

1. Introdução

1.1 A hidroxiapatita e a importância da determinação da razão Ca/P em seus estudos

Pertencente à família das apatitas, a hidroxiapatita é o principal constituinte inorgânico dos tecidos calcificados, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes, com grande interesse biológico, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna um substituto do osso humano em implantes e próteses [1,2,3].

É um mineral que ocorre raramente na natureza, sendo constituinte de algumas rochas ígneas, metamórficas e, especialmente, sedimentares. A hidroxiapatita pode ser obtida a partir de esqueletos de algumas espécies marinhas, por transformações de materiais naturais (como nos esqueletos minerais dos corais e equinodermos), ou pode ser sintetizada artificialmente [4,5].

Estudos indicam que as propriedades das hidroxiapatitas são fortemente dependentes de sua estequiometria, que controla a sua estrutura cristalina, a reatividade de sua superfície e seu comportamento biológico. Assim, a razão molar Ca/P é uma das formas utilizadas para caracterizar a composição dos diferentes fosfatos de cálcio, embora exista uma enorme dificuldade no controle desta razão quando da obtenção de hidroxiapatitas sintéticas, já que este parâmetro depende das condições empregadas na etapa de síntese e processamento. A tabela 1 mostra valores desta razão em diferentes fosfatos de cálcio, a qual varia de 0,5 a 2,0. A hidroxiapatita estequiométrica, com fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão molar Ca/P=1,67, apresenta razões m/m de 39,9% (Ca); 18,5% (P) e 3,38% (OH), sendo o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos, com composição semelhante à da hidroxiapatita biológica. [6,7]

A hidroxiapatita pode ser processada por reações no estado sólido ou por via úmida. Quando preparada em sistemas aquosos pelos métodos de precipitação ou hidrólise, a hidroxiapatita obtida é geralmente, ou deficiente em cálcio, isto é, a proporção molar Ca/P é menor do que o valor estequiométrico de 1,67, provavelmente devido à falta de controle do pH do meio, ou contém

carbonato em sua constituição, tornando-a uma hidroxiapatita com proporção molar superior a 1,67. Para se obter hidroxiapatita pura e estequiométrica, são empregadas reações no estado sólido, que requerem altas temperaturas e longos períodos de tratamento térmico [8]. A principal diferença entre as apatitas biológicas e a hidroxiapatita obtida sinteticamente é exatamente o conteúdo de carbonato, que é muito menor na segunda [9]. A hidroxiapatita formada nos tecidos biológicos ou em processos de laboratório pode incorporar uma variedade de impurezas e raramente se apresenta na forma estequiométrica pura [8].

A hidroxiapatita possui aplicação em diversas áreas, não se restringindo apenas à área biomédica. Na área ambiental, ela vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos clorados poluentes, provenientes da indústria metalúrgica e da incineração de lixo industrial, apresentando alta capacidade de remover metais pesados, não só de águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais. Ela é importante também nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, entre outras [10]. Vale notar que a hidroxiapatita é um dos minerais de ocorrência natural explorado para o fornecimento de fósforo para as indústrias químicas e de fertilizantes [11].

Estes exemplos dão uma ideia do amplo e diversificado campo de aplicações da hidroxiapatita. Embora seja encontrada na natureza, o domínio da sua síntese se faz necessário, para dar ao material obtido as características desejadas para as diferentes aplicações tecnológicas, sendo importante, portanto, sua caracterização estrutural e elementar.

Dentre as técnicas mais utilizadas de caracterização estrutural da hidroxiapatita, destacam-se as de difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, análise térmica, adsorção gasosa, entre outras [12].

Na análise elementar, os teores de cálcio e fósforo podem ser determinados pelas mais diversas técnicas analíticas, incluindo espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, análise instrumental por ativação com nêutrons, espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva, entre outras. Para calcular o teor de cálcio, usam-se majoritariamente as técnicas de AAS, ICP OES e ED-XRF, sendo o teor de fósforo normalmente obtido por meio de ICP OES ou espectrofotometria de UV-Vis. [2,13].

Tabela 1 – Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio [14]

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,50
Fosfato tricálcico ($\alpha, \alpha', \beta, \gamma$)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio	CaHPO_4	1,00
Pirofosfato de cálcio	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato heptacálcico	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,70
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50
Metafosfato de cálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,50

Tabela 2 – Métodos utilizados na determinação da razão Ca/P em hidroxiapatitas

Amostra	Razão Ca/P	Técnica empregada	Referência
Hap crescida sobre superfície de celulose*	1,89	ICP- MS	[15]
Osso cortical da crista íliaca humana**	2,21 ± 0,29	INAA	[16]
Osso cortical do fêmur humano**	2,17 ± 0,31	INAA	[17]
Pó de Hap*	1,62 ± 0,13	XRF	[18]
Pó comercial de Hap	1,56 ± 0,01		
Dente decíduo humano:** dentina	2,14	ED-XRF	[19]
esmalte	2,12		
cárie	2,00		
Hidroxiapatita sintetizada por:* precipitação	2,04	ICP OES	[20]
processo sol-gel	2,17		
Hap**	1,93 - 1,95 ± 0,02	EDX	[21]
Pó de Hap*	1,49 – 1,80	ICP OES	[22]
Fêmur de rato**		AES	[23]
• Fêmea 5 meses	2,06 ± 0,16		
14 meses	1,99 ± 0,07		
• Macho 5 meses	2,09 ± 0,16		
14 meses	2,02 ± 0,09		
Nanocristais de Hap*	1,71	Ca → Titulação com EDTA P → UV-Vis	[24]
Hap adsorvente*	1,5 ± 0,1	ICP OES	[25]
Hap*	1,68 ± 0,07	Ca → AAS	[1]
Hap calcinada	1,73 ± 0,07	P → ICP-MS	
Tecido dental de interesse arqueológico:** Dentina	2,14 - 2,24	ICP-DRC-MS	[26]
Esmalte	1,91 - 2,07		

Amostra	Razão Ca/P	Técnica empregada	Referência
Hap catalisada*	1,40 - 1,50	XPS	[27]
Osso cortical**	2,27 ± 0,06 2,23 ± 0,06	ICP OES EDX	[30]
Osso trabecular	2,26 ± 0,05	EDX	
Hap*	1,49 - 1,64	ICP OES	[28]
Hap calcinada*	1,47 - 1,75	ICP OES	[29]
Pó de Hap*	1,62 ± 0,13	ICP OES	[31]
Pó comercial de Hap	1,56 ± 0,01		
Nanocristais de Hap*	1,67	Ca → Titulação com EDTA P → UV-Vis	[32]
Pó de osso bovino calcinado**	1,92 2,23	EDS XRF	[33]
Hap pura**	1,67	ICP OES	[34]
Hap dopada com Zn	1,59 - 1,66		
Dentina de boi**		ED-XRF	[35]
Normal	1,95 - 1,98		
Tratada	1,90 - 2,25		
Hap deficiente em cálcio*	1,58 - 1,66	Ca → AAS P → UV-Vis	[36]

(*) razão molar ; (**) razão mássica

1.2

Métodos utilizados na determinação da razão Ca/P e suas limitações

A tabela 2 apresenta alguns procedimentos de determinação da razão Ca/P em hidroxiapatitas encontrados na literatura. Segue-se uma rápida discussão de alguns deles.

- A)** A espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (ED-XRF), também abreviada como EDX ou EDS, é uma técnica que permite a análise qualitativa e quantitativa dos elementos inorgânicos presentes em uma amostra. A XRF é um método semi-quantitativo, baseado na medida da intensidade (número de fótons coletados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando devidamente excitada, necessitando o uso de padrões primários e, em alguns casos, de padrões secundários para quantificar, por interpolação, os teores composicionais em uma determinada amostra. Em geral não é necessária a preparação química prévia da amostra, sendo uma técnica analítica não destrutiva, cujos resultados podem ser obtidos em tempo real. Entretanto, há de se considerar os efeitos de matriz [19].
- B)** A análise instrumental por ativação com nêutrons (INAA) é uma técnica analítica que permite a determinação de vários elementos presentes num determinado tipo de amostra, mais adequada para a análise de elementos traços, por sua grande sensibilidade. Ela tem alta especificidade, boa seletividade, capacidade de determinar vários elementos em baixas concentrações, da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, além de alta precisão e exatidão. Entretanto, podem ocorrer interferências espectrais, havendo o risco de exposição do analista à radiação, além da necessidade da utilização de um reator nuclear de pesquisa e a não identificação da forma química do elemento [37].
- C)** A espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) é uma técnica muito usada na investigação da composição química de superfícies. É uma técnica não destrutiva, sensível a praticamente todos os elementos e fornece informação sobre a natureza química da ligação. É adequada para superfícies, mas não tanto para a amostra como um todo.

- D)** A espectroscopia de elétrons auger (AES) é uma das técnicas mais difundidas em estudos de superfícies. Ela tem alta resolução espacial e sensibilidade de superfície. Entretanto, seus resultados não são de interpretação simples, pois juntamente com os elétrons auger, são emitidos elétrons secundários, que atuam como ruído na análise.
- E)** A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma técnica baseada na medida da intensidade da radiação emitida, quando um átomo ou íon excitado pelo plasma retorna ao seu estado fundamental. Ela tem caráter multielementar, o que torna a técnica rápida, amplo intervalo dinâmico e elevadas precisão e exatidão. Entretanto, os limites de detecção para a maioria dos analitos não são melhores do que os obtidos por AAS e deve-se considerar possíveis interferências espectrais e o alto consumo de argônio durante as análises [38].
- F)** A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica baseada na separação e posterior contagem de íons formados pela amostra quando introduzida em um plasma de argônio. Ela tem caráter multielementar, é altamente sensível, tem ampla faixa dinâmica, alta eficiência de ionização e baixíssimos limites de detecção. Há que se considerar, porém, a possibilidade de interferências espectrais, a limitada ionização de elementos com elevada energia de ionização e a necessidade de baixo conteúdo relativo de sólidos no aerossol introduzido.
- A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado equipado com célula de reação (ICP-DRC-MS) diferencia-se do ICP-MS convencional por apresentar uma célula de reação/colisão (DRC) que atenua as interferências espectrais, removendo os íons poliatômicos.
- G)** A titulação complexométrica com EDTA é empregada para íons metálicos que reagem com o EDTA, formando um quelato, e o ponto de equivalência é determinado por um indicador ou por um método instrumental apropriado. Ela tem altas exatidão e precisão e baixo custo, entretanto, necessita de grande massa de amostra, por sua menor sensibilidade, além de um longo tempo de análise. No caso das hidroxiapatitas, é adequada apenas para a determinação do cálcio.

- H)** A espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis) consiste na absorção de radiação ultravioleta ou visível por uma espécie molecular, resultando na excitação eletrônica e posterior relaxação. É aplicada na determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorvedores, com boas exatidão e precisão, e baixo custo. Entretanto, tem sensibilidade apenas regular e, no caso, é adequada apenas para a determinação do fósforo.
- I)** A espectrometria de absorção atômica é uma técnica analítica que utiliza o fenômeno de absorção de radiação de frequência específica por átomos livres no estado gasoso para medir a concentração de analito em uma dada amostra. Ela tem boa especificidade, é simples e acessível. Porém, é uma técnica monoelementar e apresenta dificuldades na determinação de fósforo.

1.3

Alguns aspectos relevantes para o presente trabalho relativos à determinação de cálcio e fósforo por espectrometria atômica

1.3.1

Absorção atômica com fonte contínua

A espectrometria de absorção atômica é hoje uma técnica bastante difundida e empregada para a determinação de elementos traço nos mais diversos tipos de amostras, devido à sua sensibilidade e seletividade [39]. Os primeiros espectrômetros de absorção atômica, desenvolvidos na segunda metade do século XX, utilizavam a chama como atomizador, sendo esta montagem ainda hoje fabricada e largamente utilizada em análises, devido à sua robustez, precisão, rapidez e baixo custo de aquisição e manutenção. O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica com chama envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos livres de um determinado elemento no estado fundamental gasoso, num comprimento de onda específico, sendo que a quantificação da radiação absorvida baseia-se na medida dessa atenuação (absorvância), que é proporcional à densidade do elemento no caminho ótico.

Os instrumentos de AAS com fontes de linha (LS AAS) são os mais usados até hoje, com todas as suas vantagens e limitações. Entre as várias limitações referentes à LS AAS, a maior delas consiste no fato da absorção ser medida apenas em intervalos espectrais consideravelmente estreitos, correspondentes à largura da linha atômica emitida pela fonte de radiação, o que restringe consideravelmente a informação disponível sobre o ambiente espectral da medida. Outra limitação importante é o fato da medida de absorção na linha analítica ser causada não somente por átomos, mas também por moléculas (que eventualmente podem absorver a radiação) e por partículas (que espalham a radiação) provenientes de outros constituintes presentes na matriz da amostra, dando origem ao chamado fundo, e daí a necessidade de sistemas corretores de fundo associados a estes equipamentos. Os corretores contínuos ou baseados no efeito Zeeman são os mais comuns, embora apresentem também limitações [40,41]. Outras limitações inerentes à técnica de LS AAS podem ser citadas, tais como intervalo linear relativamente estreito das curvas de calibração, apenas de duas a três ordens de magnitude de concentração, a possibilidade de se determinar apenas um elemento por vez, o que torna o processo relativamente

lento se o intuito é a determinação de um grande número de elementos em uma mesma amostra, além da necessidade de uma coleção de lâmpadas (uma para cada elemento), algumas, como é o caso do P, com energia e vidas úteis bem limitadas.

A fim de aprimorar o método, contornado algumas dessas desvantagens, um novo conceito foi desenvolvido para a espectrometria de absorção atômica, usando como fonte de radiação uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade, operando em modo *hot spot*, cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm, um monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (Doublé-Echelle Monochromator) e um detector com arranjo linear com dispositivos de carga acoplada (CCD) [42].

Com essa nova configuração, foi possível obter uma técnica robusta com diversas vantagens, entre elas a melhora na razão sinal/ruído, devido à elevada intensidade de emissão da fonte contínua, resultando em melhores precisão e limites de detecção e também a possibilidade de se usar linhas secundárias, sem comprometimentos ou perdas de precisão, reduzindo ou eliminando a necessidade de diluição da amostra. Essas linhas secundárias são normalmente pouco intensas quando se utilizam lâmpadas monoelementares (HCL e EDL). Outra vantagem inerente a esse novo conceito instrumental consiste no fato de que a região espectral na vizinhança da linha analítica torna-se visível, permitindo obter mais informações a respeito de interferências espectrais, sendo possível, dessa forma, a correção do fundo, seja ele resultante de um fundo contínuo, de um espectro de excitação eletrônica com estrutura fina rotacional, ou de um elemento concomitante. A correção é inerente à própria tomada da medida, ou seja, não há diferenciação no tempo entre a medida de absorção do analito e do fundo. E também, o detector de arranjo de carga acoplada permite uma correção simultânea real da radiação de fundo nas proximidades da linha analítica e o software tem a capacidade de armazenar espectros de referência, por ex, de absorção de fundo causada por moléculas com estrutura fina, e a subsequente identificação e subtração deste do espectro de uma amostra, usando-se um algoritmo dos mínimos quadrados, fazendo assim a correção de fundos estruturados [39,43,44].

No caso do interesse do presente trabalho, a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) apresenta boa seletividade, rapidez, baixo custo operacional e uma boa sensibilidade para o cálcio, que pode ser facilmente determinado por essa técnica, seja por um equipamento de fonte de linhas ou por HR-CS AAS.

Já o fósforo não é um elemento tipicamente determinado por AAS, pois suas linhas de ressonância estão situadas em 167,16 nm e 178,77 nm, no ultravioleta de vácuo, onde ocorre forte absorção por moléculas de oxigênio ou vapor de água, não sendo acessíveis em espectrômetros de absorção atômica convencionais. Alternativamente, o dublete não ressonante em 213,5 - 213,6 nm é usado para análise, porém a sensibilidade é bem mais baixa e fortemente dependente da temperatura do atomizador, pois se trata de uma transição que parte de um estado excitado [45,46,47,48].

Embora os equipamentos de HR-CS AAS também não possam operar no UV-vácuo, estes apresentam vantagens potenciais sobre a LS AAS na determinação de P, visto que a intensidade da fonte continua é maior, existindo também a possibilidade do uso de bandas moleculares de PO para as medidas de absorção. Como a energia da transição eletrônica da molécula de PO se encontra na mesma faixa espectral do dublete não ressonante do fósforo, é possível a observação simultânea das absorções atômica e molecular, possibilitando insights sobre a eficiência de atomização do elemento.

1.3.2

Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tem se destacado devido à capacidade da realização de análise multielementar e à determinação em uma ampla faixa de concentrações dos elementos em uma mesma amostra.

O plasma é um gás (geralmente Ar) parcialmente ionizado, que é formado quando uma centelha gerada por uma descarga elétrica (TESLA) desloca um elétron de um átomo de argônio. Esse elétron, por sua vez, é acelerado por um campo eletromagnético perpendicular ao sentido do fluxo do gás do plasma, iniciando uma reação em cadeia, deslocando elétrons de outros átomos de argônio. O átomo de Ar possui um potencial de ionização relativamente elevado (aproximadamente 15 eV) sendo capaz de ionizar grande parte dos elementos da tabela periódica [49].

O instrumento de ICP OES constitui-se, basicamente, de um gerador de radiofrequência (RF), um sistema para introdução da amostra, uma tocha, um sistema de gás argônio, um sistema óptico para a detecção do sinal analítico e um sistema computacional para controle do equipamento.

O gerador de radiofrequência é um dispositivo elétrico empregado como fonte de potência, responsável pela sustentação do plasma, cuja frequência usada em plasma de argônio é de 27 ou 40 MHz, enquanto a potência pode variar de 800 a 1500 W. O sistema para introdução da amostra é composto, em geral, por um nebulizador e uma câmara de nebulização. A solução da amostra é bombeada para o nebulizador por uma bomba peristáltica através de um tubo capilar (flexível) e conduzida ao plasma através da câmara de nebulização, a qual favorece a introdução apenas das gotas de menor volume. A tocha é um dispositivo onde se forma o plasma, sendo constituída por três tubos concêntricos de quartzo, com entradas independentes, por onde fluem as linhas de argônio principal, auxiliar e nebulizador. O argônio principal é introduzido tangencialmente na parte externa do plasma e é responsável pela manutenção do mesmo: o gás auxiliar é introduzido na seção intermediária e tem a função de dar um formato adequado ao plasma, mantendo-o na ponta da tocha e evitando assim que a mesma sofra processo de fusão; o gás do sistema nebulizador é introduzido na parte central da tocha e serve para transportar, por arraste, o aerossol da amostra para dentro do plasma [50].

O sistema óptico é a parte mais complexa do espectrômetro e vem sendo aprimorado, juntamente com os sistemas de detecção, desde a década de 70, quando foram instalados os primeiros equipamentos de ICP OES. Existem dois tipos de sistemas: um para medidas sequenciais do sinal e outro para medidas simultâneas, e a observação do sinal pode ser realizada de duas formas: na configuração radial ou axial da tocha. Além disso, alguns instrumentos combinam as duas configurações em um só aparelho, melhorando a versatilidade da técnica, pois o operador tem a vantagem de escolher a configuração apropriada para o tipo de amostra em questão, sem a despesa de dois equipamentos separados [49,50].

Na configuração radial, o eixo óptico está disposto de maneira ortogonal em relação ao canal central do plasma e apenas uma parcela da radiação é focalizada [51,52]. Já na configuração axial, o eixo óptico é coincidente com o canal central do plasma, logo a emissão da radiação do analito que atinge a fenda de entrada do espectrômetro percorre um caminho óptico maior em relação à configuração radial, obtendo-se, em geral, maiores sensibilidades e melhores limites de detecção. Porém, nessa configuração, interferências devido à auto-absorção e à recombinação são mais frequentes. Na década de 70, as medidas empregando-se a configuração axial apresentavam baixa aceitação, devido à questão das interferências espectrais, apesar do significativo ganho em

sensibilidade alcançado. Posteriormente, nos instrumentos comercialmente disponíveis, os problemas associados a fenômenos de auto-absorção foram minimizados, devido à remoção da extremidade fria do plasma, que reduz os efeitos de matriz decorrentes da presença dos elementos facilmente ionizáveis na amostra, aumentando a faixa linear de calibração. Dentre as vantagens já mencionadas da configuração axial frente ao arranjo radial, a elevada sensibilidade pode ser citada como vantagem primordial. O plasma com configuração axial possui uma limitação quanto à sua capacidade de manipular amostras com alto teor de sólidos dissolvidos e pode não ser adequado quando a matriz da amostra é complexa [53].

Contudo, o desempenho analítico das configurações radial e axial pode variar com o tipo de amostra e com os elementos a serem determinados, sendo desejável avaliar experimentalmente a configuração mais adequada, de acordo com os objetivos da análise.

1.4

Aspectos metrológicos das medidas em espectrometria atômica

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição, pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência, através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição [54]. A rastreabilidade metrológica é um parâmetro fundamental para os resultados de medição, pois garante a comparabilidade de resultados obtidos em diferentes lugares e por diferentes técnicas ou metodologias. Isso permite, de fato, avaliações inequívocas sobre a qualidade dos resultados obtidos.

Os Materiais de Referência Certificados (MRC) têm suas propriedades certificadas por métodos dotados das melhores características metrológicas, seguindo uma sistemática rigorosa que garante a rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades (SI) dos valores de propriedades certificados. Os MRC são, para a metrologia química, o meio mais objetivo de se obter rastreabilidade das medições, servindo tanto para a elaboração de curvas de calibração, quanto para o controle de qualidade analítico. Eles são o elo entre a análise realizada em laboratório e o SI. Entretanto, não há MRCs disponíveis para todos os analitos em todas as matrizes e, na maioria dos casos, os químicos analíticos não podem contar com esta ferramenta para o estabelecimento da rastreabilidade de suas análises.

A incerteza é um parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) [54]. Para estimar a incerteza de medição, é necessário identificar as fontes que contribuem para a variabilidade dos resultados e quantificá-las. Basicamente, as fontes de incerteza em metrologia química podem ser provenientes de definições incompletas do mensurando, da amostragem, de efeitos de matriz e interferências, das pesagens e volumetrias, de procedimentos de medição, etc. [55]. Uma vez identificadas as fontes de incerteza e consideradas suas contribuições, o próximo passo é a combinação destas fontes para a obtenção da incerteza padrão combinada (μ_c). Esta representa o desvio padrão total associado à medição, de acordo com o nível de confiança desejado e com o número de graus de liberdade efetivos. Calcula-se, então, o fator de abrangência (k) e multiplicando-se este último pela incerteza padrão combinada, obtém-se a incerteza expandida (U).

Para a determinação da razão Ca/P em hidroxiapatita, não existem MRCs disponíveis, logo, o estabelecimento da cadeia de rastreabilidade não pode ser alcançado de forma direta. A utilização de padrões monoelementares rastreáveis para a determinação de cálcio e fósforo é uma possibilidade, entretanto, para a utilização desta abordagem seria necessária uma solução de fósforo com concentração na faixa de 10000 mg L^{-1} e a mesma não estava disponível no laboratório no período de realização deste trabalho. A estimativa de incerteza para a razão Ca/P é importante para o estabelecimento de um limite de confiança com o qual esta razão pode ser expressa. É comum observar na literatura resultados com 5 ou 6 algarismos significativos e incertezas baseadas apenas no desvio padrão instrumental. Esta prática induz a uma ideia de precisão e confiabilidade distorcidas, uma vez que estas medições não apresentam nem rastreabilidade nem uma estimativa de incerteza apropriada que permita a observação da real variabilidade dos resultados possíveis por estas técnicas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral a realização de um estudo metrológico para a determinação da razão molar Ca/P em hidroxiapatitas, utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

1.5.2 Objetivos específicos

1. Otimizar os parâmetros instrumentais associados à determinação de cálcio e fósforo por HR CS AAS, a saber, vazão de acetileno, taxa de aspiração e altura do queimador;
2. Otimizar, em HR-CS AAS, os parâmetros instrumentais número de pixels e tempo de integração, para os mesmos elementos, nas condições ótimas definidas no item anterior;
3. Otimizar, na determinação de cálcio e fósforo por ICP OES, os parâmetros instrumentais taxa de aspiração, potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização;
4. Avaliar, metrologicamente, as metodologias otimizadas e comparar mediante a análise de amostras produzidas no Laboratório de Biomateriais do CBPF, os resultados lá obtidos com aqueles do presente trabalho.