

1 Introdução

Na década de 60, Rosenberg e colaboradores investigaram o efeito da aplicação de campo elétrico no crescimento de bactérias *Escherichia coli* e, para isso, utilizaram eletrodos de platina, pois não acreditavam que este metal influenciaria na cultura destas bactérias. Eles notaram a formação de longos filamentos bacterianos, que cresciam rapidamente, chegando a atingir um comprimento até 300 vezes maior que o normal, horas depois do campo elétrico ter sido desligado. Apesar deste crescimento, Rosenberg observou a inibição do processo de divisão celular, ou seja, o crescimento se dava sem que houvesse multiplicação do número de células. Quatro anos mais tarde, este mesmo grupo de pesquisadores publicou um artigo, definindo derivados de platina como uma nova classe de agentes antitumorais¹. Após muitos estudos, Rosenberg e colaboradores concluíram que a principal substância que inibia a divisão celular da bactéria *Escherichia coli*, sem impedir o crescimento das células, era a cisplatina (Figura 1). Curiosamente, a cisplatina tinha sido preparada pela primeira vez um século antes dos experimentos de Rosenberg.

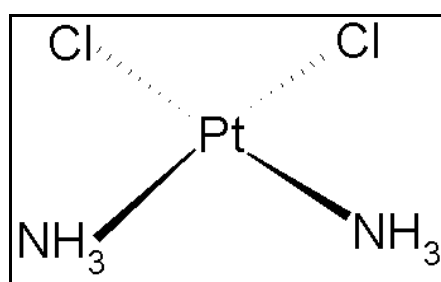


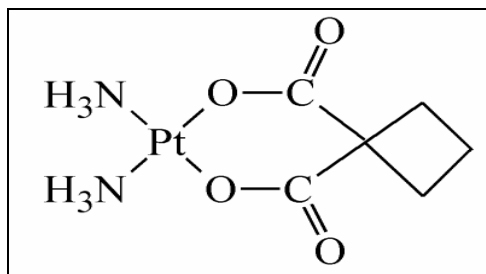
Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina³.

Em 1977, Einhorn e Donahue descreveram o uso de drogas à base de platina no tratamento de pacientes com câncer testicular. Neste estudo, 80% dos pacientes atingiram remissão completa e 20% uma remissão parcial². No ano seguinte, a cisplatina foi oficialmente aprovada para o uso clínico pela FDA (Food and Drug Administration).

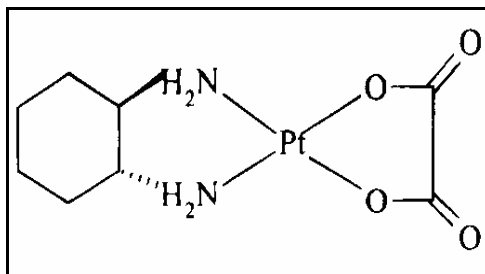
Atualmente, a cisplatina é uma das drogas antitumorais de maior utilização no mundo, possuindo efetividade no tratamento de câncer testicular e ovariano e

contribuindo para o tratamento de outros tantos tipos de tumores malignos como carcinoma orofaríngeo, carcinoma cervical, linfoma, osteocarcinoma, melanoma e neuroblastoma. Apesar de sua larga utilização, a quimioterapia com cisplatina possui desvantagens que incluem nefrotoxicidade e neurotoxicidade, além de alguns tumores apresentarem resistência natural à droga³.

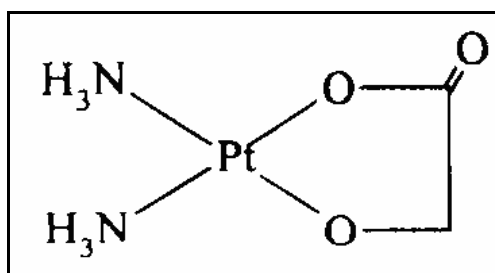
Desde então, diferentes substâncias análogas da cisplatina têm sido sintetizadas e testadas experimentalmente, para a verificação e estudo de sua citotoxicidade e potencial uso para o tratamento clínico com células tumorais, originando uma grande diversidade de novas substâncias, algumas das quais estão mostradas na Figura 2.



(a)



(b)



(c)

Figura 2. Fórmula estrutural dos análogos de platina de 2ª geração: carboplatina (a), oxaliplatina (b) e nedaplatina (c). Fonte: WONG e GIANDOMENICO (1999).

A busca por novos derivados de platina tem como objetivo o desenvolvimento de novas drogas que tenham sucesso no tratamento de tumores resistentes à cisplatina, a diminuição dos efeitos colaterais no tratamento quimioterápico, e a possibilidade de administração das doses medicamentosas por via oral, o que possibilitaria menor desconforto para o paciente durante a quimioterapia^{3,5,6}. O acúmulo no organismo, distribuição e biotransformação desses derivados de platina são determinantes no comportamento fisiológico dessas drogas. Assim, a determinação exata de baixos níveis de platina em amostras clínicas é um pré-requisito para o entendimento da fármaco-cinética, da farmacodinâmica e metabolismo desses derivados de platina, e a determinação confiável da concentração de platina nessas amostras pode desempenhar um grande papel no acompanhamento do tratamento e no desenvolvimento de novas drogas. Ao mesmo tempo que derivados de platina apresentam-se como quimioterápicos no tratamento de certos tumores, outros de seus compostos apresentam-se tóxicos, e até cancerígenos, e daí a necessidade de avaliação da exposição humana a estas espécies, seja ela ocupacional ou ambiental. Isto implica também na avaliação e identificação de indicadores biológicos, e na necessidade de métodos analíticos simples, rápidos, acessíveis e confiáveis para o monitoramento de platina em amostras de fluidos e tecidos humanos.

1.1. Monitoramento Biológico

Em 1984 um acordo entre o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Comunidade Econômica Européia (CEE) definiu o conceito de Monitoramento Biológico como a “medição e quantificação de substâncias químicas, ou de seus metabólitos, em tecidos, fluidos, secreções, excreções, ar expirado ou em quaisquer combinações, conduzidas para avaliar exposições e riscos à saúde, comparadas a uma referência apropriada”⁷. O monitoramento biológico tem como principal objetivo prevenir a exposição excessiva aos agentes tóxicos, evitando efeitos nocivos, agudos ou crônicos. O monitoramento possibilita a detecção de alterações precoces no sistema biológico e, em consequência, a atuação imediata quando os efeitos ainda são reversíveis⁸.

Em se tratando de monitoramento biológico referente à exposição à platina, vêm sendo observados graves efeitos na saúde de pessoas que trabalham na mineração, refino ou processamento industrial de derivados de platina. Da mesma forma, pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com derivados de platina, bem como funcionários que administram essas drogas, estão expostos a altas concentrações de platina. Logo, são necessários métodos analíticos adequados para o monitoramento de platina em amostras clínicas, apropriados para as diferentes substâncias contendo o metal. Este monitoramento pode ser efetuado através da análise de amostras não invasivas, por exemplo, urina, cabelo ou saliva, ou invasivas, como sangue ou tecidos advindos de biopsias. A escolha do procedimento analítico para a determinação da platina depende tanto do tipo de amostra em questão, como da faixa de concentração esperada.

1.1.1. Análise de urina: monitoramento biológico

A determinação de platina em urina tem sido utilizada em vários estudos relativos à exposição ocupacional, tendo sido encontradas concentrações altas desse metal resultantes de exposição. Com relação ao uso de medicamentos, a quantidade de metal absorvida pelo organismo depende da intensidade de exposição e do metabolismo, no corpo humano, da substância na qual a platina está presente. Conhecer a relação entre efeito-dosagem e dose-resposta é

fundamental para se estimar riscos, pois a concentração crítica de platina varia entre os indivíduos.

Em comparação com outros tipos de amostras, a manipulação e o armazenamento de amostras clínicas, feitos previamente à pré-tratamento e análise instrumental, são extremamente críticos, podendo influenciar sobremaneira o resultado analítico final. Nos fluidos biológicos, por exemplo, os metais não se encontram apenas como simples íons hidratados em solução, e deve-se considerar o complicado equilíbrio com ligantes monodentados, a cinética de seus complexos em solução aquosa e a existência de diferentes estados de oxidação, aspectos estes todos tipicamente associados a derivados de platina. Embora tanto a concentração em urina quanto em sangue forneçam uma avaliação da exposição à platina, a urina apresenta as vantagens de mais fácil amostragem e estocagem, além de exigir menor esforço no pré-tratamento⁵.

Entretanto, como qualquer outro procedimento laboratorial, a análise de urina necessita ser cuidadosamente realizada e apropriadamente controlada, utilizando procedimentos padronizados de coleta, armazenamento e análise. A coleta da urina produzida em um período de 24 horas pode permitir o cálculo da taxa de excreção de um elemento ou substância e ser relacionada com a exposição ou com a quantidade absorvida pelo organismo. A concentração de metal na urina pode ser normalizada pela densidade ou pela concentração de creatinina na amostra, uma vez que as concentrações podem variar com o volume de urina excretado. Em relação à coleta, a urina deve ser colhida em recipiente descartável, sendo geralmente utilizados frascos de polietileno. O recipiente deve apresentar boca larga, para facilitar a coleta da urina por paciente de ambos os sexos. Este deve ser corretamente identificado com etiqueta, cuja aderência resista ao processo de refrigeração⁹.

Após a coleta, as amostras de urina devem ser apropriadamente armazenadas até a análise. Dificilmente consegue-se obter uma urina livre de bactérias; assim, a refrigeração (1-4 °C) ou o congelamento das amostras é importante, uma vez que reduz o crescimento bacteriano, responsável pelo favorecimento de formação de precipitado que dificulta a análise. A formação de precipitados, na forma de uratos e fosfatos, pode provocar a remoção de íons metálicos por adsorção, oclusão ou inclusão. A amostra pode ser ainda esterilizada pela utilização de uma pequena quantidade de bactericidas químicos, como azida de sódio ou ácido nítrico e clorídrico (1% v/v), que previnem o crescimento bacteriano⁹. Entretanto, em contrapartida, a adição de preservantes pode levar à contaminação da amostra, especialmente no caso da

análise de traços ou subtraços. Daí, as substâncias utilizadas como bactericidas devem ter pureza adequada. Se ainda assim perceptível, esta contaminação, pode ser compensada por um branco contendo o preservante na mesma concentração que a amostra. Mas, deve se ter em conta que, ainda que o branco compense esta contaminação, o empobrecimento do limite de detecção estará sempre presente.

Poucos são os estudos existentes relativos à estabilidade da platina em solução. Foi relatado que amostras de urina, contendo platina na faixa de concentração de 50 a 150 ng mL⁻¹ podem ficar à temperatura ambiente por até 8 horas, sem apresentar qualquer variação significativa no seu valor de concentração¹⁰. Algumas drogas derivadas de platina podem manter-se estáveis por até 14 dias em solução aquosa, à temperatura ambiente^{11,12} mas, se expostas à luz fluorescente, a concentração de cisplatina diminui 50% em 24 horas¹³.

1.2.

Pré-tratamento de amostra: determinação de platina em amostras clínicas

Muitas técnicas instrumentais modernas requerem, previamente à análise, a dissolução completa das amostras¹⁴. Logo, o pré-tratamento das amostras é uma etapa importante na determinação de platina em amostras clínicas. A escolha do método de dissolução depende da faixa de concentração do analito a ser determinado, e da natureza e da quantidade de amostra disponível. O pré-tratamento da amostra pode ser efetuado por uma simples diluição, desproteinação, extração ácida, digestão por via úmida ou via seca ou por extração em fase sólida (SPE), entre outros.

No caso de fluidos biológicos contendo altas concentrações de platina, geralmente uma simples diluição da amostra com solução de ácido nítrico 1-2% v/v é suficiente, diminuindo a concentração de sólidos dissolvidos ao nível necessário. Em alguns casos, no entanto, a digestão da amostra é necessária. Messerschmidt *et al.*¹⁵ realizaram a decomposição de sangue, plasma e urina com ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido perclórico em um digestor de alta pressão (DAP), com um aumento gradual da temperatura até 320°C, para posterior detecção por voltametria adsortiva. Já a mineralização da amostra por via seca, a 500 °C por 24h, seguida da dissolução do resíduo com água régia ou ácido nítrico, foi utilizada na determinação de platina em soro e urina por GF

AAS (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)¹⁶. Em relação à digestão por via úmida, são citados o tratamento de amostras biológicas com ácido nítrico concentrado, seguido de aquecimento até fervura com peróxido de hidrogênio 3% por 3-5min¹⁶ ou ainda o tratamento com ácido perclórico¹⁷, com posterior detecção por GF AAS e ICP MS (espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado). Já a digestão com aquecimento por microondas foi usada para mineralizar amostras biológicas, previamente à determinação de platina por ICP OES (espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado)¹⁸ e ICP MS¹⁹.

1.3.

Técnicas instrumentais utilizadas na determinação de platina total em amostras biológicas

A literatura revela grande variedade de técnicas instrumentais utilizadas para quantificar platina em diferente tipo de matrizes. A escolha da técnica se justifica, freqüentemente, pelos níveis de concentração do analito na amostra, disponibilidade de equipamento e custo das determinações.

Métodos imunoquímicos ou eletroanalíticos, como por exemplo, os métodos voltamétricos, têm sido utilizados na análise de vários tipos de amostras em laboratórios clínicos. Já para a determinação de platina, destacam-se como favoritas as técnicas de espectrometria atômica: espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP MS), e espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A análise por ativação por nêutrons (NAA) e a análise por ativação radioquímica de nêutrons (RNAA) também tem sido utilizadas. Outras técnicas espectrométricas, tais como a espectrometria de fluorescência atômica induzida por laser e espectrometria de fluorescência por raios-X, também têm sido utilizadas em determinações de Pt em amostras clínicas²⁰.

1.3.1.

Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP MS)

O ICP MS é uma das ferramentas analíticas mais poderosas para a determinação de metais traço em diversos tipos de amostra. Desta forma, ela vem sendo utilizada para a quantificação de traços ou ultra traços de platina em amostras clínicas, como urina, sangue, plasma, plasma ultrafiltrado, soro, DNA e tecido animal. A técnica de ICP MS é altamente sensível, exata e relativamente rápida na sua aplicação. No entanto, uma das principais limitações são as interferências espectrais e a necessidade de baixo conteúdo de sólidos nas amostras.

A determinação direta de Pt em fluidos biológicos por ICP-MS é possível, mas problemática, já que a grande quantidade de sólidos dissolvidos nessas amostras pode causar problemas no nebulizador e na tocha. Por exemplo, amostras de urina têm sido centrifugadas para remover os sedimentos antes da diluição²⁰. Mais ainda, métodos de digestão por via úmida com aquecimento convencional²¹, por microondas²², ou fotólise com ultravioleta^{22, 23, 24} foram sugeridos como procedimentos preparatórios para amostras de fluidos e tecido biológicos.

A determinação de Pt, após o tratamento com drogas à base deste metal, é uma importante aplicação da análise por ICP MS em fases clínicas (fase I e fase II) ou estudos farmacocinéticos^{25,26}. O ICP MS vem sendo utilizado na investigação de interações de drogas à base de platina com o DNA e outras biomoléculas²⁷. A técnica tem sido aplicada também em estudos farmacocinéticos de longo prazo de drogas à base de platina²⁸. Cassetta *et al.*²⁹ determinaram platina em soro e líquido cérebro-espinhal de pacientes tratados com cisplatina por ICP MS e os resultados apresentaram boa concordância com os obtidos por GF AAS. Bettinelli³⁰ determinou Pt em fluidos biológicos de pacientes tratados com drogas à base de platina por ICP MS. Os limites de quantificação encontrados para o plasma, plasma ultrafiltrado e urina foram de 1,0; 0,1 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

1.3.2.

Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

ICP OES tem sido utilizado na determinação de platina em amostras clínicas. No entanto, estudos recentes têm alertado quanto à baixa sensibilidade e grande volume de amostra requerido por esta técnica. De qualquer modo, trata-se de uma técnica poderosa e popular para a análise de amostras clínicas em geral.

Miname *et al.*³¹ verificaram que o cádmio causa interferência no sinal de platina na análise de vértebras de animais e fígado. Em amostras clínicas contendo cádmio, a platina não pôde ser determinada por ICP OES. Moratizzoni *et al.*³² determinaram, com sucesso, quantidades mínimas de platina por ICP OES no plasma de pacientes com câncer de pulmão e submetidos ao tratamento radioterápico e baixas doses de cisplatina. Um aumento na sensibilidade foi relatado por DiNoto *et al.*¹⁸ na determinação de Pt por ICP OES em plasma, após digestão ácida, quando foi empregado o nebulizador ultra-sônico no lugar do nebulizador pneumático convencional.

1.3.3.

Ativação por Nêutrons (NAA)

A NAA é uma ferramenta apropriada para a determinação de traços de platina em amostras clínicas. Devido ao fato do procedimento em NAA envolver os núcleos e não os elétrons, a platina pode ser determinada independentemente do seu estado físico ou químico. Este método pode ter limites de detecção inferiores a partes por trilhão. No entanto, algumas limitações, tais como disponibilidade de fontes de nêutrons, interferência espectral, métodos de preparação de amostras trabalhosos, alto custo e preocupações com a segurança, tornam a NAA uma técnica difícil de ser aplicada em análises de rotina.

Um método por NAA usando Au¹⁹⁹ foi empregado para determinação de platina em três materiais de referência certificados (músculo e fígado bovinos e rim suíno), sendo que apenas o fígado bovino continha níveis de platina acima do limite de detecção (2 ng g⁻¹)³³. Os níveis de platina em tecido neural de ratos, macacos e pacientes humanos tratados com cisplatina foram quantificados por NAA³³⁻³⁵, mas nenhuma relação entre a dose administrada e a concentração de

platina foi encontrada³³. Zeisler *et al.*³⁶ utilizaram NAA para estabelecer o valor da linha de base e o tempo de permanência de platina em amostras de fígado e sangue humanos, com limites de detecção em nível de nanomol e subnanomol, respectivamente.

1.3.4. Voltametria Adsorptiva (AV)

A voltametria adsorptiva é um método bastante sensível para a determinação de Pt em amostras clínicas. Antes da década de 80, as técnicas de espectrometria atômica não eram sensíveis o suficiente para determinar platina em amostras de sangue, urina, cabelo e fezes humanos³⁷. Naquela época, os métodos polarográficos eram a melhor opção para a análise de amostras contendo platina ao nível do $\mu\text{g L}^{-1}$ ^{109,110}. No entanto, recentemente, a combinação de DAP (digestão em alta pressão) com a voltametria adsorptiva possibilitaram a detecção de platina em amostras clínicas em níveis de pg L^{-1} ¹⁷, sendo, portanto tão sensível quanto o ICP MS.

Para minimizar a interferência da matriz orgânica, que pode facilmente ocorrer nos eletrodos, as técnicas de redissolução normalmente exigem a decomposição completa da amostra clínica. A digestão por via seca de amostras de sangue e urina em mufla¹⁷, a digestão ácida em vaso fechado³⁸ e a fotólise com radiação ultravioleta de amostras de sangue³⁹, estão entre os métodos de preparação de amostra. Interessante observar que o método eletroquímico demonstrou maior sensibilidade que a determinação instrumental por ICP MS, após a digestão por microondas⁴⁰, enquanto Messerschmidt *et al.*⁴¹ desenvolveram um método de determinação de Pt em amostras de urina por AV e encontraram limites de detecção $0,2 \text{ ng L}^{-1}$. Assim, a voltametria adsorptiva tem sido amplamente sugerida para a determinação de platina em amostras de sangue e urina^{10,17,39,41,42,43}.

1.3.5. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica é uma das técnicas espectrométricas mais utilizadas na determinação de metais traço em amostras biológicas⁵⁴, e esta técnica, certamente, vem sendo aplicada na determinação de platina em amostras clínicas. A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) não é sensível o bastante para a determinação direta de baixos níveis de platina comumente associados a estas amostras. Por outro lado, a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), devido à sua alta sensibilidade e baixos limites de detecção, é especialmente adequada para análise de amostras clínicas.

Desde a proposta inicial de Alan Walsh, há cinco décadas, até os dias de hoje, a espectrometria de absorção atômica, quer seja com atomização por chama ou atomização eletrotérmica, obteve avanços instrumentais significativos, que tornaram a técnica mais sensível e robusta. Algumas dos mais importantes avanços ocorridos ao longo do desenvolvimento da técnica de forno de grafite, no que diz respeito à minimização de interferências, são: os tubos de grafite revestidos com grafite pirolítico, com plataforma e aquecimento transversal, que permitem uma melhor isotermicidade na etapa de atomização; a correção de fundo baseada no efeito Zeeman, que possui vantagens como correção do fundo exatamente na mesma linha de leitura do sinal atômico, além de usar somente uma fonte de radiação, não necessitando, por isso, de alinhamento, diferentemente do que ocorre com o corretor contínuo; os detectores com resposta rápida, para se obter o sinal integrado verdadeiro; utilização de modificadores químicos, geralmente um sal inorgânico, fazendo com que a matriz possa ser destruída em temperaturas mais elevadas sem a perda do analito, permitindo maior simplificação da matriz. Estas inovações instrumentais e outras foram consolidadas por Slavin e colaboradores em 1981, resultando no conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*), que são um conjunto de pré-requisitos instrumentais e operacionais que asseguram uma condição analítica adequada para garantir determinações livres de interferência no forno de grafite.

Entre as técnicas espectroanalíticas, a GF AAS ocupa uma posição de destaque devido à elevada sensibilidade, seletividade, à pequena quantidade de amostra necessária para realizar a análise e a possibilidade de tratamento térmico da amostra durante o programa de aquecimento, tornando possível

introduzir amostras com matrizes complexas, ou até mesmo na forma sólida ou de suspensões. A grande quantidade de métodos analíticos bem estabelecidos, a facilidade de operação do equipamento e o alto grau de automação dos espectrômetros modernos também contribuíram para a grande aceitação desta técnica.

Por suas características, os procedimentos de preparação de amostras podem ser, em GF AAS, relativamente simples: a diluição água ou ácido diluído tem sido usada, com eficiência, na análise de fluidos biológicos humanos, tais como urina⁴⁵, plasma^{45,46}, soro²⁹ e sangue^{10,29,45,46,47}, quando as concentrações de platina são suficientemente altas, sendo desnecessária a pré-concentração das amostras. A redução de efeitos de matriz pode ser alcançada pela adição de Triton X-100 a amostras assim diluídas^{10,47}. Já outros autores preferem a digestão ácida de fluidos e tecidos biológicos para se obter resultados analíticos precisos²⁰. Entretanto, vale notar que os níveis de platina em fluidos biológicos de pacientes em tratamento são altos o suficiente para que a determinação por GF AAS seja feita após a simples diluição da amostra⁴⁸.

Em GF AAS, um interessante procedimento para melhorar os limites de detecção diz respeito à introdução múltipla de amostras. Neste sentido, Vouillamoz-Lorenz *et al.*¹⁰ desenvolveram e validaram um método para determinação de Pt em plasma humano, plasma ultrafiltrado e urina de paciente sob tratamento quimioterápico com JM216 (droga oral de platina) por GF AAS, aumentando a sensibilidade pelo aumento do volume de amostra injetado (150 μL), através de três adições sucessivas no tubo de grafite, cada uma com sua própria etapa de secagem, seguido por um período de atomização prolongado. Os limites de quantificação encontrados para o plasma, plasma ultrafiltrado e urina foram 5, 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Warmerdan *et al.*⁴⁵ desenvolveram e validaram um método de determinação de platina em plasma, plasma ultrafiltrado, saliva e urina de pacientes sob tratamento com carboplatina, também com determinação instrumental por GF AAS, sendo que, neste caso, o pré-tratamento da amostra envolveu uma simples diluição com solução mista de NaCl 0,15 mol L^{-1} e HCl 0,20 mol L^{-1} e calibração externa, com solução de calibração preparada em plasma ultrafiltrado livre de Pt, utilizando carboplatina. Os limites de detecção encontrados para plasma, plasma ultrafiltrado, saliva e urina foram 10, 40, 5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já Brouwers *et al.*⁴⁹ desenvolveram e validaram um método de determinação de platina em plasma e plasma ultrafiltrado de pacientes sob tratamento com oxaliplatina, com o mesmo tipo de pré-tratamento da amostra. Os limites de quantificação encontrados para

o plasma e o plasma ultrafiltrado foram 50 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Thotill *et al.*⁵⁰ compararam GF AAS e ICP MS na determinação de Pt em plasma, tecidos e ossos de animais sendo que os resultados obtidos por ambos os métodos apresentaram boa concordância.

1.3.6

Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS)

Como dito anteriormente, a AAS é atualmente uma técnica largamente difundida e empregada para a determinação de elementos traço nas mais diversas matrizes. Esta técnica utiliza basicamente o princípio de que átomos livres (fase gasosa), gerados em um atomizador, são capazes de absorver radiação de frequência específica, emitida por uma fonte espectral, e a quantificação obedece desta forma, à lei de Beer. Em instrumentos convencionais, usualmente uma fonte de radiação específica para cada elemento (fonte de linhas) é utilizada, o que implica que apenas as linhas do próprio elemento são emitidas pela fonte. Entretanto, na década de 1990, as dificuldades associadas ao uso de fontes contínuas em AAS foram superadas e o primeiro modelo comercial de um instrumento deste tipo foi lançado em 2004⁵¹.

1.3.6.1

Instrumentação

A grande aceitação da técnica de AAS se deu após a introdução do uso de lâmpadas de cátodo oco (HCLs) como fontes de radiação. Estas lâmpadas emitem linhas espectrais bem estreitas, de intensidade estável e como emitem linhas apenas do elemento componente de seu cátodo, o sistema de monocromatização se torna bem mais simples, uma vez que só precisa eliminar as linhas não ressonantes do mesmo elemento, juntamente emitidas⁵². Assim, a substituição das HCLs por uma fonte contínua, sem alteração das outras partes do instrumento, não é adequada.

Várias vantagens dos instrumentos de absorção atômica com fonte de linhas (LS AAS) podem ser enumeradas, tais como: o desenho relativamente simples e barato, uma vez que não há necessidade de monocromadores de alta resolução; a alta seletividade e especificidade devidas ao uso de uma fonte de

linha específica para determinado elemento; reduzidas interferências espectrais ocasionadas por sobreposição de linhas de outros elementos, principalmente comparada à espectrometria de emissão atômica, uma vez que há um número significativamente menor de linhas de absorção que de emissão⁵⁵.

Entre as limitações inerentes à LS AAS, a mais freqüentemente mencionada é o fato de ser uma técnica limitada à determinação de um elemento por vez, o que torna o procedimento relativamente tedioso se um grande número de elementos deve ser determinado em um conjunto de amostras. Além disto, esta técnica requer uma coleção de lâmpadas, que têm vida útil limitada⁵³.

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, um monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*) e um transdutor constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD)⁵¹. Na figura 3, tem-se a representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução.

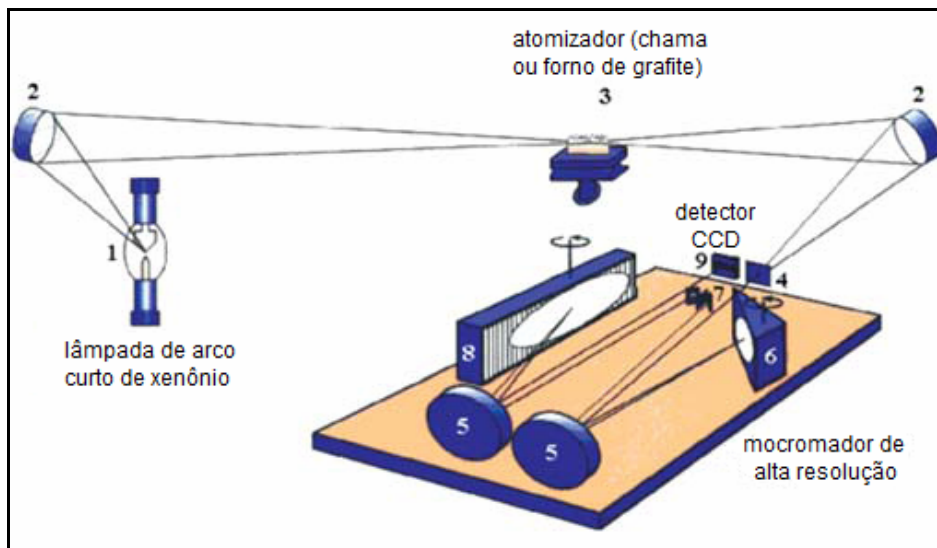


Figura 3. Representação esquemática de um HR-CS AAS. Fonte: WELZ⁵⁴.

Em um equipamento de fonte contínua, é necessária uma fonte de radiação muito mais potente do que em LS AAS, para garantir que a radiação seja intensa em cada comprimento de onda específico. A lâmpada de arco curto de xenônio é operada a uma potência de 300 W, e é constituída por dois

eletrodos de tungstênio com uma distância de 1 mm entre eles. A intensidade desta lâmpada excede, desta forma, a fonte de linha convencional em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude em toda a faixa espectral coberta pela AAS. Embora os arcos sejam instáveis, seu posicionamento é ativamente corrigido por um sistema de hardware e software especiais, garantindo que o feixe de radiação esteja constantemente incidindo no centro do atomizador e, subseqüentemente, para a fenda de entrada do monocromador⁵¹.

O monocromador duplo de alta resolução consiste de um prisma que funciona como um pré-dispersor para a separação do espectro de interesse e uma rede de difração echelle que fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado. Para a seleção do comprimento de onda de interesse, ambos componentes (prisma e rede de difração) são movidos por motores. Além disso, o equipamento inclui um sistema ativo de estabilização de comprimentos de onda, tomando como referência linhas espectrais de uma lâmpada de neônio⁵¹.

Uma das características importantes do software utilizado nos equipamentos propostos para AAS com fonte contínua é a correção automática para todos os eventos que são “contínuos” dentro da faixa espectral observada, isto é, que influenciam todos os pixels da configuração do transdutor (um dispositivo com arranjo de carga acoplada – CCD) da mesma maneira. A suposição mais importante para este tipo de correção é que as variações na intensidade da fonte contínua ocorrem ao mesmo tempo e na mesma intensidade para toda a pequena escala espectral de aproximadamente 0,3 nm que é gravada quando um sinal analítico é gerado. Essa gravação simultânea é garantida pelo uso da disposição linear do CCD com 512 pixels fotossensíveis, que convertem simultaneamente os fótons incidentes em fotoelétrons e os armazenam durante todo o tempo da iluminação. O perfil de carga armazenado para todos os pixels é então, simultaneamente amplificado e digitalizado. Esse sistema garante que variações proporcionais na intensidade sejam convertidas precisamente em mudanças proporcionais nos sinais digitalizados para cada pixel individualmente. Isso significa que todos os eventos que são gravados de maneira idêntica por todos os pixels podem ser corrigidos, ou seja, descontados do sinal gravado pelo pixel utilizado para a medida da linha do elemento que está sendo determinado⁵⁴.

1.3.6.2 Correção de Fundo

A medição e a correção de fundo sempre foram os maiores desafios para todas as técnicas espectrométricas⁵⁴ (Figura 4). Como é impossível medir somente a absorção atômica, é necessário medir a absorção total e em seguida a absorção de fundo, então a diferença da primeira pela segunda fornece a absorção atômica líquida.

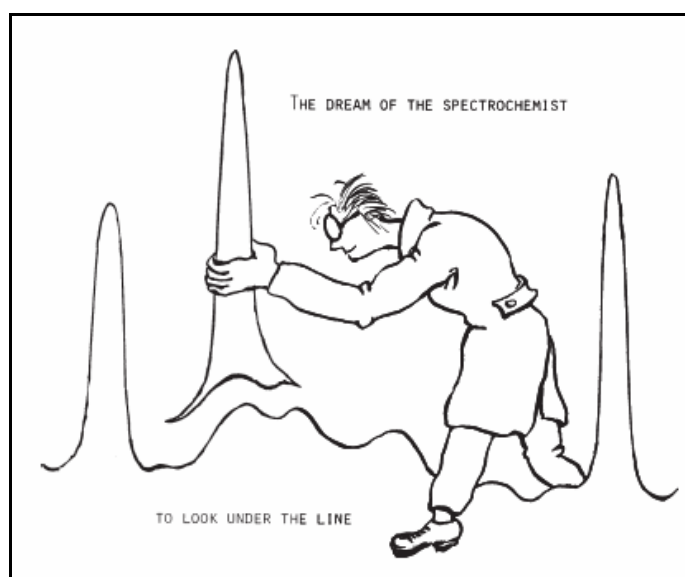


Figura 4. “The Dream of the spectrochemist – to look under the line”. Fonte: WELZ⁵⁷.

A maior limitação da LS AAS corresponde ao fato da absorção ser medida apenas sobre 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. Assim, o fundo deve ser determinado em uma segunda medição.

Os principais sistemas comercialmente disponíveis para a correção de fundo são a correção por fonte contínua (geralmente utilizando uma lâmpada de deutério), o pulso de alta corrente da fonte primária (correção Smith-Hieftje) e a correção de fundo pelo uso do efeito Zeeman.

Corretores contínuos, como a lâmpada de deutério, não corrigem no exato comprimento de onda, o que é um problema quando o fundo é estruturado (espectro molecular gasoso), podendo haver sobrecompensação. Além disso, essa técnica de correção de fundo está limitada a fundos com valores máximos

de até 0,5 unidades de absorvância e aos comprimentos de onda que caem dentro da faixa de emissão da lâmpada utilizada, (que vai de 200 a 350nm, no caso da lâmpada de deutério) e requerem um alinhamento ótico perfeito das duas fontes.

O corretor Smith-Hieftje consiste na aplicação de duas correntes (uma alta e outra baixa) na lâmpada de cátodo oco. Na corrente alta ocorre o fenômeno da auto-absorção que leva a um alargamento da linha (simulando uma fonte contínua). Nesse estágio é medida apenas a absorvância de fundo. Na corrente baixa o comportamento da lâmpada de cátodo oco é o normal (emissão de linhas bastante estreitas) e há leitura da absorção de fundo mais a específica do analito. A diferença entre as leituras leva ao sinal apenas do analito. Devido ao tempo que a corrente alta é aplicada ser baixo, a vida útil das lâmpadas não é significativamente reduzida. O grande problema, neste caso, é quando a absorção de fundo varia rapidamente com o tempo, uma vez que a leitura do analito e do fundo não são obtidas ao mesmo tempo. Além disso, permanece o problema dos fundos estruturados, além de haver uma significativa queda da sensibilidade, pois parte do sinal específico é lido como fundo.

A correção de fundo pelo uso do efeito Zeeman é mais eficiente do que as duas anteriores, uma vez que corrige máximos maiores que uma unidade de absorvância, é utilizável em qualquer faixa do espectro, corrige o fundo exatamente no mesmo comprimento de onda que o da linha de absorção do analito, permitindo a correção de fundos estruturados, e prescinde do uso de duas lâmpadas, eliminando assim, os problemas de alinhamento. No entanto, esse tipo de correção também apresenta suas limitações: a perda de sensibilidade para linhas que não se desdobram totalmente sob a atuação do campo magnético, menores limites de detecção, já que a intensidade do sinal analítico que alcança o detector é mais atenuado em relação ao sistema com corretor de deutério, e uma perda mais rápida de linearidade, por causa do efeito "rollover". Além disso, tal como nos casos anteriores, o sinal de fundo não é lido ao mesmo tempo que o sinal específico, o que seria o ideal, já que o fundo pode variar rapidamente com o tempo. Há, ainda, a possibilidade de sobreposição de linhas, se alguma linha atômica estiver muito próxima à do analito sofrer a ação do campo magnético com suficiente intensidade. Finalmente, há que se considerar que algumas moléculas gasosas, com número ímpar de elétrons (PO, por exemplo), podem ter suas bandas deslocadas, sob a ação do campo.

A espectrofotometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) oferece várias vantagens sobre a LS AAS, em termos de

correção de fundo, já que a combinação do sistema dispersor com a disposição linear do CCD (transdutor de arranjo de carga acoplada), revela o ambiente espectral da linha analítica sobre uma escala aproximadamente 0,20 nm com alta resolução, ou seja, toda a região espectral nas vizinhanças da raia analítica torna-se “visível”, possibilitando muito mais informações do que as obtidas por instrumentos convencionais de AAS. O sistema permite várias possibilidades para corrigir a absorção de fundo, seja ela resultante de um fundo contínuo, de um espectro de excitação eletrônica com estrutura fina rotacional, ou de um elemento concomitante, reduzindo-se o risco de erros devido a interferências espectrais praticamente a zero. Mais ainda, o arranjo de carga acoplada permite uma correção simultânea real da radiação de fundo nas proximidades da raia analítica e o software possibilita a armazenagem de espectros de referência, por exemplo, de espectro de absorção molecular com estruturas rotacionais finas, e a subsequente identificação e subtração deste do espectro de uma amostra, usando-se um algoritmo dos mínimos quadrados, sendo assim possível a correção de fundos estruturados⁵¹.

1.4 Outras Técnicas

Aucélio *et al.*⁵⁵ desenvolveram um método para a determinação de ultratraços de platina em amostras ambientais, urina e sangue por espectrometria de fluorescência atômica induzida por laser (ETA-LEAFS), um método extremamente sensível. Como fonte de excitação foi empregado um laser de vapor de cobre com alta taxa de repetição de pulsos para interrogar mais eficientemente os átomos de platina gerados no forno de grafite. Em urina, foi alcançado um limite de detecção de 30 ng L⁻¹. Randford *et al.*⁵⁶ determinaram platina por RMN 1D e 2D de 500MHz em amostras de urina de um paciente colhidas antes e depois do tratamento com carboplatina. Observaram que apenas metade da quantidade de platina total na amostra apresentava-se na forma da droga intacta. Um instrumento de fluorescência por raios-x (XRF) foi usado para a medição de platina em tumores de cabeça e pescoço *in vivo*, cuja resposta à cisplatina é freqüentemente imprevisível. O limite de detecção encontrado foi de 9 mg L⁻¹ para 2 cm de profundidade⁵⁷.