condições de trabalho na construção da curva de calibração:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- melhor solvente para a extração do cloreto de TBT — diclorometano;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Seguidamente, a cada balão, adicionámos 10 mL da solução de acetato de amónia, mantivemo-los no ultra-som durante quinze minutos, após o que vazámos o conteúdo dos balões para copos, adicionando a cada um deles, 1500 µL da solução de triton X-100, 2 mL de água bidestilada e 150 µL da solução do fisetine.

Para os ensaios em branco, acertámos o valor do pH a 7,2 e perfizemos o volume de 15 mL com água bidestilada. De imediato, procedemos à sua leitura no fluorímetro.

Para cada amostra seguiu-se o mesmo procedimento, após a adição do fisetine.

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

O trabalho começou a decorrer com a utilização do espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite do ICAM, existente no Laboratório de Solos, localizado na Mitra com o objectivo de nos familiarizarmos com o equipamento. No entanto, a ocorrência de várias avarias neste equipamento impediram o decurso normal deste trabalho, tornando-se necessário contactar outras instituições com equipamento similar, para prosseguir o trabalho. Destes, apenas o IPIMAR, de Lisboa, se mostrou disponível para a realização do trabalho. Contudo, apesar da sua resposta afirmativa, o IPIMAR não teve disponibilidade para ir além de uma análise sumária do TBT em solução aquosa, o que inviabilizou o prosseguimento desta linha de evolução do trabalho.

Apresentamos na tabela 6.1 os resultados das análises que o IPIMAR nos enviou:

Tabela 6.1. Resultados obtidos por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite

	Conc. TBT($\mu\text{g/L}$)	Absorvância	
		1ª Réplica	2ª Réplica
Branco	—	215	—
Amostra 1	$1,8 \times 10^1$	3621	X
Amostra 2	$3,6 \times 10^1$	773	X
Amostra 3	$7,2 \times 10^1$	1265	X

X – Resultados não recebidos

A ausência de uma curva de calibração impossibilitou-nos a determinação da quantidade de cloreto de TBT extraído da urina dos ratos.

Embora desconheçamos as condições que envolveram as análises, nomeadamente se ocorreram diluições das amostras, os resultados apresentados não são coerentes, uma vez que a amostra menos concentrada é a que apresenta maior absorvância.

Assim, perante a insuficiência dos resultados, fomos levados a enveredar exclusivamente pelo método de espectrofluorimetria, no desenvolvimento final do trabalho.

6.2. FLUORIMETRIA

Em relação ao método fluorimétrico, dividimos o trabalho em três fases, em cada uma das quais apresentamos os respectivos resultados experimentais.

6.2.1. Estudo do método

Apresentamos os resultados dos estudos experimentais prévios que realizámos sobre a variação da concentração do fisetine, em solução aquosa, respectivamente $2,1875 \times 10^{-6}$; $4,375 \times 10^{-6}$; $8,75 \times 10^{-6}$; $17,5 \times 10^{-6}$ e $35,0 \times 10^{-6}$ M, feito em triplicado para valores de pH, respectivamente 6,9; 7,2 e 7,5 fazendo as leituras a duas aberturas diferentes da janela do fluorímetro 5 e 10 nm.

Para o valor de pH 6,9 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e

496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.2 e no gráfico 6.1 que se segue.

Tabela 6.2. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 6,9, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm.

Conc. de Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	8,951	10,01	11,443
4,375	16,851	15,851	14,999
8,75	35,49	38,498	39,156
17,5	69,416	67,99	66,997
35	138,88	140,51	141,01

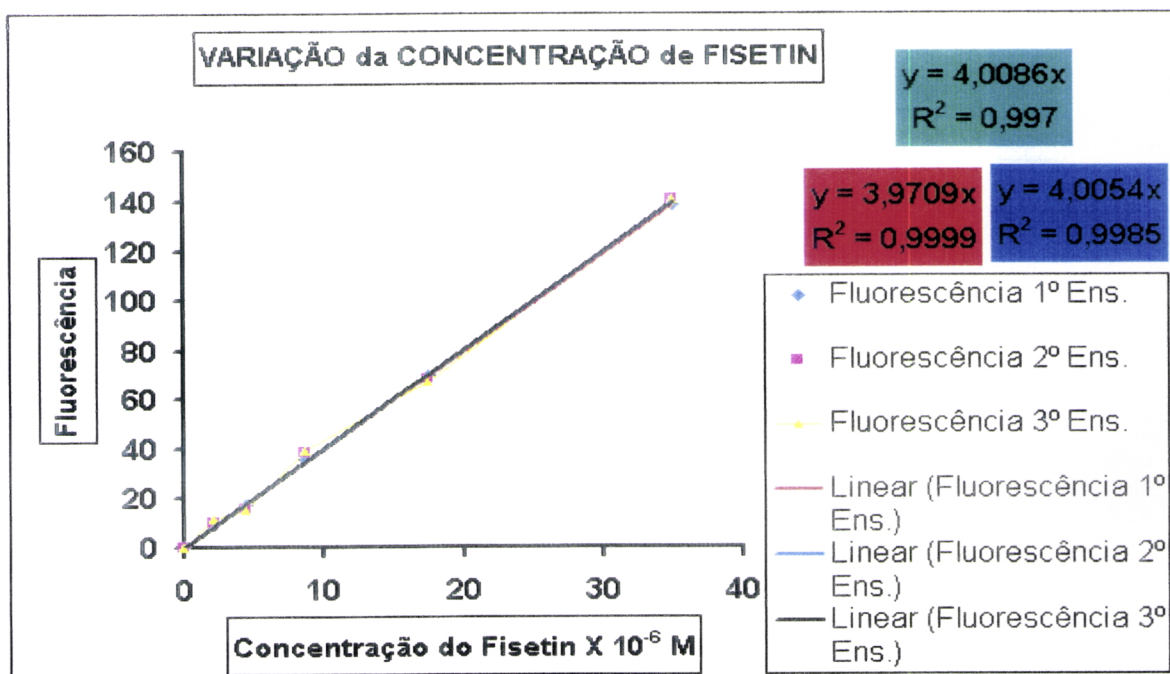


Gráfico 6.1. Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 6,9

- Verificamos que os valores da fluorescência em função da concentração do fisetine, para um valor de pH de 6,9, não diferem muito para cada um dos ensaios.

- Os coeficientes de correlação, R^2 , para cada uma das três retas que representam cada um dos ensaios, são matematicamente bastante aceitáveis, pois são em média

aproximadamente 0,999 (Cosentino, P., 1993).

- O melhor valor da concentração do fisetine para o pH de 6,9 e para a abertura 5 nm da janela do fluorímetro foi de $17,5 \times 10^{-6}$ M, uma vez que é o ponto médio comum às três rectas.

Para o valor de pH 6,9 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 10 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.3 e no gráfico 6.2 que se seguem:

Tabela 6.3. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 6,9, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm.

Conc. do Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	88,261	98,77	125,77
4,375	178,4	168,78	188,88
8,75	377,83	400,77	410,77
17,5	749,66	703,67	707,87
35	1010,7	1012,1	1012,01

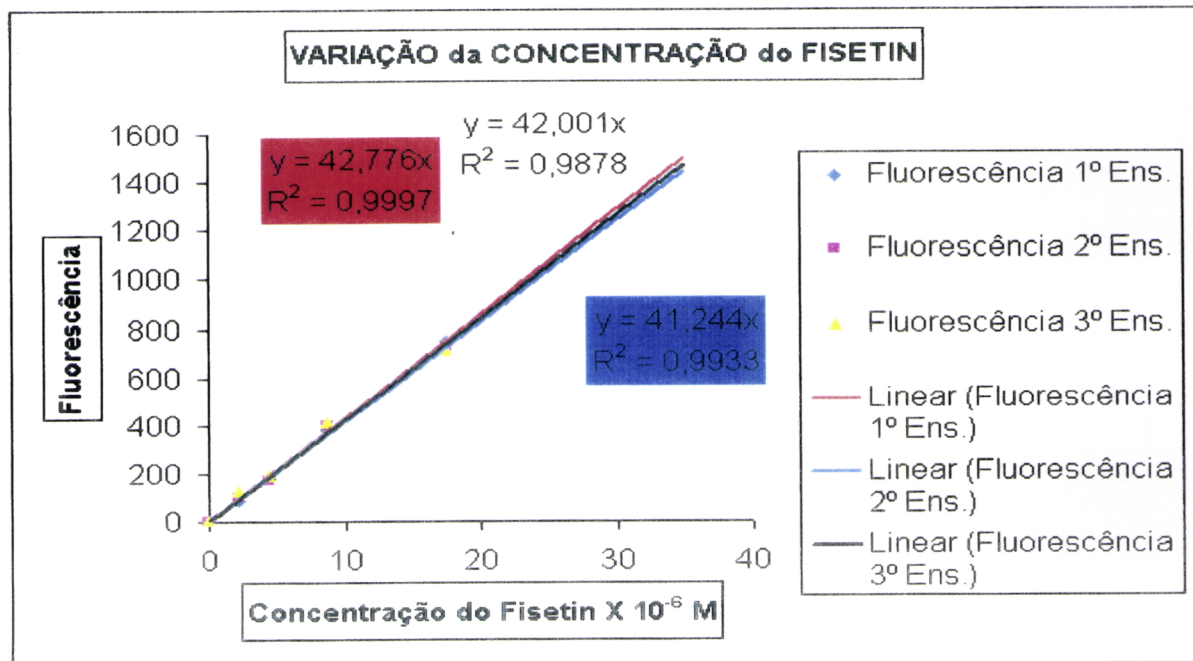


Gráfico 6.2.Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 6,9

- Como seria de esperar para a abertura 10 nm da janela do fluorímetro os valores da fluorescência foram mais elevados do que os apresentados na da tabela 6.2, abertura 5 nm

- Verificamos, ainda, através da análise do gráfico 6.2 que os coeficientes de correlação das rectas correspondentes ao segundo e terceiro ensaios são relativamente baixos, comparados com os das rectas obtidas através das leituras feitas para a abertura da janela 5 nm do fluorímetro.

- O melhor valor da concentração do fisetine para o pH 6,9 e para a abertura 10 nm da janela do fluorímetro foi de $17,5 \times 10^{-6}$ M, uma vez que foi o ponto médio comum às três rectas.

Para o valor de pH 7,2 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.4 e no gráfico 6.3 que se seguem.

Tabela 6.4. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 7,2, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm.

Conc. Do Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	22,088	24,151	21,262
4,375	33,224	32,896	34,01
8,75	68,883	66,998	70,11
17,5	128,14	130,14	135,2
35	256,64	260,12	267,02

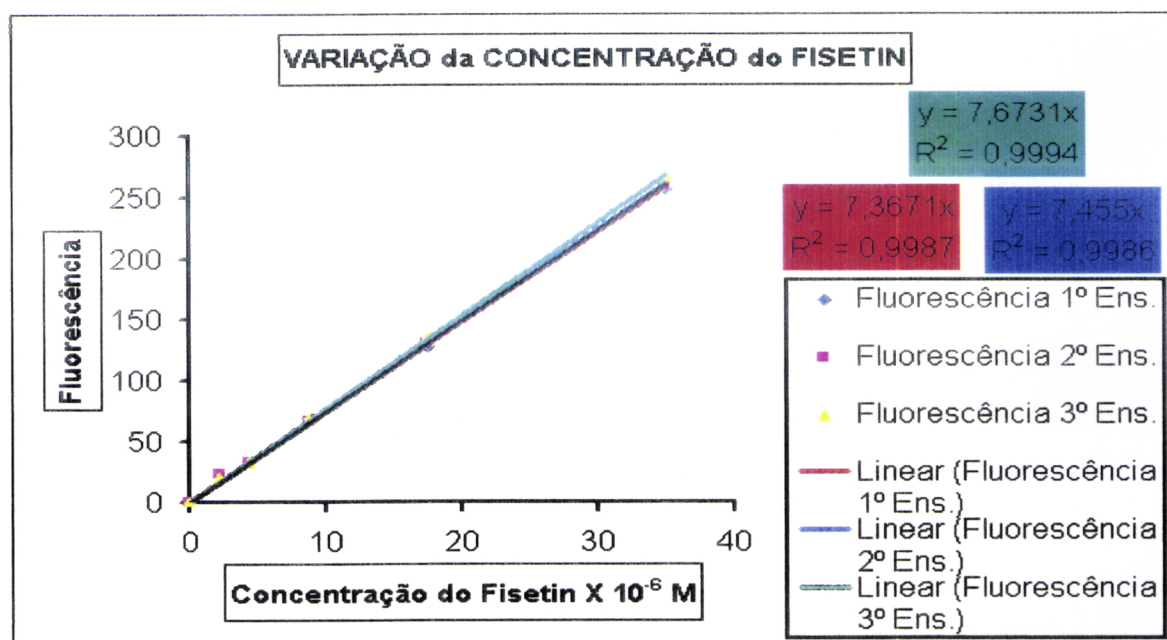


Gráfico 6.3. Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,2

- Verificamos que os valores da fluorescência em função da concentração do fisetine,

para um valor de pH 7,2, não diferem muito para cada um dos ensaios.

- Os coeficientes de correlação, R^2 , para cada uma das três rectas que representam cada um dos ensaios são matematicamente bastante aceitáveis, pois são em média aproximadamente 0,999 e mais elevados que os apresentados no gráfico 6.1 para o valor de pH 6,9 e para a mesma abertura de janela.

- O melhor valor da concentração do fisetine para o pH de 7,2 e para a abertura 5 nm da janela do fluorímetro foi de $17,5 \times 10^{-6}$ M, uma vez que foi o ponto médio comum às três rectas.

Para o valor de pH 7,2 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 10 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.5 e no gráfico 6.4 que se seguem:

Tabela 6.5. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 7,2, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm.

Conc. do Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	196,65	200,12	185,25
4,375	321,54	319,7	329,37
8,75	614,01	620,49	630,64
17,5	1004,5	1004,5	1006,7
35	1004,5	1004,4	1006,7

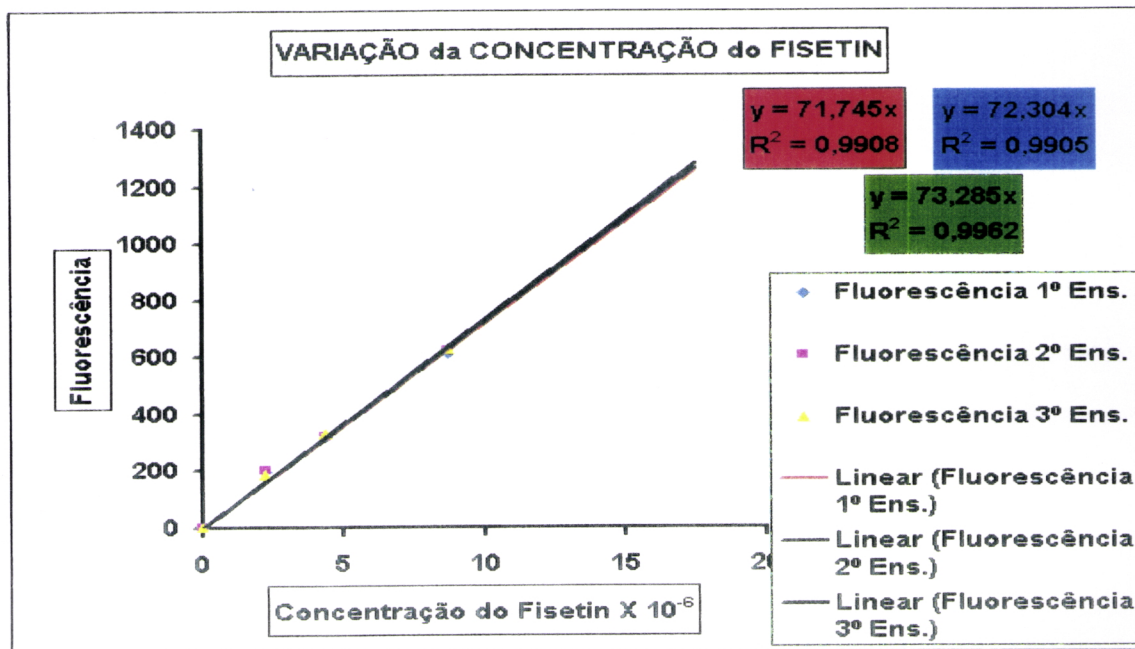


Gráfico 6.4. Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,2

- Como seria de esperar para a abertura 10 nm da janela do fluorímetro os valores da fluorescência são mais elevados do que os apresentados na tabela 6.4, abertura 5 nm

- Verificamos ainda através da análise do gráfico 6.4 que os coeficientes de correlação das rectas são relativamente baixos, comparados com os das rectas obtidas

através das leituras feitas para a abertura da janela 5 nm do fluorímetro.

- O melhor valor da concentração do fisetine para o pH 7,2 e para a abertura 10 nm da janela do fluorímetro é de $8,75 \times 10^{-6}$ M, uma vez que é o ponto médio comum às três rectas.

Para o valor de pH 7,5 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 5 nm

- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.6 e no gráfico 6.5 que se seguem:

Tabela 6.6. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 7,5, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 5 nm.

Conc. do Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	18,884	19,123	18,91
4,375	35,272	33,897	36,272
8,75	60,762	62,762	67,762
17,5	118,39	120,231	119,319
35	231,51	235,16	240,56

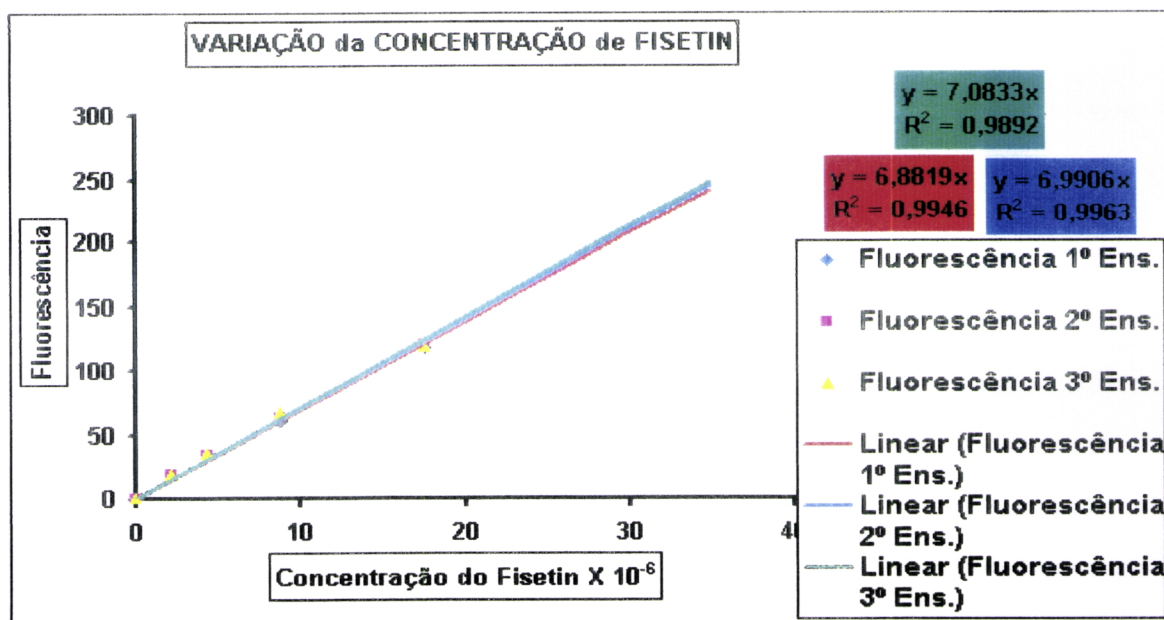


Gráfico 6.5. Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,5

- Verificamos que os valores da fluorescência em função da concentração do fisetine, para um valor de pH 7,5, não diferem muito para cada um dos ensaios.

- Os coeficientes de correlação, R^2 , para cada uma das três rectas que representam

cada um dos ensaios são mais baixos do que qualquer um dos anteriores para a mesma abertura de janela do fluorímetro, 5 nm.

- O melhor valor da concentração do fisetine para o pH de 7,5 e para a abertura 5 nm da janela do fluorímetro é de $17,5 \times 10^{-6}$ M, uma vez que é o ponto médio comum às três rectas.

Para o valor de pH 7,5 e com as seguintes condições de análise:

- leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro — 10 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

obtivemos os resultados que se mostram na tabela 6.7 e no gráfico 6.6 que se seguem:

Tabela 6.7. Resultados obtidos da variação da concentração do fisetine para o valor de pH 7,5, para os três ensaios. Leitura feita com a abertura da janela do fluorímetro de 10 nm.

Conc. do Fisetine	Fluorescência 1º Ens.	Fluorescência 2º Ens.	Fluorescência 3º Ens.
0	0	0	0
2,1875	212,07	211	212,06
4,375	430,04	427,37	428,56
8,75	758,06	760,04	761,06
17,5	1012,4	1010,4	1012,06
35	1012,4	1010,4	1012,06

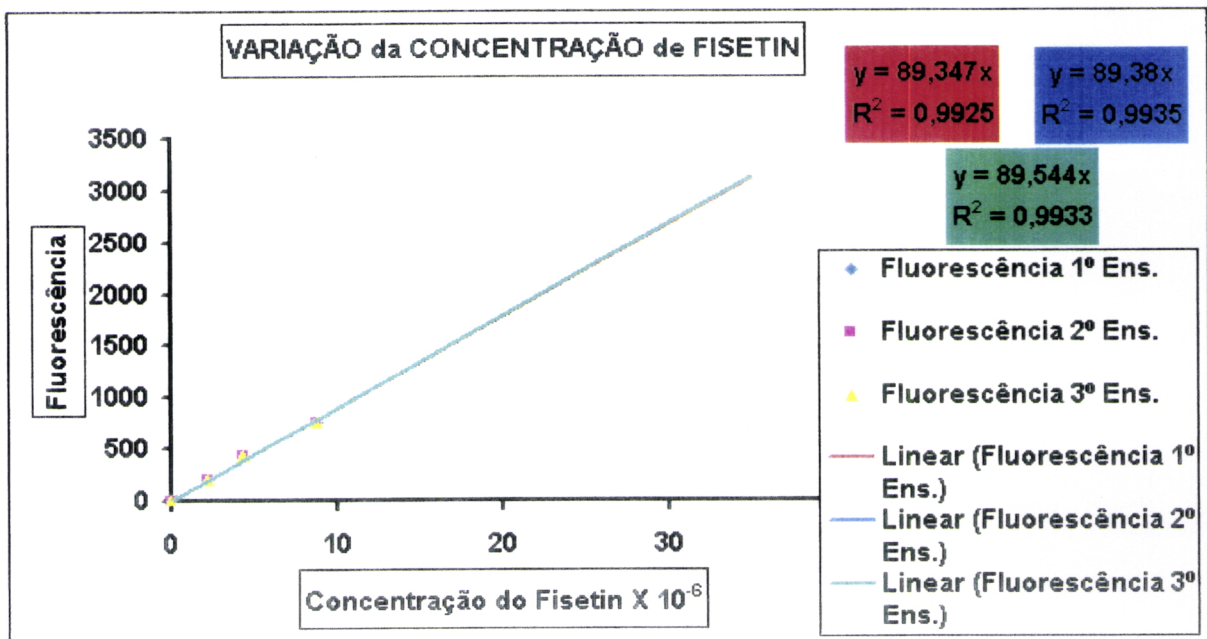


Gráfico 6.6. Mostra a variação da concentração do fisetine em função da fluorescência, para os três ensaios com o valor de pH 7,5

- Como seria de esperar para a abertura 10 nm da janela do fluorímetro os valores da fluorescência são mais elevados do que os apresentados na tabela 6.5, abertura 5 nm.

- Verificamos ainda através da análise do gráfico 6.6 que os coeficientes de correlação das rectas são relativamente baixos, comparados com os das rectas obtidas através das leituras feitas para a abertura da janela 5 nm do fluorímetro.

Os resultados obtidos mostram que as melhores condições de análise para a continuidade do trabalho são as seguintes:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm

O que está de acordo com os resultados obtidos por (R. Companó *et al.*, 1995; A. García *et al.*, 1993) para o estudo de amostras de água e sedimentos portuários.

6.2.2. Estudo *in vitro*

Começamos por apresentar os resultados que obtivemos no estudo experimental que realizámos para seleccionar um dos três solventes (*tolueno, diclorometano e metanol*) utilizados na extracção do cloreto de TBT na urina.

Em seguida, apresentamos os resultados que obtivemos quando fizemos variar a concentração do cloreto de TBT na urina respectivamente 3×10^4 , 6×10^4 , 9×10^4 , 12×10^4 e 15×10^4 $\mu\text{g/L}$, para construirmos a curva de calibração e, finalmente, os resultados obtidos no estudo de uma amostra problema.

6.2.2.1. Selecção do melhor solvente para extracção do TBT da urina

Apresentamos na tabela 6.8 da página seguinte, os resultados obtidos para os três solventes, tolueno, diclorometano e metanol utilizando a mesma concentração de cloreto TBT e fazendo três réplicas para cada solvente.

Após a extracção as leituras no fluorímetro foram feitas nas seguintes condições:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

Tabela 6.8. Resultados obtidos da análise da amostra de cloreto de TBT, extraída da urina por cada um dos solventes

Solvente	Fluorescência			Média	Desv. pad	Apr r. Res.
	1ª Replicado	2º Replicado	3º Replicado			
Tolueno	161,6 21	170,01	165,81	165,81	4,19	165,81 ± 4
Diclorometano	325,92	331,94	319,03	325,63	6,43	325,63 ± 6
Metanol	10,96	6,75	8,71	8,81	2,11	8,81 ± 2

- Podemos verificar através da análise dos resultados que o estudo que apresenta valores de fluorescência mais elevados foi obtido usando o diclorometano como solvente.

- O processo de extração com o metanol para além de ser o menos rentável, mostrou-se o mais moroso de todos, exigindo atenção e cuidados suplementares na preparação das colunas.

Os resultados mostram que dos três solventes estudados, o mais apropriado para a extração do cloreto de TBT da urina foi o diclorometano.

6.2.2.2. Construção da curva de calibração

A tabela 6.9 mostra os valores da fluorescência que obtivemos para as cinco réplicas, quando fizemos variar a concentração do cloreto de TBT na urina respectivamente 3×10^4 , 6×10^4 , 9×10^4 , 12×10^4 e 15×10^4 $\mu\text{g/L}$, tendo em vista a construção de uma curva de calibração.

As análises foram feitas nas seguintes condições:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- valor do pH de trabalho — 7,2
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- melhor solvente para a extração do cloreto de TBT — diclorometano;
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm.

por estas se terem mostrado nos ensaios anteriores como as mais adequadas, como referido nos pontos respectivos.

Tabela 6.9. Valores das leituras feitas pelo fluorímetro para a construção da curva de calibração

Amostras	Replicados	Fluorescência	Média	Desvio padrão	Ap resultados
Amostra 1	1	138,45	135,99	4,34	135,99 ± 4
	2	132,59			
	3	142,91			
	4	132,76			
	5	133,24			
Amostra 2	1	242,41	232,27	9,04	232,27 ± 9
	2	237,41			
	3	234,31			
	4	228,26			
	5	218,95			
Amostra 3	1	385,32	319,72	16,45	319,72 ± 16
	2	327,92			
	3	330,84			
	4	376,06			
	5	300,41			
Amostra 4	1	393,08	412,57	20,35	412 ± 20
	2	395,38			
	3	407,54			
	4	443,03			
	5	423,81			
Amostra 5	1	395,60	507,16	19,12	507,16 ± 19
	2	505,32			
	3	488,97			
	4	499,07			
	5	535,29			

A tabela 6.10 e o gráfico 6.7 referem-se aos valores médios das fluorescências apresentadas na tabela 6.9. Utilizámos estes valores para a construção da curva de calibração.

Tabela 6.10. Valores médios da fluorescência das cinco réplicas para cada um dos valores da concentração do cloreto de TBT nas amostras.

Conc. do TBT	Fluorescência
0	4,9419
1000	135,99 ± 4
2000	232,27 ± 9
3000	319,72 ± 16
4000	412,57 ± 20
5000	507,16 ± 19

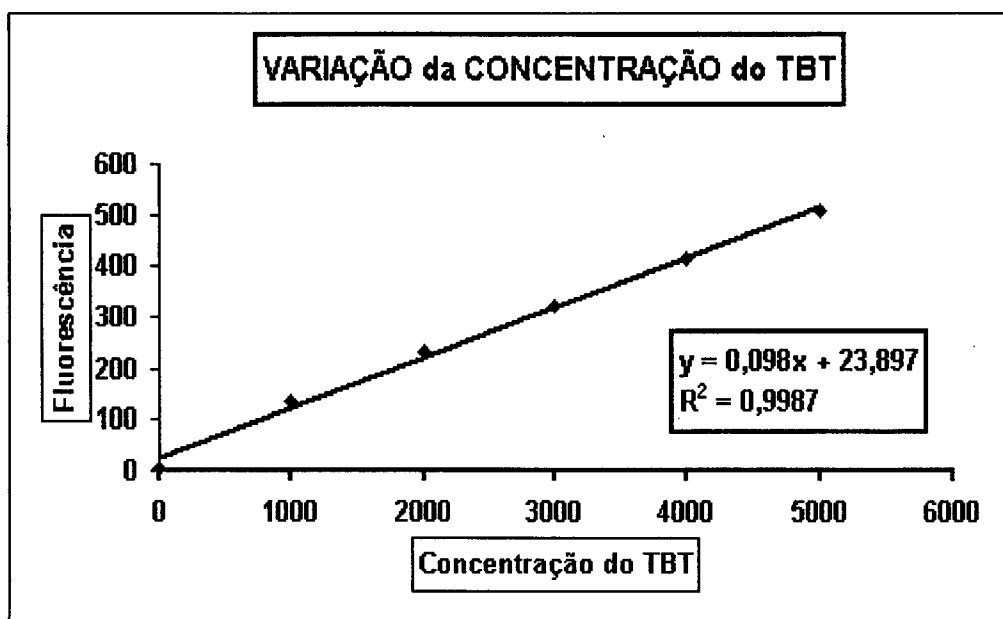


Gráfico 6.7. Curva de calibração. Mostra a variação da concentração do cloreto de TBT em função da fluorescência.

- Os valores obtidos para a fluorescência neste ensaio foram bastante homogêneos.
- O coeficiente de correlação da recta é aproximadamente de 0,999, o que matematicamente é bastante aceitável (Cosentino, P., 1993).

6.2.2.3. Análise de uma amostra problema

Seguidamente apresentamos o resultado da análise de uma amostra problema, que tinha por objectivo testar o método utilizado.

As análises foram feitas nas seguintes condições:

- concentração do fisetine (*branco e amostras*) na solução para análise — $17,5 \times 10^{-6}$ M;
- melhor solvente para a extração do cloreto de TBT — diclorometano;
- valor do pH de trabalho — 7,2;
- abertura da janela do fluorímetro — 5 nm
- comprimentos de onda de excitação e de emissão respectivamente de 409 e 496 nm

A tabela 6.11 mostra os valores que obtivemos na análise.

Tabela 6.11. Registo da fluorescência da análise da amostra (*duas leituras*) problema e da sua concentração obtida através da curva de calibração

	Fluorescência	Média	Desv padrão	Ap. resultados	Concentração
Amostra	233,71	233,7	0,01	$233,7 \pm 0,01$	$2,14 \times 10^3$
	233,69				

- O valor médio da fluorescência, na curva de calibração utilizada, corresponde a uma concentração de $2,14 \times 10^3$ µg/L de cloreto de TBT na solução problema, correspondendo a uma diferença de $\pm 5\%$ relativamente ao valor esperado. O que mostra que o método pode ser aplicado com algum rigor.

6.2.3. Estudo *in vivo*

6.2.3.1. Quantificação do cloreto de TBT excretado pelo organismo dos ratos

Nesta fase do trabalho apresentamos em primeiro lugar, na tabela 6.12, os valores dos resultados da análise feita à urina dos ratos, após a extracção do cloreto de TBT pelo diclorometano. Seguidamente, apresentamos nas tabelas 6.13, 6.14 e 6.15, em anexo 1, 2 e 3, os registos do controlo da quantidade de comida e o volume de água ingerida, assim como a massa corporal, o peso das fezes e o volume de urina produzidos, durante os oito dias, de cada um dos três ratos Wistar.

Tabela 6.12. Registo da fluorescência (*duas leituras de cada amostra*) do cloreto de TBT extraído e da sua concentração da urina de cada um dos ratos analisados

	Perí. recolha	Fluoresc.	Média	Dev pad	Ap resultados	Conc parcial	Conc. total
Rato 1		134,36					1416 µg/L
	9 às 12 horas	135,72	135,04	0,96	135,04 ± 1	226,822 µg/L	
		140,87					
	12 às 9 horas	139,96	140,41	0,64	140,41 ± 0,6	1188,908µg/L	
Rato 2		84,891					1126 µg/L
	9 às 12 horas	83,78	84,34	0,79	84,34 ± 0,8	123,353µg/L	
		122,25					
	12 às 9 horas	122,01	122,13	0,17	122,13 ± 0,2	1002,378µg/L	
Rato 3		135,73					1576 µg/L
	9 às 12 horas	134,51	135,12	0,86	135,12 ± 0,9	226,986µg/L	
		156,96					
	12 às 9 horas	156,09	156,53	0,62	156,09 ± 0,6	1348,908µg/L	

- Os valores médios das fluorescências, na curva de calibração utilizada, corresponde a uma concentração de 1416 µg/L, 1126 µg/L e 1576 µg/L de cloreto de TBT extraído da urina, respectivamente, dos ratos 1,2 e 3 durante 4 dias,

correspondendo a uma diferença de $\pm 93\%$ relativamente ao valor que administrámos intraperitonealmente.

- O rato 1 eliminou aproximadamente 21 μg (*15 mL de volume final de solução para análise*) de cloreto de TBT nos 4 dias de ensaio.

- O rato 2 eliminou aproximadamente 17 μg (*15 mL de volume final de solução para análise*) de cloreto de TBT nos quatro dias de ensaio.

- O rato 3 eliminou aproximadamente 24 μg (*15 mL de volume final de solução para análise*) de cloreto de TBT nos quatro dias de ensaio.

- Os ratos Wistar eliminaram aproximadamente 7% do cloreto de TBT que lhe administrámos intraperitonealmente na urina, durante quatro dias de ensaio.

7. CONCLUSÕES

Ao longo do trabalho, verificámos que o metanol tinha uma grande influência nas análises em fluorimetria, pelo que tentámos utilizá-lo o menos possível como solvente (R. Companó *et al.*, 1995). Além disso, através do resultado das análises, verificámos que não havia deterioração das soluções, desde que devidamente guardadas no frigorífico ou no congelador, como foi referido num capítulo anteriormente.

Os resultados obtidos mostram que:

- a abertura 5 nm da janela do fluorímetro, o valor do pH de trabalho 7,2 e a concentração do fisetine de $17,5 \times 10^{-6}$ M na solução para análise foram os mais adequados para a análise do cloreto de TBT, extraído da urina de rato Wistar.
- que o diclorometano foi o solvente mais adequado para a extracção do cloreto de TBT da urina.
- que o método pode ser aplicado ao estudo de eliminação urinária do TBT em rato Wistar quando administrado na dose diária de $1,9 \times 10^2$ µg/Kg durante quatro dias e que a quantidade de comida e água ingeridas e o peso as fezes e o volume de urina produzidos parecem não ter influenciado os resultados!

8. BIBLIOGRAFIA

Atkins, P. W. (1982) *Physical Chemistry*, W. H. Freeman, San Francisco.

Boiteau, H. L., C. Metayer (1978) Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans les milieux biologique par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction, *Analisis*, **6**, 350-358.

Brankley, A. Henson, K. C. Thompson (1991) "Waters, Sewage and Effluents" in *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Clarck, E. A., Sterritt R. M., Lester J. N., (1988) The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment, *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 600-604.

Clark, A. Elizabeth, Robert M. Sterritt, John n : Lester (1988) The fafe of tributyltin in the aquatic environment, *Environ. Sci. Technol*, **22**, 600-604.

Compañó, R., M. Granados, C. Leal, M. D. Prat (1995) Liquid chromatographic determination of triphenyltin and tributyltin using fluorimetric detection, *Analytica Chimica Acta*, **314**, 175-182.

Delves, H., I. L. Shuttler (1991) "Elemental analysis of body fluids and tissues by Electrothermal atomisation and Atomic Absorption Spectrometry" in *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Dowson, P. H., J. M. Bubb, J. N. Lester (1992) Organotin Distribution in Sediments and Waters of Selected East Coast Estuaries in the UK, *Marine Pollution Bulletin*, **24**, 492-498.

Ewing, G. W. (1987) Instrumental Methods of Chemical Analysis, 3^a Edition, McGraw-Hill International Edition, London.

Farnsworth, Marie, Joseph Pekola (1958) Determination of tin in Inorganic and Organic Compounds and Mixtures, *Analytical Chemist*, **31**, 410-414.

Fent, Karl (1991) Occurrence of organotins in Municipal Wastewater and Sewage Sludge and Behavior in a Treatment Plant, *Envir. Sci. Technol.*, **25**, 489-493.

Ferreira, R. M. Alves (1999) Tese de Doutorado, Universidade de Évora

Fytianos K., V. Samanidou (1989) Determination of Trace Quantities of Organotin Compounds in Coastal Waters of Greece by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *The Science of the Total Environment*, **92**, 265-268.

Goncalves, M. L. S. S. (1983) Métodos Instrumentais para Análise de Soluções, 1^a Edição, Fundação Caloust Gulbenkian, Lisboa

Guimont, J. A. Bouchard, . Pichrtte (1976) Le Dosage de L'étain dans les Sediments Par Spectrophotometrie D'Absorption Atomique, *Talanta*, **23**, 62-64.

Hasan, Mohammad Ali, Hasan A. Juma (1992) *Marine Pollution Bulletin*, **24**, 408-410.

Haswell, S. J. (1991) "Instrumental requirements and optimisation ", in Atomic Absorption Spectrometry, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Hocquellet, P. N. Labeyrie (1975) Étude de L'atomization Thermo-électrique sur Carbure de Tantale du silicium, du germanium, de l'étain et du plomb — Application à la Spectrométrie d'absorption atomique, *Analisis*, **3**, 505-512.

Huggett, Robert J., Michael A. Unger, P. F. Seligman, Aldis O. V. (1992) The Marine Biocide Tributyltin, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 232-237.

Kirkbright, G. F. (1975) “Analytical Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy” in Atomic Absorption Spectrometry, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Marr, L. (1975) “Instrumentation for Spectroscopy” in Wilson & Wilson's, Comprehensive Analytical Chemistry, Ed. by G. Svehla, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Marr, L., Jamil Anwar (1982) Micro- determination of Tin in Organotin Compounds by Flame-emission and Atomic-absorption Spectrophotometry , *Analyst*, **107**, 208-268.

Nogueira, J. M. F., B. Simplicio, M. H. Florêncio, ^a M. M. Bettencourt, (1999) Tributilo estanho: Um inimigo ambiental, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, **72**, 20-27.

North, M. R. (1991) “The Analysis of non-ferrous metals by Atomic Absorption Spectrometry”, in Atomic Absorption Spectrometry, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Quevauviller, h., F.martin, O. F. X. Donard (1993) Survey of Butyltin contamination in Portuguese Coastal Environments, *Environmental Pollution*, **82**, 57-62.

Quevauviller, Philippe (1989) Organo-tins in Sediments and Mussels from the Sado Estuarine System (Portugal), *Environmental Pollution*, **57**, 149-166.

Real, L. C., (1994) Tintas Marítimas: Protecção de Embarcações, *Engenho*, **41**, 15-19.

Rossi, G. (1992) "From L'Vov's Grafite furnace to background correction by means of the Zeeman effect: general consideration" in Applications of Zeeman Graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, Ed. by C. Minoia, S. Caroli, Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, Oxford

Russell, John B. (1994) Química Geral, 2ª Edição, McGraw-Hill Ltda, São Paulo.

Sarradin, P. M., Lapaquellerie Y., Astruc A., Latouche C., Astruc M., (1995) Long Term Behaviour and Degradation Kinetics of Tributyltin in Marina Sediment, *The Science of Total Environment*, **170**, 59-70.

Skoog, Douglas, James J. Leary (1995) Análisis Instrumental, 4ª Edición, McGraw-Hill, Madrid

Spiegel, Murray R. (1994) Estatística, 3ª Edição, McGraw-Hill Ltda, São Paulo.

Tong, S. L., F. Y. Pang, S. M. Phang, H. C. Lai (1995) Tributyltin Distribution in Coastal Environment of Peninsular Malaysia, *Environmental Pollution*, **91**, 209-216.

Trachman, Helen L., Albert J. Tyberg, Patrick D. B. (1991) Atomic Absorption Spectrometric Determination of Sub-Part-per-Million Quantities of Tin in Extracts and Biological Materials with a Graphite Furnace, *Analytical Chemistry*, **49**, 1090-1093

Tyson, J. F. (1991) "Basic Principles", in Atomic Absorption Spectrometry, Ed. by S. J. Haswell, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Varna, A. (1984) Handbook of Atomic Absorption Analysis vol. I, II, CRC Press Corporation, Boca Raton

Welz, B. (1985) Atomic Absorption Spectrometry, VCH, Weinheim.

9. ANEXOS

Anexo 1

A tabela que se segue, refere-se aos registos dos parâmetros, anteriormente referidos, durante os oito dias que o Wistar 1 permaneceu na gaiola de metabólica

Tabela 6.13.Registo do controlo do Wistar 1

Dias Parâmetros	1°	2°	3°	4° *	5°	6°	7°	8°
Peso do animal	484,0 g	472,0 g	468,0 g	460,0 g	466,0 g	443,0 g	442,0 g	442,0 g
Quant comida inger	3,5 g	8,5 g	8,4 g	4,3 g	2,2 g	7,5 g	8,9 g	—
Vol. água ingerida	40,0 mL	25,0 mL	25,0 mL	20,0 mL	25,0 mL	30,0 mL	30,0 mL	30,0 mL
Peso das fezes	5,72 g	2,59 g	2,79 g	4,22 g	0,00 g	2,60 g	3,53 g	7,20 g
Volume de Urina 9 às 12 h	—	—	—	0,0 mL	0,9 mL	1,25 mL	1,0 mL	—
Volume de Urina de Urina 12 às 9 h	31,0 mL	11,5 mL	3,8 mL	7,0 mL	7,6 mL	20,0 mL	7,5 mL	6,6 mL

* Administração intraperitoneal na dose de $7,5 \times 10^2 \mu\text{g/Kg}$, da solução de cloreto de TBT

Anexo 2

A tabela que se segue, refere-se aos registos dos parâmetros, anteriormente referidos, durante os oito dias que o Wistar 2 permaneceu na gaiola de metabólica.

Tabela 6.14.Registo do controlo do Wistar 2

Dias Parâmetros	1°	2°	3°	4° *	5°	6°	7°	8°
Peso do animal	445,0 g	438,0 g	430,0 g	427,0 g	421,0 g	408,0	403,0 g	402,0 g
Quant comida inger	4,3 g	7,2 g	11,0 g	4,2 g	0,16 g	4,95 g	7,55 g	—
Vol. água ingerida	65,0 mL	45,0 mL	40,0 mL	35,0 mL	20,0 mL	25,0 mL	30,0 mL	30,0 mL
Peso das fezes	3,36 g	2,47 g	4,72 g	6,22 g	0,00 g	2,71 g	3,41 g	5,35 g
Volume de Urina	—	—	—	0,0 mL	0,5 mL	1,00 mL	0,25 mL	—
9 às 12 h Volum. de Urina 12 às 9 h	58,0 mL	26,5 mL	21,5 mL	15,0 mL	12 mL	13,0 mL	10,5 mL	9,0 mL

* Administração intraperitoneal na dose de $7,5 \times 10^2 \mu\text{g/Kg}$, da solução de cloreto de TBT

Wistar 3

Anexo 3

A tabela que se segue, refere-se aos registos dos parâmetros, anteriormente referidos, durante os oito dias que o Wistar 3 permaneceu na gaiola de metabólica.

Tabela 6.15.Registo do controlo do Wistar 3

Dias Parâmetros	1°	2°	3°	4° *	5°	6°	7°	8°
Peso do animal	483,0 g	476,0 g	473,0 g	472,0 g	476,0 g	454,0 g	450,0 g	454,0 g
Quant comida inger	9,0 g	13,5 g	14,6 g	7,8 g	0,8 g	11,5 g	15,0 g	—
Vol. água ingerida	65,0 mL	45,0 ml	40,0 mL	40,0 mL	25,0 mL	35,0 mL	40,0 mL	45,0 mL
Peso das fezes	5,91 g	5,36 mL	7,75 g	8,70 g	0,00	2,87 g	7,42 g	5,71 g
Volume de Urina	—	—	—	0,0 mL	2,0 mL	1,25 mL	1,25 mL	—
Volum. de Urina 9 às 12 h	—	—	—	—	—	—	—	—
Volum. de Urina 12 às 9 h	58,0 mL	21,0 mL	13,0 mL	19,5 mL	9,0 mL	22,0 mL	15,0 mL	12,0 mL

* Administração intraperitoneal na dose de $7,5 \times 10^2 \mu\text{g/Kg}$, da solução de cloreto de TBT

Anexo 4

Cálculos para a determinação do cloreto de TBT extraído da urina dos ratos, através da curva de calibração.

Para o Wistar 1

Recolha das 9-12 horas

A equação da recta de calibração é:

$$Y = 0,098 x + 23,897$$

Substituindo o valor da fluorescência na equação da recta obtemos $Y = 1134,112$

Dividindo o valor de y por 5 (quociente entre o número de horas de recolha de cada período (*das 12-9 horas e das 9-12 horas*), obtemos:

$$Z_1 = 226,822 \mu\text{g/L}$$

Para o Wistar 2

Recolha das 9-12 horas

A equação da recta de calibração é:

$$Y = 0,098 x + 23,897$$

Substituindo o valor da fluorescência na equação da recta obtemos $Y=616,765$

Dividindo o valor de y por 5 (quociente entre o número de horas de recolha de cada período (das 12-9 horas e das 9-12 horas), obtemos:

$$Z_2 = 123,353 \mu\text{g/L}$$

Para o Wistar 3

Recolha das 9-12 horas

A equação da recta de calibração é:

$$Y = 0,098 x + 23,897$$

Substituindo o valor da fluorescência na equação da recta obtemos $Y=1134,929$

Dividindo o valor de y por 5 (quociente entre o número de horas de recolha de cada período (das 12-9 horas e das 9-12 horas), obtemos:

$$Z_2 = 226,986 \mu\text{g/L}$$

Repetindo o mesmo raciocínio para o período 12-9 horas obtemos:

Rato 1	$Y = 1193,602$
Rato 2	$Y = 1003,602$
Rato 3	$Y = 1357,786$

Não se divide o valor de Y por 5 como anteriormente

Wistar 1

$$1188,908 + 226,822 \approx 1416 \mu\text{g/L}$$

$\approx 21 \mu\text{g}$ de cloreto de TBT eliminado

Wistar 2

$$1002,378 + 123,383 \approx 1126 \mu\text{g/L}$$

$\approx 17 \mu\text{g}$ de cloreto de TBT eliminado

Wistar 3

$$1348,908 + 226,986 \approx 1576 \mu\text{g/L}$$

$\approx 24 \mu\text{g}$ de cloreto de TBT eliminado

Tendo em conta o que injectamos por animal podemos afirmar que foram eliminados aproximadamente $21 \mu\text{g}$ por animal, correspondendo a cerca de 7% de cloreto de TBT eliminado na urina em quatro dias de ensaio.