

2. Parte Experimental

2.1 Instrumentação

2.1.1 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)

Um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua, modelo ContrAA 300 (Analytik Jena, Jena, Germany) foi utilizado para a determinação dos teores de cálcio e fósforo em hidroxiapatita.

O aparelho, representado na figura 1, opera com sistema de atomização em chama, é equipado com uma lâmpada de xenônio formada por eletrodos de tungstênio em uma atmosfera de xenônio a alta pressão (15 bar, quando fria), aos quais é aplicada uma corrente contínua que produz um arco de emissão de alta temperatura (aproximadamente 10000 K) e de pequena dimensão (150 μm), chamado *hot spot*, emitindo radiação de alta intensidade na região do UV-visível. A radiação incidente, após passagem pelo volume de absorção, é dirigida, através de uma fenda, ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (Double-Echelle Monochromator). O monocromador é formado por 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 escolha 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 do comprimento de onda, tomando como referência linhas espectrais de uma lâmpada de neônio.

Por fim, a radiação emitida e transmitida, após processo de separação, atinge o detector, que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) contendo 512 pixels fotossensíveis, totalmente independentes, que convertem simultaneamente os fótons incidentes em fotoelétrons e os armazenam durante todo o tempo de iluminação. O *software* possui a capacidade de guardar informações de espectros de referência para

poderem ser posteriormente subtraídos dos espectros de amostras, fazendo, assim, a correção de fundo.

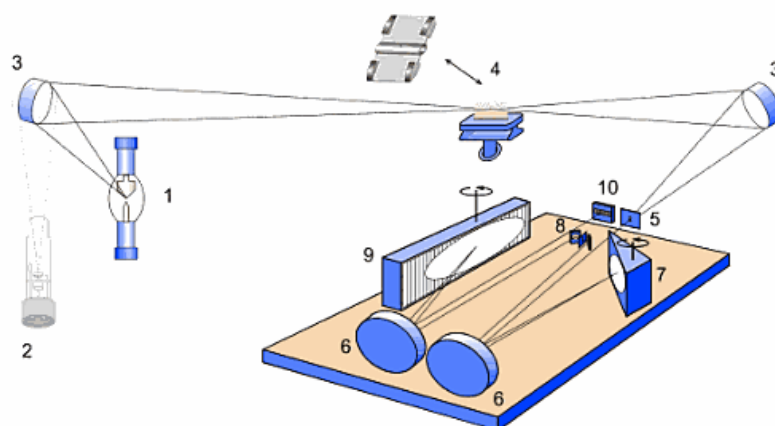


Figura 1 – Representação esquemática do HR-CS AAS

2.1.2

Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

As medidas de emissão dos elementos cálcio e fósforo foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de emissão óptica, com fonte de plasma indutivamente acoplado, modelo Optima 4300 DV (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), dupla visão, operando de maneira sequencial/simultânea em relação ao modo de observação do sinal (configuração radial ou axial da tocha) e à realização da leitura, respectivamente. O equipamento de ICP OES está representado na figura 2.

Neste trabalho foi utilizado um nebulizador pneumático concêntrico ("seaspray"), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica "Twister", um tubo injetor de alumina com 2,0 mm de diâmetro interno e também as vazões de 15 L min⁻¹ e 1 L min⁻¹ do argônio principal e auxiliar, respectivamente.

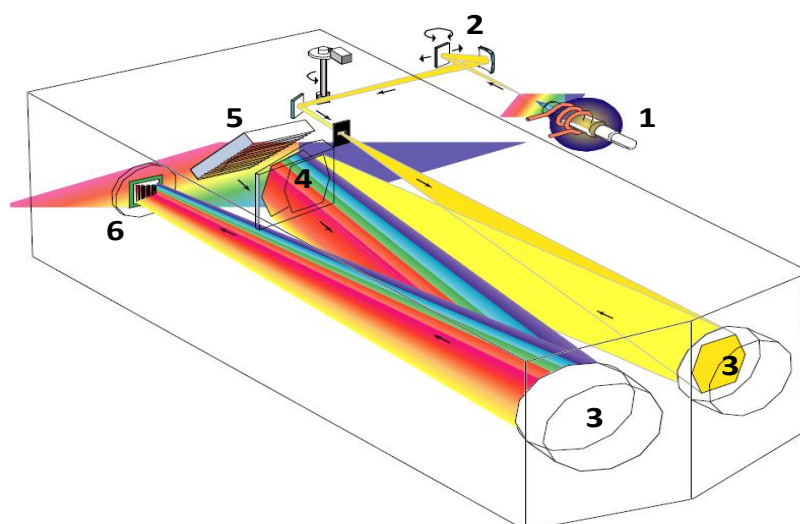


Figura 2 – Representação esquemática simplificada do sistema óptico do ICP OES

2.2

Reagentes, soluções e amostra

As soluções de cálcio e fósforo utilizadas na etapa de otimização foram preparadas, inicialmente, pela pesagem, ao 0,1 mg, de massa apropriada do sal $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ (Sigma Aldrich, $\geq 90\%$, Reino Unido) em tubos plásticos descartáveis de 15 mL ou 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha). Após a pesagem, este sal foi dissolvido com uma solução de HNO_3 0,2% v/v para o cálcio e de 5% v/v para o fósforo, preparada pela diluição adequada de HNO_3 concentrado (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), purificado por subdestilação, realizada em um sistema PFA PTFE ECO IR (Maassen GmbH, Reutlingen, Alemanha). Após a dissolução, as soluções padrões foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos e avolumadas, alcançando as concentrações de 100 mg L^{-1} de cálcio e $10,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo. As soluções de trabalho com concentrações de 0,8 e 10 mg L^{-1} de cálcio, requeridas para análises no HR-CS AAS e ICP OES, respectivamente, e com concentração de 10 mg L^{-1} de fósforo para análise no ICP OES, foram obtidas por diluição da solução padrão utilizando água ultrapurificada ($>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), a qual foi utilizada ao longo de todo o trabalho, tendo sido obtida por meio de ultrapurificador Line Master System P&D (Gehaka, São Paulo, Brasil). Para as análises utilizando-se o HR-CS AAS, ainda foi adicionado KCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) à solução final, perfazendo 1% m/v de cálcio e 0,1% m/v de fósforo. Os gases acetileno e óxido nítrico ($>99,99\%$, Linde, Rio de Janeiro, Brasil) foram empregados como gás combustível e oxidante, respectivamente, para a análise no HR-CS AAS. Para a

análise no ICP OES foi utilizado argônio (>99,99% (Linde, Rio de Janeiro, Brasil) como gás principal e auxiliar.

A amostra de hidroxiapatita utilizada para verificar a precisão e exatidão do método desenvolvido foi a codificada como Hap 237- sem tratamento térmico, proveniente do Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF, Rio de Janeiro).

2.3

Procedimentos

2.3.1

Preparação da amostra

Inicialmente foram pesados 0,5g da amostra Hap 237 em tubo de plástico de 15 mL, aí dissolvidas com solução de HNO_3 5% v/v e avolumadas então a 10 mL. Para a determinação de cálcio, transferiram-se 0,300mL dessa solução para um tubo de plástico graduado de 50,0 mL e avolumou-se com uma solução de KCl 1% m/v, perfazendo uma solução de concentração esperada de cálcio de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$. Já para a determinação de fósforo, pipetou-se uma alíquota de 6,50 mL da solução e avolumou-se com uma solução de KCl 1% m/v em tubo de plástico de 10 mL, alcançando-se uma concentração esperada de fósforo de 6000 mg L^{-1} . Essas soluções foram utilizadas para as medidas no HR-CS AAS.

Para as medidas no ICP OES, a concentração da amostra para a determinação de cálcio foi a mesma utilizada no HR-CS AAS. Contudo, para a determinação de fósforo, tomaram-se 0,100 mL da solução de 6000 mg L^{-1} e avolumou-se com KCl 0,1% m/v, em tubo de 10 mL, alcançando a solução final esperada de 60 mg L^{-1} de fósforo.

2.3.2

Curvas de calibração do cálcio e fósforo

A curva de calibração do cálcio foi preparada a partir de diluições adequadas de uma solução padrão contendo 1000 mg de cálcio (Titrisol, Merck) e adição de HNO_3 e KCl para concentrações finais iguais a 0,2% v/v e 1% m/v, respectivamente.

As soluções de calibração do fósforo foram preparadas pela pesagem apropriada do sal $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$ (β -fosfato tricálcio $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, número de referência: 49963) em tubos de 50 mL, avolumados com HNO_3 5% v/v e KCl 0,1% m/v, alcançando uma concentração de $30,00 \text{ g L}^{-1}$ de fósforo. As soluções

de calibração, com concentrações de até 10,50 e 0,105 g L⁻¹, para a leitura do fósforo por HR-CS AAS e ICP OES, respectivamente, foram preparadas por diluições adequadas desta solução.

Os brancos das curvas de calibração foram preparados de maneira similar às suas respectivas curvas, alcançando as mesmas concentrações finais de ácido e KCl já mencionadas.

2.3.3 Otimização

Um planejamento multivariado foi utilizado na otimização dos parâmetros de relevância para a determinação da razão Ca/P em hidroxiapatita por HR-CS AAS e ICP OES. As variáveis consideradas relevantes usando-se o HR-CS AAS foram vazão de acetileno, altura do queimador e taxa de aspiração, além do número de pixels e do tempo de integração. Usando-se o ICP OES, as variáveis estudadas foram potência da radiofrequência, taxa de aspiração e vazão do gás de nebulização. No caso da HR-CS AAS utilizou-se sempre chama óxido nitroso-acetileno.

2.3.4 Estudos de exatidão em HR-CS AAS e ICP OES

Para a obtenção de resultados analíticos confiáveis, faz-se necessária a validação da metodologia analítica desenvolvida. No presente trabalho, como não se dispõe de materiais de referência adequados, empregou-se uma amostra de hidroxiapatita proveniente do Laboratório de Biomateriais do CBPF. O estudo da exatidão foi realizado mediante comparação dos resultados obtidos na análise destas amostras pelas metodologias propostas e por um procedimento independente validado.