



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DECOMPOSIÇÃO EM LINHA DE AMOSTRAS DE
INTERESSE CLÍNICO COM EMPREGO DE FORNO
DE MICROONDAS E SISTEMA DE FLUXO**

LUCIANA MELO COELHO

Química

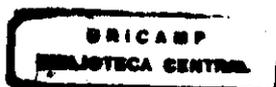
Orientador: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Química, área de concentração:
Química Analítica.**

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

2001.01632





*Dedico esta Dissertação aos meus pais
Lázaro e Orestina e as minhas irmãs
Vânia, Nívia e Luciene, apesar da
distância estão sempre presentes.*



Agradecimentos:

Agradeço a Deus, por cada dia, cada momento e por todo amor que foi destinado a mim, nesta longa caminhada que é a minha vida.

Agradeço ao Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação, apoio e, sobretudo, pela amizade.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas e, em especial, ao Instituto de Química pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao PADCT-III pelo apoio financeiro.

Agradeço à Prof^a Nelci Fenalti Höer do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas pelas amostras de urina fornecidas.

Agradeço ao Prof. Jarbas José Rodrigues Rohwedder, ao Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega e a Prof^a Maria do Carmo Espanhol pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Ninguém é mais solitário do que aquele que não tem um amigo...

Agradeço aos Amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM): Araceli, Carlos, Carlos Emanuel, Clésia, Flávia, Geraldo, Madson, e em especial ao Edenir, pelo apoio e a ótima convivência no laboratório.

Agradeço a minhas Amigas Marcilene e Regiane pelas longas conversas, tanto profissional como também pelos bons conselhos...

Agradeço aos meus Amigos (as), Elis, Fábio, Neuza, Vitor, Salah, Milton César e Pedro, que não são químicos mas sem a nossa convivência e amizade meu trabalho seria bastante árduo.

Agradeço aos amigos que mesmo distantes nunca deixaram de estar presentes.

Agradeço aos colegas do laboratório: Aline, Alex, Lilian, Patrícia e Billy.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Química pela colaboração e pela atenção e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho .



*“As pessoas que vencem neste mundo
são as que procuram as circunstâncias
de que precisam e, quando não as
encontram, as criam.”*

Autor desconhecido



DECOMPOSIÇÃO EM LINHA DE AMOSTRAS DE INTERESSE CLÍNICO COM EMPREGO DE FORNO DE MICROONDAS E SISTEMA DE FLUXO

Autor: Luciana Melo Coelho

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

RESUMO

Foi proposto o acoplamento de um sistema de fluxo em um forno de microondas caseiro para a decomposição em linha de amostras de urina e posterior determinação de Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica (FAAS).

As variáveis que foram investigadas no intuito de otimizar o procedimento de decomposição foram: a concentração do HNO_3 (0 - 4,0 mol L^{-1}), o volume de amostra injetada no sistema de fluxo (150 - 400 μL), a potência do forno (0 - 100 %) e o tempo de atuação das microondas (0 - 6 min). Pelo estudo da quantidade de amostra injetada no sistema de fluxo e o efeito da potência, observou-se que o melhor resultado, tanto para Ca como para Mg, foi empregando 200 μL e potência máxima (659 W). O uso do HNO_3 na concentração de 1,0 mol L^{-1} mostrou-se eficiente, além de ser uma condição menos drástica de decomposição, minimizando a contaminação do meio ambiente e o uso do próprio ácido. Para a variável tempo, o melhor resultado encontrado foi aquele quando as microondas atuavam por 1 minuto.

O método apresentou uma precisão para o cálcio, expressa como desvio padrão relativo (RSD), de 1 % (n = 12) para a repetibilidade e 11 % (n = 10) para a reprodutibilidade. Para o magnésio, esses mesmos fatores foram 3 % (n = 11) e 11 % (n = 12), respectivamente.



As amostras de urina apresentaram-se estáveis por até 48 horas, sofrendo apenas refrigeração. Houve uma diferença significativa da quantidade de Ca presente nas amostras, quando fez-se o estudo dos diferentes tipos de coletas, onde as amostras coletadas por um período de 24 horas apresentaram os maiores valores ($496,07 \text{ mg L}^{-1}$) quando comparado com a amostra coletada ao se levantar ($402,45 \text{ mg L}^{-1}$). Em relação ao Mg, sua concentração foi praticamente a mesma, mudando-se o tipo de coleta ($47,97 \text{ mg L}^{-1}$ e $47,23 \text{ mg L}^{-1}$ para a coleta realizada ao se levantar e 24 horas, respectivamente).

Foram realizadas algumas comparações dos resultados empregando a técnica espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado um teste *t* pareado e os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95 % para todas as amostras.



ON-LINE CLINICAL SAMPLE DECOMPOSITION EMPLOYING MICROWAVE OVEN AND FLOW SYSTEM

**Author: Luciana Melo Coelho
Adviser: Prof. Dr Marco Aurélio Zezzi Arruda**

SUMMARY

The coupling of a flow system to a household microwave oven was proposed for on-line urine sample decomposition with posterior Ca and Mg determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS).

The variables investigated in the optimization for decomposition process were: HNO_3 concentration (0 - 4,0 mol L⁻¹), sample injection volume (150 - 400 μL), microwave power (0 - 100 %) and microwave actuation time (0 - 6 min.). Based on the injected sample volume into the flow system and the power effect, the best results achieved for Ca and Mg, were 200 μL for injected volume and 659 W for maximum power. The use of HNO_3 in the 1 mol L⁻¹ concentration was efficient, being less drastic condition for decomposition process, minimizing the environment contamination and the use of nitric acid. When the time was evaluated for microwave application, the best result achieved was 1 min.

The proposed method presented a good precision for calcium (expressed as RSD) of 1 % (n = 12) for repeatability and 11 % (n = 10) for reproducibility. For magnesium, these factors were 3 % (n = 11) and 11 % (n = 12), respectively.

The urine samples were stables up to 48 h, only using refrigeration process. There were significant differences in the Ca concentration present in



the samples, when different types of urine sampling were studied. The collected samples for a period of 24 h showed higher values (496.07 mg L^{-1}) when compared with sample collected at the morning (402.45 mg L^{-1}). For magnesium its concentration was almost the same when different collecting types were applied (47.97 mg L^{-1} and 47.23 mg L^{-1} for sampling made in the morning and for 24 h, respectively).

An alternative technique (ICP-OES) was used for accuracy check. A test t was applied for all samples and the results were not different at 95% confidence level.



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

DADOS PESSOAIS

Nome: Luciana Melo Coelho

Filiação: Lázaro de Sousa Coelho

Orestina de Oliveira Melo Coelho

Naturalidade: Ituiutaba - MG

Nacionalidade: Brasileira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

3º GRAU: Universidade Federal de Uberlândia – UFU (Uberlândia - MG)

Habilitação: Bacharel em Química

Diploma sob o registro de nº 54, livro CIE-3, fls. 6, processo nº 0-2369/98

Pós – graduação em andamento: mestrado em química analítica

Início: agosto de 1998.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Monitoria:

• **Química Inorgânica (QLI-08)**

Departamento de Química – UFU

Profª Drª Sandra Terezinha Farias

Segundo semestre de 1994.

• **Química Analítica II (QLI-04)**

Departamento de Química – UFU

Profª Drª Nívia Maria Melo Coelho

Primeiro semestre de 1995.



- **Preparo de Amostras (QP-413)**

Instituto de Química – UNICAMP

Prof. Dr Marco Aurélio Zezzi Arruda

Primeiro semestre de 2000.

Estágio:

- Departamento de Agronomia - Laboratório de Análise Foliar e Fertilizantes (UFU).

Análise foliar de silício e análise de silício no solo.

Carga horária: 1100 horas

Profº Drº Gaspar H. Korndorfer

Uberlândia (MG) agosto a novembro de 1997 e fevereiro a julho de 1998.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- **8º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – SBQ/MG**

Efeito do solvente orgânico na detecção espectrofotométrica do complexo Cr(VI)-1,5 difenilcarbazida. Belo Horizonte (MG) 22 a 25 de novembro de 1994.

- **18º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e 7º Encontro Brasileiro de Fotoquímica e Fotobiologia – SBQ**

Efeito do pH na detecção espectrofotométrica do complexo Cr(VI)-1,5 difenilcarbazida, na presença do solvente orgânico. Caxambu (MG) 30 de maio a 02 de junho de 1995.

- **VIII Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA**

Determinação espectrofotométrica do complexo Cr(VI) – 1,5 difenilcarbazida em sistema por injeção em fluxo contínuo na presença de solvente orgânico.

Belo Horizonte (MG) 03 a 06 de setembro de 1995.

- **XXXV Congresso Brasileiro de Química – ABQ**

Avaliação da extração e pré-concentração de Cr(VI) por sílica modificada em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo. Salvador (BA) 25 a 29 de setembro de 1995.



- **19º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**

Avaliação da oxidação de Cr(III) por Ce(IV) imobilizado em resina catiônica Amberlite CG-120. Poços de Caldas (MG) 27 a 30 de maio de 1996.

- **V Encontro de Iniciação Científica (PIBIC) convênio:**

CNPq/UFMS /UFG /UFU/UCG

Estudos e avaliação da remoção de íons Cr(VI) e Cr(III) de águas e efluentes industriais sobre sílica funcionalizada com íons piridínio em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo (apresentação oral). Goiânia (GO) 28 a 30 de outubro de 1996.

- **XII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – SBQ/MG**

Determinação de silício em tecidos de plantas utilizando a técnica de análise por injeção em fluxo. Ouro Preto (MG) 28 a 30 de outubro de 1998.

- **X Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA**

Sistema mecanizado empregando forno de microondas para o preparo em linha de amostras de interesse clínico. Santa Maria (RS) 31 de agosto a 03 de setembro de 1999.

BOLSAS DE ESTUDO

- **Bolsa de monitoria concedida pela Universidade Federal de Uberlândia**

Período: 2º semestre de 1994 e 1º semestre de 1995.

- **Bolsa de iniciação científica concedida pelo programa PIBIC- CNPq (projeto 178/95)**

Período: 08/1995 a 08/1996.

- **Bolsa de aperfeiçoamento concedida pelo Conselho Nacional Científico e Tecnológico CNPq (número do processo da quota 520072/96)**

Período: abril a agosto de 1998.

- **Bolsa de pós graduação (mestrado) concedida pelo Conselho Nacional Científico e Tecnológico CNPq (número do processo da quota 132774/98-4)**

Período: setembro de 1998 a agosto de 2000.



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Teoria das microondas.....	3
3.2 Fornos de microondas.....	4
3.3 Aplicação dos fornos de microondas.....	5
3.4 Sistemas mecanizados/robotizados acoplados a fornos de microondas.....	8
3.5 Hifenação dos fornos de microondas e sistemas de fluxo para a decomposição de fluidos biológicos.....	11
3.6 Fluidos biológicos.....	13
3.6.1- Amostras biológicas.....	13
3.6.2- Armazenamento dos fluidos biológicos.....	14
3.6.3- Importância em analisar fluidos biológicos.....	15
3.6.4- Urina: composição e características.....	18
3.7 Cálcio e magnésio.....	20
3.7.1- Uma visão geral.....	20
3.7.2- Cálcio e magnésio no organismo.....	22
3.7.3- Determinação de cálcio e magnésio em amostras biológicas.....	23
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1 Instrumentação e acessórios.....	26
4.2 Reagentes e soluções.....	27
4.3 Amostras.....	30
5. METODOLOGIA.....	30



5.1 Condições de segurança.....	30
5.2 Calibração do forno de microondas.....	31
5.3 Investigação da distribuição das microondas no interior do forno.....	32
5.4 Decomposição das amostras pelo forno de microondas caseiro para a determinação de cálcio e magnésio.....	33
5.5 Estudo da estabilidade da amostra de urina.....	36
5.6 Estudo dos diferentes tipos de coleta.....	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1 Calibração do forno de microondas.....	38
6.2 Investigação da distribuição das microondas no interior do forno.....	39
6.3 Sistema de fluxo: investigação da alça de amostragem.....	43
6.4 Investigação das condições de decomposição.....	45
6.4.1- Avaliação do efeito da potência do forno.....	46
6.4.2- Emprego do ácido nítrico e efeito do tempo de atuação das microondas sobre a decomposição das amostras de urina.....	47
6.5 Estudo da estabilidade das amostras de urina.....	55
6.6 Estudo dos diferentes tipos de coletas.....	56
6.7 Estudo dos concomitantes.....	58
6.8 Comparação de resultados empregando duas técnicas de detecção.....	66
6.9 Comparação da decomposição empregando o forno de microondas caseiro e o bloco digestor.....	68
6.10 Características analíticas.....	70
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um forno de microondas convencional.....	5
Figura 2: (a) Posicionamento dos béqueres de acordo com as três alturas investigadas e (b) posicionamento mais detalhado dos béqueres no interior do forno de microondas.....	33
Figura 3: Sistema utilizado na decomposição das amostras de urina.	34
Figura 4: Curva da potência real obtida para o forno de microondas caseiro (CCE – M 34).....	38
Figura 5: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos na base do forno, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima.....	40
Figura 6: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos a 6,5 cm de altura, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima.....	41
Figura 7: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos a 13 cm de altura, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima.....	41
Figura 8: Resultado da incidência das microondas durante 6 min. sobre o papel de fax posicionado na base do forno à potência máxima (659 W).....	43
Figura 9: Concentração de cálcio presente na amostra de urina em função do volume injetado.....	44
Figura 10: Concentração de magnésio presente na amostra de urina em função do volume injetado.....	44
Figura 11: Eficiência da extração de cálcio presente na amostra de urina em função da potência.....	46



Figura 12: Eficiência da extração de magnésio presente na amostra de urina em função da potência.....	47
Figura 13: Superfície de resposta obtida para a concentração de cálcio devido a decomposição das amostras de urina, variando a concentração de ácido e o tempo de atuação das microondas.....	49
Figura 14: Superfície de resposta obtida para a concentração de magnésio devido a decomposição das amostras de urina, variando a concentração de ácido e o tempo de atuação das microondas.....	49
Figura 15: Concentrações de cálcio obtidas após a decomposição de seis amostras de urina, utilizando 200 μ L da mistura amostra/ácido, à potência máxima (659 W) por 1 min.....	52
Figura 16: Concentrações de magnésio obtidas após a decomposição de seis amostras de urina, utilizando 200 μ L da mistura amostra/ácido, à potência máxima (659 W) por 1 min.....	52
Figura 17: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo cobre (a) e potássio (b) como concomitantes.....	60
Figura 18: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo cloreto (a) e magnésio (b) como concomitantes.....	61
Figura 19: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo zinco (a) e sulfato (b) como concomitantes.....	61
Figura 20: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo fosfato (a) e chumbo (b) como concomitantes.....	62
Figura 21: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo zinco (a) e potássio (b) como concomitantes.....	63
Figura 22: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo cobre (a) e alumínio (b) como concomitantes.....	64



Figura 23: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo cloreto (a) e cálcio (b) como concomitantes.....	64
Figura 24: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo chumbo (a) e níquel (b) como concomitantes.....	65
Figura 25: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo fosfato como concomitante.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições empregadas na determinação de Ca e Mg.....	36
Tabela 2: Níveis de potência do forno de microondas caseiro.....	39
Tabela 3: Resultados da relação da concentração entre Ca e Mg.....	54
Tabela 4: Resultados da avaliação da estabilidade de quatro amostras de urina.....	55
Tabela 5: Quantidade de cálcio e magnésio (mg L^{-1}) presente nas amostras de urina, mudando-se o tipo de coleta.....	57
Tabela 6: Metais e espécies investigadas e suas respectivas concentrações em relação ao cálcio.....	58
Tabela 7: Metais e espécies investigadas e suas respectivas concentrações em relação ao magnésio.....	59
Tabela 8: Resultados obtidos para Ca em diferentes voluntários empregando ICP-OES e FAAS.....	66
Tabela 9: Resultados obtidos para Mg em diferentes voluntários empregando ICP-OES e FAAS.....	67
Tabela 10: Resultados obtidos para Ca (mg L^{-1}) em diferentes voluntários empregando o forno de microondas e o bloco digestor.....	69
Tabela 11: Resultados obtidos para Mg (mg L^{-1}) em diferentes voluntários empregando o forno de microondas e o bloco digestor.....	69



1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais a Química Analítica desempenha um papel de destaque, pois mais e melhores testes são desenvolvidos, particularmente nos laboratórios clínicos e naqueles voltados à análise ambiental [1]. Sendo assim, uma das tendências da Química Analítica é o uso de novas fontes de energia, como as microondas, para facilitar e acelerar o preparo de amostras [2].

Os métodos de tratamento de amostras que utilizam fornos de microondas baseiam-se na decomposição do material através da irradiação por ondas eletromagnéticas. Neste caso, materiais que são dificilmente dissolvidos por reagentes ácidos/oxidantes e aquecimento convencional, podem ser facilmente solubilizados [3].

As vantagens oferecidas pela decomposição de amostras com fornos de microondas são amplamente demonstradas e muitos métodos tem sido descritos [4], com aplicação, por exemplo, em fluidos biológicos [5 - 10].

O emprego de fornos de microondas juntamente com sistemas de fluxo para a decomposição de amostras em linha pode ser de grande ajuda, pois, pode-se obter mais informações analíticas com menos esforços, além do custo por análise ser drasticamente reduzido pois, na maioria dos casos, somente poucos microlitros de amostra e reagentes são necessários [11].

A mecanização do processo analítico apresenta uma alternativa extremamente atrativa, pois os erros provenientes da atuação humana e a periculosidade são bastante reduzidos [11].

Os métodos clínicos de rotina necessitam de exatidão, precisão, simplicidade e, principalmente, rapidez, devido à alta demanda de análises. A quantidade de amostra empregada para análises deve ser pequena, especialmente para pacientes como recém - nascidos e crianças, ou quando



necessita-se realizar testes confirmatórios [12]. Dentro desse contexto, os sistemas de fluxo são adequados para a área clínica, uma vez que apresentam alta velocidade analítica, aliada à simplicidade, além da manipulação das amostras ser bastante reduzida.

A importância em se fazer análises de amostras de urina é devido à possibilidade de obtenção de um grande número de informações de forma rápida e econômica. É pelo exame de urina que se pode fazer o diagnóstico de doenças renais ou do trato urinário, além da detecção de doenças metabólicas ou sistêmicas não relacionadas com o rim para, conseqüentemente, realizar o tratamento adequado. Além disso, a amostra de urina é um líquido tissular de biópsia do trato urinário obtido sem dor [13].

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o de propor o acoplamento de um sistema de fluxo em um forno de microondas caseiro. Todo o funcionamento do sistema, com exceção da injeção das amostras, foi controlado por um microcomputador, para o tratamento mecanizado e em linha de amostras de interesse clínico (urina). As melhores condições para a decomposição foram determinadas e, posteriormente, cálcio e magnésio foram quantificados por espectrometria atômica (FAAS).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Teoria das microondas

No espectro eletromagnético, a região das microondas localiza-se entre a radiação do infravermelho e a radiação das ondas de radiofrequência, e corresponde a comprimentos de onda entre 0,1 a 100 cm (frequências de 3×10^5 - 300 MHz, respectivamente). Os comprimentos de onda entre 1 e 25 cm são extensivamente usados em radioastronomia, radiometeorologia, navegação e transmissão de radares, e o restante é empregado em telecomunicações, fornos de microondas, indústria alimentícia, entre outros [14].

Durante a Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento de radares estimulou o crescimento da tecnologia das microondas, e já nesta época, existia uma grande preocupação sobre possíveis perigos das microondas sobre a saúde. Cronologicamente, os geradores de microondas foram a primeira fonte de radiação não-ionizante [14].

As microondas constituem uma radiação eletromagnética não ionizante que provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna (em um forno de microondas caseiro, por exemplo, isso ocorre $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo). Devido a esse mecanismo de “stress” induzido, ocorre o aquecimento, sendo que o mesmo não é produzido por fonte externa de aquecimento, mas sim pela interação entre as microondas e as moléculas da amostra. Fica claro que, para que haja aquecimento, é necessário a presença de moléculas polares e íons em solução. A energia típica que um sistema de microondas irradia é de 600 - 700 W. Desta forma, em cinco minutos, aproximadamente 43 Kcal podem ser fornecidas por um forno de



microondas para o preparo de amostras. A frequência de 2450 ± 13 MHz é a mais comum, inclusive sendo usada nos fornos de microondas caseiro [3].

3.2 Fornos de microondas

Existem dois tipos de fornos de microondas que são empregados em laboratório para o preparo de amostras: os que utilizam frascos fechados a pressões elevadas ($8,1 \times 10^4$ a $20,3 \times 10^4$ atm) e os de frascos abertos a pressão atmosférica. Nos sistemas de frascos fechados a energia das microondas é dispersa por toda a cavidade, enquanto que nos sistemas abertos a energia é focalizada na parte do frasco de decomposição contendo a amostra [4, 15].

O preparo de amostras por microondas através do sistema focalizado oferece várias vantagens: operação à pressão atmosférica, variedade de reagentes que podem ser usados, bem como a possibilidade de automação. Este sistema permite que vários frascos, contendo diferentes amostras, tenham tratamentos programados em cada frasco [16] e possui a capacidade de acomodar até 10 g da amostra [17].

O preparo de amostras utilizando frascos fechados possui algumas vantagens como: quantidade mínima de amostras e reagentes, reduz problemas associados como perda do analito e contaminação tanto atmosférica como do próprio frasco de preparo [18]. O tempo de decomposição e os riscos ao operador são bastante minimizados nesses dois sistemas.

Um aparelho de microondas típico usado no aquecimento de amostras (Figura 1) consiste de seis componentes básicos: o gerador de microondas (chamado de magnetron), o guia de ondas, a cavidade do forno, o agitador (para espalhar as ondas), um circulador e um exaustor de ar [3].

As microondas são produzidas pelo magnetron, propagadas através do guia de ondas e inseridas diretamente na cavidade do forno onde o espalhador as distribui em várias direções, sendo, então, absorvidas pelas moléculas das amostras e dos solventes [3].

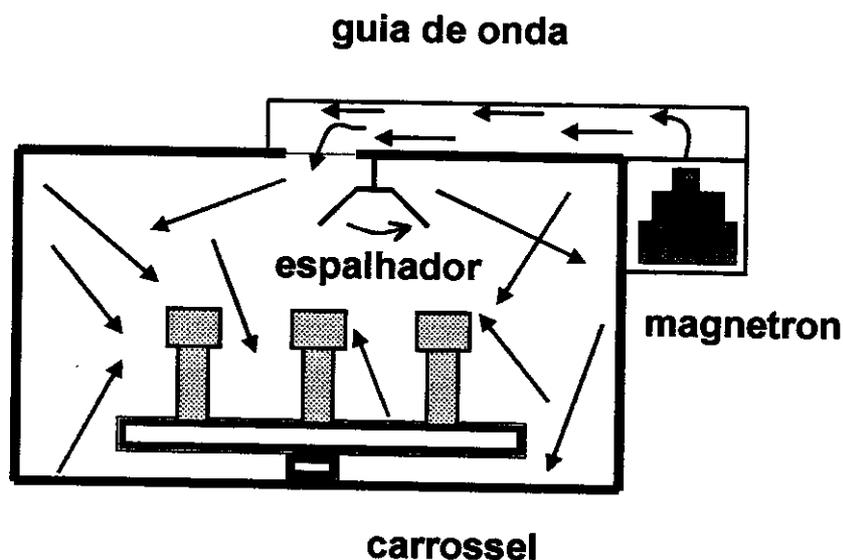


Figura 1: Esquema de um forno de microondas convencional.

3.3 Aplicação dos fornos de microondas

A utilidade dos fornos de microondas na Química Analítica está cada vez mais evidente. Existem somente 7 citações sobre o uso de fornos de microondas na década de 70. As publicações aumentaram para 132 nos anos 80 e para 166 referências somente nos primeiros quatro anos na década de 90 [19].

Muitas aplicações para materiais biológicos em sistemas fechados sobre pressão e em sistemas abertos à pressão atmosférica tem sido descritos. Os reagentes mais comuns para esses materiais são: HNO_3 , HCl , H_2SO_4 e H_2O_2 [15].



A maioria dos métodos empregados para a determinação de macro e micro elementos em amostras sólidas e líquidas requer algum pré-tratamento para obter o elemento na forma satisfatória para posterior análise, e desta forma, o preparo de amostras é uma das etapas cruciais [20]. Esta etapa preliminar é usualmente responsável por erros devido a contaminação proveniente dos reagentes e do meio ambiente, perda do elemento por volatilização (por exemplo, Pb, Se, Cd), além de ser uma etapa que consome tempo (*ca.* de 70 - 95 % do tempo que compreende todo o processo analítico) [21].

Idealmente, um procedimento de decomposição de uma amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de ácidos, permitir a decomposição de um grande número de amostras, permitir a determinação de muitos elementos numa mesma amostra decomposta e, finalmente, produzir resultados exatos e precisos [11]. O preparo de amostras assistida por microondas, atende em grande extensão, a essas necessidades.

Abu-Samra e colaboradores [22] foram os primeiros a descrever o uso de um forno de microondas para dissolução de amostras. Eles usaram uma mistura de HNO_3 e HClO_4 para oxidar amostras biológicas em frascos de erlenmeyer de 125 mL, empregando um forno de microondas caseiro. Desde então, vários artigos têm sido publicados envolvendo o uso da radiação das microondas como fonte de energia para promover a dissolução ácida de vários tipos de amostras, como materiais botânicos, biológicos e geológicos [23].

Kingston e Jassie [5] empregaram um forno de microondas convencional com frascos de alta pressão para decomposição ácida de amostras botânicas e biológicas. As amostras de urina humana (SRM) foram reconstituídas pesando-se uma alíquota de água, seguida pela adição de uma quantidade de vanádio-50 e evaporada até a *secura*. Uma quantidade de 5 mL



de HNO_3 concentrado foi adicionada e os frascos fechados com a ajuda de um torquímetro. Oito amostras foram decompostas simultaneamente por 2,5 minutos a 100 % de potência e, em seguida, por 3,5 minutos a 80 % de potência. Para avaliar a eficiência da decomposição, a quantidade de aminoácidos foi determinada antes e após o uso do forno. Os aminoácidos presentes nas amostras de urina apresentaram um fator de redução de 10^5 vezes após a decomposição.

Kojima e colaboradores [24] usaram um forno de microondas com frascos fechados para a decomposição de amostras biológicas e botânicas. Uma quantidade de 100 mg da amostra foi decomposta pelo forno, juntamente com uma mistura de 2 mL de HNO_3 , 0,3 mL de HClO_4 , 0,15 mL de HCl e 0,15 mL de HF . A decomposição foi completa em 15 minutos e oito elementos, entre eles Ca e Mg, foram determinados em materiais de referência padrão (fígado bovino, moluscos, pimenta e folhas de chá). Segundo os autores, esse sistema pode ser aplicado para a decomposição de amostras sólidas contendo sílica.

Krachler e colaboradores [7], determinaram nove elementos em amostras de urina por ICP - MS. Foi efetuada uma comparação entre as amostras que foram diluídas com água desionizada, com as decompostas, ou por um forno de microondas ou utilizando a radiação ultra-violeta (UV). Em termos de quantidade de matéria orgânica convertida em CO_2 e H_2O , a decomposição assistida por microondas em frascos pressurizados produziram os melhores resultados, além do tempo de decomposição ter sido menor do que 30 minutos. Para a radiação com UV, os melhores resultados foram obtidos empregando tempo de 90 minutos. No caso das amostras que sofreram apenas diluição, estas não apresentaram estabilidade do sinal analítico e, freqüentemente, os limites de determinação foram comprometidos.



3.4 Sistemas mecanizados/robotizados acoplados a fornos de microondas

A hifenação de fornos de microondas com sistemas de fluxo pode ser de grande ajuda na decomposição de amostras em linha, uma vez que é possível obter mais informações analíticas com menos material, tempo, esforços e recursos econômicos. Além disso, o tempo total da decomposição pode ser diminuído, principalmente pelo fato de não haver necessidade de esfriar o reator de digestão, como ocorre quando se empregam frascos fechados. De uma maneira geral, o forno de microondas é incorporado à um sistema de fluxo sendo que a amostra decomposta é coletada em frascos abertos para subsequente análise, com o emprego de alguma técnica analítica ou levada diretamente ao detector acoplado em linha com o forno [11].

O primeiro trabalho sobre sistemas de fluxo acoplado a um forno de microondas para o preparo de amostras, foi proposto por Burguera e Burguera [8], onde foram decompostas amostras de sangue para posterior determinação de Cu, Zn e Fe por FAAS. As amostras injetadas (60 - 100 μL) foram decompostas empregando um forno de microondas caseiro com potência máxima de 700 W, e uma mistura de 100 μL de HNO_3 e HCl nas concentrações de 0,4 mol L^{-1} e 0,3 mol L^{-1} , respectivamente. Cerca de 80 amostras h^{-1} eram decompostas nesse sistema.

Carbonell e colaboradores [25] empregaram um forno de microondas caseiro acoplado a um sistema de fluxo para determinação em linha de chumbo em amostras sólidas na forma de suspensão. A decomposição foi realizada em 5 minutos à potência máxima (650 W) e durante este período, padrões de chumbo eram injetados e conduzidos para o sistema de detecção (FAAS). Uma bobina imersa em um banho de gelo, a qual foi colocada após o forno de microondas, foi empregada para permitir a condensação do vapor



formado. Os resultados obtidos mostraram boa concordância com o método fora de linha.

Vários esforços têm sido feitos para automatizar o preparo de amostras. Torres e colaboradores [2] propuseram um método de determinação de elementos traço em solos com decomposição assistida por um forno de microondas focalizadas. Todo o processo, desde a pesagem das amostras até o processamento dos dados foi realizado por um robô e o tempo de tratamento das amostras foi drasticamente reduzido de 2 horas para 3 minutos.

Um sistema de decomposição em linha empregando um forno de microondas e posterior determinação de alumínio em crustáceos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) foi desenvolvido por Arruda e colaboradores [26]. As variáveis, como, tempo de decomposição, concentração de ácido nítrico e potência do forno de microondas foram otimizadas e as melhores condições encontradas foram 2 minutos, 2 mol L⁻¹ e 600 W, respectivamente. Este sistema permitiu o tratamento seqüencial de diferentes amostras.

Pereira-Filho e colaboradores [27] desenvolveram um sistema de fluxo para o preparo em linha de amostra na forma de suspensão com posterior determinação de ferro por espectrofotometria. Tempos de decomposição de 10 min foram necessários para as amostras de ostras e 20 min para as amostras de moluscos e peixes, resultando numa velocidade analítica de *ca.* 5 e 3 amostras por hora, respectivamente. Neste sistema, algumas operações, como por exemplo, o acionamento da válvula de aprisionamento das amostras, eram controladas por um computador. O forno de microondas não sofreu nenhuma modificação nos seus componentes eletrônicos;

Oliveira e Fatibello-Filho [28] determinaram fósforo total por espectrofotometria em amostras alimentícias. A decomposição em linha foi



conduzida empregando um forno de microondas com 1000 W de potência. A mescla amostra (20 μL) e HNO_3 concentrado (65 μL) foi conduzida para a bomba de decomposição localizada no interior do forno, e após o tempo de irradiação (30 seg), a amostra decomposta foi processada em um fluxo reverso, seguido da adição de alguns reagentes, como por exemplo, ácido ascórbico, e conduzida para o detector. Esse sistema apresentou uma velocidade analítica de 16 amostras h^{-1} , além de minimizar o consumo de amostras e reagentes.

Um forno de microondas caseiro foi empregado para a decomposição em linha de amostras de sucos de cana de açúcar para determinação de glucose e frutose. Um volume de 50 μL da amostra diluída foi inserida no sistema de fluxo e decomposta a uma potência de 700 W. Aproximadamente 70 amostras h^{-1} eram decompostas nesse sistema [29].

Os procedimentos de decomposição em linha assistida por microondas tem tornado possível o desenvolvimento de sistemas de fluxo automatizado para o tratamento de amostras líquidas como água, urina e sangue [25, 30 - 32] por diferentes técnicas de absorção atômica.

Um procedimento automatizado empregando um forno de microondas e sistema de injeção em fluxo foi proposto por Burguera e colaboradores [33] para a determinação de Fe e Zn em tecido adiposo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. A decomposição das amostras (ca. 20 a 30 mg) foram realizadas com uma mistura de H_2SO_4 (2,0 mol L^{-1}) e HNO_3 (1,0 mol L^{-1}) na razão de 4:1, à potência de 40 W. Uma célula de difusão de gás permitiu a degaseificação das amostras decompostas removendo o gás gerado durante a etapa de decomposição. As principais vantagens deste método foi a determinação exata e precisa de Fe e Zn em tecido adiposo através do emprego de um sistema totalmente fechado com um



mínimo de manipulação das amostras, mínima contaminação do meio ambiente e mínima atenção do operador. Excelentes recuperações, maiores que 90, %, foram obtidas para todos os elementos.

3.5 Hifenação dos fornos de microondas e sistemas de fluxo para a decomposição de fluidos biológicos

A partir do primeiro trabalho de acoplamento de um sistema de fluxo à um forno de microondas, proposto por Burguera e colaboradores [8], diversos sistemas tem sido desenvolvidos e aplicados para diversos tipos de amostras, como por exemplo, amostras de águas, efluentes, plantas, tecidos biológicos, fluidos biológicos, bebidas, frutas, materiais de referência e amostras geológicas [30, 31, 34 - 36].

Matusiewicz e Sturgeon [9] realizaram um estudo comparando duas técnicas de decomposição assistida por microondas: um sistema de decomposição em linha e um sistema de microondas focalizadas a elevadas pressões e temperaturas. Para verificar a eficiência das decomposições, a quantidade de carbono residual total presente nas amostras, foi determinada antes e após o emprego das microondas. As amostras utilizadas neste estudo foram materiais biológicos de referência (como por exemplo, tecido de ostra SRM 1566a e fígado bovino SRM 1577), além de urina humana e detritos de efluentes. Para as decomposições realizadas a elevadas pressões e temperaturas, a matéria orgânica foi completamente destruída com HNO_3 concentrado (2 mL) e 5 minutos de atuação das microondas à 100 W de potência. No entanto, o tempo total de preparo foi de 10 - 12 minutos, devido ao resfriamento dos frascos. As decomposições utilizando o sistema de microondas em linha, à potência de 80 W e o emprego do HNO_3 (5 - 20 %



v/v) apresentou uma eficiência na oxidação cerca de 56 % e o tempo total das decomposições, juntamente com os ciclos de resfriamento e limpeza do sistema, foi de aproximadamente 6 minutos.

Stewart e Barnes [6], investigaram a decomposição de amostras de urina, leite e sangue empregando um sistema em linha automatizado acoplado a um forno de microondas focalizadas. A decomposição das amostras foram realizadas em seis estágios, com tempo máximo de 29 minutos. Eles empregaram ICP-OES para a determinação de Ca, Mg e Zn.

Um método de tratamento em linha utilizando um forno de microondas para posterior determinação de mercúrio em sangue por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS) foi desenvolvido por Guo e Baasner [10]. Após diluição da amostra e adição do reagente oxidante, todo processo, incluindo o tratamento das amostras, a adição de reagentes e as leituras de Hg foi realizado em linha e de forma automática. Esse método apresentou uma velocidade analítica de 45 amostras h^{-1} e mostrou-se eficiente, pois os riscos de contaminação, perdas por volatilização e adsorção, foram drasticamente reduzidos. Os problemas relacionados à coagulação foram resolvidos, realizando-se a adição do reagente oxidante antes da solução ácida.

Tslev e colaboradores [32] avaliaram um sistema de tratamento em linha empregando um forno de microondas para a decomposição de urina e águas, onde Hg, As, Bi, Pb e Sn foram determinados por HG-AAS e CV-AAS. Welz e colaboradores [31] empregaram um sistema de fluxo acoplado em um forno de microondas para a decomposição de água e urina, para posterior determinação de mercúrio. Cerca de 35 e 24 amostras eram decompostas por hora sem e com amalgamação, respectivamente.

Burguera e colaboradores [37] descreveram um método para determinação de cobalto em sangue por espectrometria de absorção atômica



com atomização eletrotérmica (ETAAS). A amostra era decomposta utilizando um forno de microondas acoplado em um sistema de análise por injeção em fluxo. EDTA foi usado como reagente anticoagulante. Uma bobina de decomposição de 5 m foi inserida na cavidade do forno e os melhores resultados foram encontrados utilizando 300 W de potência por 50 segundos e 2 mL de HNO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A amostragem *in vivo* e a decomposição em linha reduziu bastante o manuseio das amostras, além de minimizar a possibilidade de contaminação das amostras e tornar possível a automação do sistema.

O interesse em sistemas de preparo de amostras em linha é tão grande que já existem comercialmente (SpectroPrep da CEM Corporation) sistemas híbridos FIA - microondas [11].

3.6 FLUIDOS BIOLÓGICOS

3.6.1- Amostras biológicas

Os fluidos corpóreos podem ser agrupados em três categorias: os comumente solicitados (sangue, leite e urina), os facilmente acessíveis mas não comumente solicitados (sêmen, suor, lágrima e saliva) e os fluidos que requerem procedimentos especiais para coleta (fluido amniótico, pancreático, gástrico e cerebro-espinhal) [38].

Em uma revisão publicada por Das e colaboradores [39] sobre estudos de especiação em fluidos corpóreos, pode-se observar que as amostras mais utilizadas para análises foram sangue (38,5 %), urina (35,8 %) e leite (12,7%). Essas três amostras juntas, perfazem um total de 87,0 % dos trabalhos publicados. Os outros 13,0 % correspondem a estudos de especiação



realizados em amostras como suor (3 %), lágrima (2,2 %), saliva (1,5 %), fluido cérebro espinhal (1,5 %), etc. Isso ocorre devido a fácil acessibilidade das amostras de sangue, urina e leite, além delas mostrarem a presença de vários elementos e substâncias [40].

Fluidos biológicos são susceptíveis ao crescimento bacteriano, quando não devidamente armazenados. Urina, por exemplo, se decompõem rapidamente a temperatura ambiente, e até mesmo a 4 °C, por causa da contaminação bacteriana, resultando na sua alcalinização devido à conversão de uréia em amônia pela espécie *Proteus*. Além disso, essas amostras apresentam riscos ao analista. Os riscos são mais acentuados quando agentes infecciosos como vírus da hepatite e HIV estão presentes [41]. Assim, deve-se sempre usar luvas quando for manusear qualquer material biológico [13].

Algumas amostras clínicas são muito valiosas, uma vez que a amostragem repetitiva nem sempre é possível, como, por exemplo, aquelas amostras obtidas de bebês e crianças [38].

3.6.2- Armazenamento dos fluidos biológicos

No corpo humano, os fluidos biológicos estão em um estado de equilíbrio dinâmico. Uma vez coletadas, essas amostras sofrem processos microbiológicos, físicos e químicos, como por exemplo, a adsorção de elementos nas paredes do recipiente, as interações químicas com o recipiente, o crescimento de bactérias, a alteração do pH e a desnaturação de proteínas. Essas alterações afetam a integridade dessas amostras e podem introduzir erros significativos nos resultados das análises. O armazenamento dessas amostras em recipientes escuros, sob refrigeração (4 °C) ou congelamento (-5



a -20 °C), são úteis para retardar esses efeitos, mantendo assim a integridade das amostras por mais tempo [38].

Estudos sobre o armazenamento de amostras de urina para análises elementares são escassos [38]. Leach e colaboradores [42] encontraram que Na, K, Ca e Mg permanecem estáveis a - 20 °C por pelo menos 70 dias, quando as amostras de urina foram armazenadas em recipientes de polietileno.

O armazenamento à temperatura ambiente ou a 4 °C pode resultar na precipitação de Ca e Mg como fosfato, oxalato ou urato. Cornelis e colaboradores [43] descreveram que As, Cr, Cu, Hg, Sb, Se e Zn foram encontrados no precipitado de amostra de urina após dois dias da coleta. No entanto, eles não especificaram a extensão da perda. Por outro lado, Co, Cs e Rb permaneceram no sobrenadante.

Omang e Vellar [44] encontraram uma perda de aproximadamente 50 % de Ca, por adsorção ou precipitação em amostras de soro, após 9 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Enquanto que a 4 °C, essa perda foi de aproximadamente 75 % após 36 dias.

Um modo de preservar por mais tempo as amostras de urina, é a adição de HNO₃ a um pH ≤ 2, além da temperatura de refrigeração (ou congelamento). Ocasionalmente, outros reagentes químicos como clorofórmio, tolueno, formaldeído ou timol são usados para deter o crescimento bacteriano. Contudo, a urina deve ser amostrada imediatamente após sua coleta para melhores resultados [38].

3.6.3- Importância em analisar fluidos biológicos

A importância em se fazer análises em fluidos biológicos é devido a obtenção de um grande número de informações. É possível, por exemplo,



fazer o diagnóstico de várias doenças como hiperoxalúria [45], diabetes mellitus [46], etc, realizar uma investigação nutricional e metabólica [47], fazer um monitoramento terapêutico [48] e de metais [49, 50], bem como detectar o uso de drogas (como por exemplo, cocaína e maconha). Aproximadamente 17 milhões de amostras de urina são analisadas por ano, apenas para determinação de drogas. Segundo Fliss e colaboradores, tumores podem ser facilmente detectados em amostras de urina de pacientes com câncer na bexiga [51].

Matusiewicz [50] utilizou o método da nebulização discreta por espectrometria de emissão com chama para a determinação de vários elementos, entre eles Ca, Mg, Na e K, em fluidos biológicos (soro, urina, saliva, e fluido cerebro-espinal). O volume de amostra injetada foi de 110 μL e nenhuma diluição ou pré-tratamento foi realizado. Após a coleta, todas as amostras foram rapidamente congeladas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas. A exatidão do método foi verificada utilizando material de referência (urina NBS SRM 2670 e soro NIES).

Uchida e Vallee [12] determinaram Zn, Cu, Fe e Mg em soro por espectrometria de absorção atômica com chama com a técnica de nebulização discreta. Neste método, os autores empregaram apenas 100 μL da amostra após diluição com Triton X-100 sem remoção das proteínas. A comparação deste método com a desproteinização ou com ácido tricloroacético/ácido clorídrico ou com ácido nítrico foi avaliada e todos resultados foram bastante concordantes entre si, com exceção do Fe. Cerca de 360 amostras h^{-1} puderam ser analisadas para um único metal, ou 90 amostras h^{-1} para quatro metais.

Leflon e Plaquet [48] determinaram Fe, em urina de pacientes que foram tratados com deferoxamina, empregando a técnica ICP-OES. O limite de detecção estava em torno de 75 nmol L^{-1} e esse método mostrou-se



satisfatório, de acordo com a método colorimétrico envolvendo a batofenantrolina.

Flanjak e Hodda [49] descreveram um método para a determinação de Tl, Au e Ag em urina, utilizando ETAAS. Esses metais são encontrados em urina de pacientes que receberam tratamento para tuberculose, queimaduras e artrite reumatóide, respectivamente. Os autores empregaram 2,5 mL de uma solução de tri-n-octalamina juntamente com 1 mL de uma solução de KI/ácido ascórbico para a extração desses metais em 25 mL da amostra acidificada com HNO_3 (1 % v/v). A emulsão formada era removida e empregada para análises.

Petit de Peña e colaboradores [52] desenvolveram um método para a determinação de Sb por HG-AAS. Esse método foi aplicado para a determinação de Sb(III) e Sb(V) em amostras de soro sanguíneo e urina de pacientes com leishmaniose tratados com Glucantim[®]. A exatidão das análises foi avaliada através do método de adição de padrão e algumas variáveis como concentração da solução de NaBH_4 e volume da amostra foram otimizados.

Freqüentemente a creatinina é testada em amostras de urina em laboratórios clínicos para detectar doenças nos rins. Faria e Pasquini [53] determinaram creatinina em urina por espectrofotometria empregando análise de fluxo contínuo monosegmentado (MCFA). As amostras (1 mL) eram diluídas com água para 250 mL e 300 μL desta mistura eram introduzidos no sistema monosegmentado. Esse método apresentou uma velocidade analítica de 130 amostras h^{-1} . Algumas variáveis como concentração de ácido pícrico e de NaOH foram otimizadas.

Amostra de urina é amplamente usada para estudar o metabolismo de selênio [54] como também para estudos de especiação [55, 56]. Uma revisão sobre estudos de Se em urina humana foi publicado por Robberecht e Deelstra [57]. Neste trabalho, os autores discutiram sobre amostragem, tratamento da



amostra, procedimentos de determinação e níveis de concentração de Se total em amostras de urina de pessoas saudáveis.

Fluidos biológicos (sangue, urina e saliva) e fezes, foram utilizadas para estudo de cinética de absorção para o Ca utilizando a técnica espectrometria de massas por ionização térmica. Os voluntários receberam uma dose oral (133 μg) de ^{43}Ca e uma dose intravenosa (7,7 μg) de ^{46}Ca , e esses estudos foram conduzidos por até 170 horas após administração do Ca. As amostras de urina, sangue e saliva (100 - 200 μL) foram decompostas em HNO_3 e HClO_4 , e as amostras de fezes foram secas em mufla e reconstituídas em ácido clorídrico 0,3 mol L^{-1} antes da decomposição. As doses oral e intravenosa apareceram rapidamente nas amostras de urina, saliva e sangue (ca. de 5 h. após a administração) [58].

3.6.4- Urina: composição e características

A urina é um dos meios de excreção mais importantes do corpo humano [49]. Ela representa a excreção de várias substâncias do regime alimentar e produtos finais do metabolismo.

Normalmente, as substâncias encontradas na urina são sais orgânicos e inorgânicos e compostos nitrogenados. Os sais inorgânicos incluem sulfatos, fosfatos, cloretos e bicarbonatos de sódio, cálcio, magnésio, potássio e amônio, sendo o cloreto de sódio o sal mais abundante (ca. de 10 a 15 g por dia). Os compostos orgânicos mais comumente encontrados na urina são uréia, ácido úrico, creatinina, vários pigmentos como o urocromo e pequenas quantidades de aminoácidos [59].

Estão presentes também metabólitos intermediários, como piruvato e ácidos oxálico e cítrico. São encontrados metais, ácidos livres, traços de



colesterol, hormônios como os cetosteróides, estrogênios e aldosterona. Vitaminas como o ácido ascórbico, são excretadas na urina em quantidades que dependem da suficiência da ingestão alimentar. São encontrados traços de bilirrubina e pequenas quantidades de açúcares. Anderson em 1979, demonstrou mais de 200 proteínas urinárias [13].

Vários derivados de carboidratos e lipídios também podem ser encontrados, particularmente em condições patológicas [59].

A urina normal é essencialmente clara e a cor amarela é principalmente devida ao pigmento urocromo. A quantidade deste pigmento excretada por dia é relativamente constante. Conseqüentemente, quando o volume da urina formada é alta, sua cor é levemente amarela. Várias drogas podem colorir a urina, como também certos pigmentos encontrados nos alimentos [59]. É encontrado em pessoas geneticamente susceptíveis, uma urina vermelha associada com a ingestão de beterraba [13].

Aproximadamente dois terços de água ingerida é eliminada na urina, sendo que o volume médio diário no adulto normal é de 1200 a 1500 mL. Enquanto que a urina noturna geralmente não excede a 400 mL [13].

A urina normal tem um odor fraco, aromático, de origem desconhecida. O odor é principalmente importante no reconhecimento de amostras que, devido à contaminação bacteriana ao sedimentar, é amoniacal, fétido e neste caso as amostras não podem ser utilizadas para análises [13].

A acidez ou alcalinidade da urina varia com a dieta. Carnes tendem a tornar a urina ácida, enquanto que a ingestão de muitos vegetais e frutas tornam a urina alcalina. A média de pH da urina está entre 5,5 e 7,0; isto é, a urina é levemente ácida [59].



3.7 CÁLCIO E MAGNÉSIO

3.7.1- Uma visão geral

Muitos compostos inorgânicos, especialmente os íons metálicos, empregam uma função importante na fisiologia dos organismos. Alguns são indispensáveis para a vida, porém, quando presentes em excesso, podem induzir a toxicidade, e outros são tóxicos, mesmo a baixas concentrações, como é o caso do chumbo, do arsênio e do mercúrio. Assim, existe uma grande preocupação sobre os efeitos nocivos e essenciais desses elementos e, conseqüentemente, a habilidade de reconhecer e tratar doenças causadas por eles, sendo essa, uma tarefa da Química Clínica e da Saúde Ocupacional [60].

Mais de 50 elementos são encontrados no corpo humano [61], porém, existem controvérsias entre vários pesquisadores em relação aos elementos considerados essenciais para a nutrição humana. Dos elementos considerados essenciais ao homem, podemos citar, por exemplo, ferro, cobre, cobalto, manganês, zinco, sódio, cálcio, magnésio e potássio. Sendo que os quatro últimos necessitam ser ingeridos em grandes quantidades [60].

A função do cálcio nos ossos de mamíferos e outros tecidos foi reconhecida logo após a sua descoberta em 1808 por Humphry Davy [60]. Ele constitui aproximadamente 5 % da crosta terrestre na forma de rochas sedimentares de origem biológica datando de cerca de três bilhões de anos [62]. Na água do mar, a concentração total de cálcio é cerca de 5 a 50 vezes maior do que em água doce. A concentração de cálcio em água da torneira varia com a localização, e concentrações acima de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ é usualmente classificadas como “água dura”. Num adulto humano, a concentração de Ca no soro é cerca de $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ [60].



Embora compostos de cálcio sejam considerados relativamente inofensivos para todos os organismos, e sendo o elemento considerado um metal não industrialmente perigoso, tem sido reconhecido que compostos de Ca podem ser perigosos na forma de poeiras, devido aos seus efeitos mecânicos sobre a integridade dos tecidos dos pulmões [62].

O metabolismo do Ca é regulado por vários sistemas hormonais e isso sugere que o próprio Ca seja facilmente manipulado pelo corpo, não sendo, portanto, tóxico [62].

Em geral, aproximadamente 30 % do Ca proveniente da dieta é absorvido. A absorção do Ca no intestino é controlada por proteínas ligadas especificamente ao Ca [62].

Com relação ao magnésio, este é encontrado nos minerais dolomita, magnesita e carnalita e em uma variedade de águas naturais, incluindo águas do mar. Ele é o oitavo elemento mais abundante na crosta terrestre e é de importância fundamental e absoluta para todos os seres vivos, uma vez que ele é o metal central empregado pela clorofila [61].

A ingestão normal recomendada para os adultos é cerca de 500 mg/dia. Uma vez que magnésio é essencial para todos os seres vivos em uma ampla faixa de concentração, não existe nenhum perigo de toxicidade, exceto no caso de compostos onde o próprio ânion seja tóxico. Sais de magnésio são perigosos oralmente somente se consumidos em grandes quantidades ou na presença de deficiência renal, sendo observado sintomas como vômitos e diarreia [62].

A absorção intestinal do magnésio ingerido é relativamente baixa, aproximadamente 25 - 30 % [62].



3.7.2- Cálcio e magnésio no organismo

O cálcio é o elemento mais abundante no corpo humano e compreende 1,5 - 2,0 % do peso total do corpo. No corpo humano, mais de 99 % do cálcio está armazenado nos ossos, o qual atua como um componente estrutural, além de ser uma fonte vital de cálcio para a manutenção da homeostase. A quantidade restante de cálcio no corpo está presente no fluido extracelular, tecidos moles e como um componente de várias estruturas de membrana. O íon cálcio tem um papel fundamental na hidrólise do ATP e é um cofator na ação catalítica de várias enzimas. No soro, o cálcio existe em três formas: ionizado ou livre (Ca^{2+}), o qual corresponde por aproximadamente 50% do cálcio total, ligado a proteínas, primariamente a albumina, (o qual corresponde por 40%) e uma pequena fração (*ca.* 10 % do total) que está complexada com ânions como fosfato, bicarbonato, citrato e lactato [63]. Aproximadamente 800 mg/dia é a ingestão normal recomendada para os adultos [13].

Vários tipos de doenças tem sido associadas com níveis alterados de cálcio, tais como raquitismo, acidoses, osteoporose, síndrome de Cushing, hiperparatiroidismo e cálculo renal, entre outras. Uma diminuição de íons cálcio no soro resulta em tétano, enquanto que um aumento pode causar deficiência cardíaca ou respiratória. Assim sendo, existe uma necessidade contínua de obter-se dados quantitativos na sua ocorrência em materiais biológicos [64].

O magnésio ocorre amplamente no corpo humano, sendo o segundo cátion mais abundante no fluido extracelular (depois do potássio). No corpo humano, os ossos é o local de maior armazenamento de magnésio (*ca.* 65 % do total), seguido pelo fluido intracelular (34 %) [62] e aproximadamente 1% de Mg^{2+} pode ser encontrado no fluido intersticial. No soro, cerca de 33 % do



magnésio total está ligado às proteínas, 53% está como íon livre e os outros 13% formam complexos com fosfato e citrato. O magnésio participa de várias reações bioquímicas. Ele é o cofator de mais de 300 processos enzimáticos, atua na ativação do ATP/ADP e é usado na síntese intracelular dos ácidos nucleicos [65]. Ele tem também um papel importante na síntese e degradação do DNA, transmissão neuromuscular, metabolismo normal de potássio e cálcio em homens adultos e é essencial para a mobilização de cálcio nos ossos. O íon magnésio é um neurotrópico com ação tranquilizante sobre a excitabilidade dos músculos liso e estriado, sendo indispensável para funcionamento correto dos rins e do sistema imunológico [66].

Um grande número de síndromes têm sido atribuídas pela deficiência de magnésio. Estes incluem infarto do miocárdio, insuficiência cardiovascular, arritmias cardíacas, espasmos na artéria coronária, tetania e hipocalcemia. [66]. O coração, com sua alta atividade metabólica, é especialmente vulnerável à deficiência de magnésio, provavelmente por causa da importância deste elemento em reações que fornecem ATP [67].

3.7.3- Determinação de cálcio e magnésio em amostras biológicas

Desde o início de 1950, os métodos usados para a determinação de cálcio e magnésio eram em grande parte insatisfatórios. Para o cálcio, os métodos clássicos envolviam a precipitação de Ca como oxalato, seguida pela dissolução deste precipitado em ácido sulfúrico e titulação com solução de permanganato [68]. Mas a reprodutibilidade dos resultados dependia do modo exato como as operações eram realizadas, sendo que eles tendiam a serem baixos. No caso do magnésio, o método padrão para sua determinação envolvia a separação do metal por precipitação como fosfato de amônio e



magnésio [68], mas o método além de consumir bastante tempo, produzia resultados inexatos que poucos laboratórios esforçavam-se por colocar em análises de rotina. A determinação do magnésio era difícil devido à baixa intensidade do espectro de emissão e interferência de outros compostos. Após a invenção dos espectrômetros de absorção atômica, em meados de 1960, muitos laboratórios expressaram um grande interesse na possibilidade de seu uso para a determinação de Na, K, Ca e Mg [68].

Para diagnósticos médicos, a determinação de Ca, tanto na forma livre, como a concentração total, é de grande importância. A determinação de Ca na forma livre, também chamado cálcio ionizado, é bem estabelecida em análises clínicas e tem se tornado um procedimento de rotina por meio da potenciometria com eletrodos íon seletivo. Com um sensor padrão, o eletrodo de Ca é usado com o ionóforo neutro ETH 1001 [69].

Anker e colaboradores [70] descreveram um procedimento para a determinação de Ca total em soro através da acidificação da amostra a um pH onde os complexos de Ca apresentam-se completamente dissociados. Isso era feito diluindo a amostra 20 vezes com o tampão acetato (pH 3,5). O procedimento desenvolvido por Manzoni e Premoli [71] é baseado na descomplexação do Ca por diluição e adição de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de íons zinco para deslocar o restante do Ca ligado a proteínas e outros complexos. Esse procedimento requer uma preservação muito rigorosa das condições experimentais (acidez e concentração dos íons zinco).

Muitas técnicas analíticas empregadas para a determinação de magnésio, dão informações sobre a quantidade total deste elemento na amostra. Para a determinação direta de magnésio ionizado, são empregados potenciometria usando eletrodo íon seletivo (ISE) e fluorescência molecular.

Existem poucos trabalhos publicados com respeito ao magnésio ligado a



proteínas. Matsushita [72] determinou proteína livre e proteína ligada ao cálcio e magnésio em soro sanguíneo pelo uso de ultrafiltração seguido pela cromatografia iônica. A ultrafiltração do soro era realizada após a adição de EDTA para libertar o metal. Matsushita [72] encontrou que a quantidade de proteína ligada ao cátion era de aproximadamente 32 %. Kroll e Elin [73] estimaram que dos 33 % de magnésio ligado a proteínas, 25 % estava ligado a albumina e 8 % a globulina. Godlewska e colaboradores [74] estudaram a especiação de magnésio ligado a proteína em soro humano utilizando técnicas como ETAAS e HPLC, onde encontraram que magnésio está associado principalmente com albumina e globulina, mas não com transferrina.

Stegmann e colaboradores [75] determinaram razões isotópicas de Mg em amostras de urina, plasma e sangue humano, e músculo bovino. As medidas foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa com ionização térmica. As amostras (0,1 - 0,2 g) foram decompostas usando um forno de microondas com frascos de alta pressão/temperatura e uma mistura de 2 mL de HNO₃ e 0,5 mL HCl. O tempo de decomposição foi de 10 min. a 450 W.

van Staden e Taljaard [76] determinaram cálcio em água, urina e produtos farmacêuticos através de um método espectrofotométrico que consistiu numa reação de complexação entre o cálcio e a cresolftaleína complexona (CPC), um indicador metalocrômico. Esse indicador reage com o Ca para formar os complexos Ca(CPC)⁴⁻, CaH(CPC)³⁻ e Ca₂(CPC)²⁻. Eles empregaram um sistema de análise por injeção seqüencial completamente computadorizado, o qual apresentava uma velocidade analítica de 43 amostras h⁻¹. O Mg apresentava interferência a uma concentração acima de 50 mg L⁻¹.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação e acessórios

Os seguintes instrumentos e materiais foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho:

- Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS), marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 300 equipado com um corretor de fundo de deutério e um sistema óptico de duplo feixe;
- Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), marca Perkin Elmer, modelo Optima 3000 DV;
- Lâmpadas de catodo oco de cálcio e de magnésio, marca Perkin Elmer;
- Agitador magnético, marca Cole Parmer, modelo 84000-00;
- Agitador magnético com efeito vortex, marca Barnstead/Thermolyne, modelo M37615;
- Potenciômetro, marca Digimed, modelo D20, para medidas de pH das amostras;
- Bomba peristáltica com oito canais e velocidade variável, marca Ismatec, modelo IPC;
- Injetor comutador confeccionado em acrílico;
- Tubos de Tygon com diâmetro interno de 2,8 mm para o transporte das amostras e do ácido nítrico, no sistema de decomposição;
- Forno de microondas caseiro da marca CCE, modelo M-34, com potência máxima de 659 W;



- Tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,7 mm para a confecção das alças de amostragem e linhas de transmissão do sistema de fluxo empregado;
- Tubos de Teflon[®] com diâmetro interno de 2,0 mm para a confecção das bobinas de decomposição;
- Válvula de acrílico para o aprisionamento das amostras no interior do forno de microondas;
- Detector de vazamento de microondas, marca Micronta (Hong-Kong/China);
- Computador Pentium 166 MHz, com 16 Mb de memória RAM e 1,2 Gb de memória ROM;
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE 200;
- Desionizador de água, marca Sybron/Barnstead, modelo D2782;
- Interface PCL 711S, fabricante PC Multilab;
- Vidrarias e outros materiais, comuns em um laboratório de química analítica.

4.2 Reagentes e soluções

Os reagentes listados foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho e possuem grau analítico.

- Ácido nítrico concentrado, densidade 1,40 g mL⁻¹, 65 % (m/v) e massa molar 63,01. Marca Merck.
- Ácido clorídrico concentrado, densidade 1,19 g mL⁻¹, 36 % (m/v) e massa molar 36,46. Marca Merck.



- Peróxido de hidrogênio, densidade $1,11 \text{ g mL}^{-1}$, 30 % (v/v) e massa molar 34,01. Marca Merck.
- Carbonato de cálcio (CaCO_3), massa molar 100,09. Marca Mallinckrodt.
- Nitrato de magnésio hexahidratado [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], massa molar 256,41. Marca Merck.
- Óxido de lantânio (La_2O_3), P.M. 325. Marca ICN Biomedicals inc.
- Sulfato de cobalto (II) heptahidratado ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), P.M. 281,10. Marca Carlo Erba.
- Nitrato de cobre (II) trihidratado [$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], P.M. 241,60. Marca Synth.
- Níquel em pó PA, P.M. 58,71. Marca Vetec Química Fina Ltda.
- Nitrato de zinco hexahidratado [$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], massa molar 197,49. Marca Ecibra.
- Cloreto de crômio (III) hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), massa molar 266,45. Marca Vetec Química Fina Ltda.
- Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), massa molar 294,19. Marca Synth.
- Nitrato de chumbo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$], massa molar 331,20. Marca Ecibra.
- Dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4), massa molar 136,09. Marca Merck.
- Cloreto de cádmio monohidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), massa molar 201,32. Marca Merck.
- Cloreto de sódio (NaCl), massa molar 58,44. Marca Synth.
- Nitrato de sódio (NaNO_3), massa molar 84,99. Marca Nuclear.
- Nitrato de potássio (KNO_3), massa molar 101,11. Marca Nuclear.
- Nitrato de ferro nanohidratado [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$], massa molar 404,00. Marca Merck.



- Nitrato de manganês tetrahidratado $[\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, massa molar 251,01. Marca Ecibra.
- Nitrato de alumínio nanohidratado $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$, massa molar 375,13. Marca Ecibra.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água destilada/desionizada e foram acondicionadas em frascos de polietileno. A relação das soluções empregadas neste trabalho encontram-se a seguir:

- Soluções de ácido nítrico de 0,014 - 4,0 mol L⁻¹.
- Solução estoque de cálcio: 1000 mg L⁻¹, marca Mallinckrodt. Preparada dissolvendo-se 1,254 g de carbonato de cálcio em 20 mL de ácido clorídrico concentrado e completando-se o volume para 500 mL com água desionizada.
- Soluções de trabalho de Ca (2 - 5 mg L⁻¹) em ácido nítrico 0,014 mol L⁻¹ e cloreto de lantânio, de concentração final de 1 % m/v (de La), preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque de cálcio.
- Solução estoque de magnésio: 1000 mg L⁻¹, marca Merck. Preparada dissolvendo-se 5,276 g de nitrato de magnésio em 5 mL de ácido nítrico concentrado e completando o volume para 500 mL com água desionizada.
- Soluções de trabalho de Mg (0,2 - 0,5 mg L⁻¹) em ácido nítrico 0,014 mol L⁻¹ e cloreto de lantânio, de concentração final de 1 % m/v (de La), preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque de magnésio.
- Solução de cloreto de lantânio: 10 % (m/v), marca ICN Biomedicals inc. Preparada pela dissolução de 58,65 g de óxido de lantânio em 150 mL de ácido clorídrico concentrado e completando o volume para 500 mL com água.



4.3 Amostras

Primeiramente, foram utilizadas amostras de urina de um único voluntário até a otimização dos parâmetros estudados e, posteriormente, foram utilizadas amostras de urina obtidas do Hospital das Clínicas da Unicamp e de alguns voluntários do próprio laboratório onde essa dissertação foi desenvolvida.

5. METODOLOGIA

5.1 Condições de segurança

O forno de microondas utilizado para o preparo das amostras não sofreu nenhuma modificação nos seus componentes eletrônicos; no entanto, seis orifícios de aproximadamente 4 mm foram feitos atrás do forno, com auxílio de uma furadeira, para introdução das bobinas de decomposição.

É importante assegurar que nenhum vazamento de radiação das microondas esteja ocorrendo. Medidas para detectar radiação das microondas devem sempre serem realizadas nas proximidades do equipamento. Segundo uma lei federal dos Estados Unidos de 1968, o limite tolerável para o vazamento de energia de um forno de microondas de 2450 MHz é de no máximo 5 mW cm^{-2} , a uma distância de 5 cm do equipamento. Para checar a ocorrência de vazamentos, foi empregado um medidor de microondas [3].

Foi posicionado um bequer de 100 mL, contendo 60 mL de água, no interior do forno de microondas para se evitar danos ao magnetron. Este procedimento foi necessário pois os volumes injetados das amostras eram muito pequenos (150 - 400 μL) quando comparado com o volume da cavidade do forno (aproximadamente 30 litros). A cada ciclo de atuação das



microondas, esse volume de água (60 mL) era substituído por outro, sempre na temperatura ambiente.

5.2 Calibração do forno de microondas

Antes de iniciar os experimentos de solubilização das amostras pelo forno de microondas, fez-se primeiro sua calibração, para relacionar a potência disponível (em watts) com as unidades arbitrárias do equipamento (%).

A calibração do forno de microondas foi feita de modo semelhante ao recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, Environmental Protection Agency) [3]. Para os equipamentos do tipo cavidade isto é feito através da medida da variação de temperatura de 1,00 Kg de água exposta à radiação de microondas em um determinado período de tempo.

O forno de microondas caseiro utilizado neste trabalho, possui 11 níveis de potência e sua calibração foi realizada aquecendo 1000 g de água por 120 s, e mediu-se a temperatura inicial (T_i) e a temperatura final (T_f). Os experimentos foram executados em triplicata e nas potências de 0 a 100 %, com incrementos de 10.

A equação a seguir foi utilizada para o cálculo da potência disponível no forno de microondas [3]:

$$\text{Potência (W)} = \frac{K \cdot cp \cdot m \cdot \Delta T}{t}$$

onde:

K = fator de conversão de calorias/s para watts (= 4,184 W cal⁻¹ s)

cp = calor específico da água (1,00 cal g⁻¹ °C)

m = massa de água utilizada em gramas (g)

$\Delta T = T_f - T_i$

t = tempo de aquecimento



Para $m = 1000 \text{ g}$ e $t = 120 \text{ s}$, a equação pode ser simplificada para:

$$\text{Potência (W)} = 34.87 \Delta T$$

5.3 Investigação da distribuição das microondas no interior no forno

A maioria dos fornos de microondas convencionais utilizados em laboratórios analíticos possuem espalhadores para espalharem as microondas de uma maneira uniforme na cavidade do forno. Na ausência desse dispositivo, algumas regiões no interior do forno podem receber grandes quantidades de energia, enquanto que outras, podem receber uma quantidade quase que negligenciável [3]. Assim, fez-se uma investigação da distribuição das microondas dentro da cavidade do forno de microondas caseiro, uma vez que esses tipos de fornos não possuem um dispositivo para espalharem as microondas no seu interior, e nem há como deixar as bobinas de decomposição no prato giratório. Para este propósito, foram empregados béqueres de 100 mL, contendo 50 mL de água em cada um deles. O prato giratório do forno foi removido e os béqueres, previamente pesados, foram distribuídos em 27 posições no interior do forno, sendo que o aquecimento de cada béquer foi realizado individualmente. A Figura 2a mostra o posicionamento dos béqueres no interior do forno de microondas juntamente com as três alturas investigadas. Um béquer de plástico de 100 mL foi empregado como suporte quando fez-se a investigação das microondas na altura de 6,5 cm acima da superfície do forno e quando fez-se a investigação das microondas na altura de 13,0 cm acima da superfície do forno, foi empregado um béquer de 1000 mL. A Figura 2b mostra o posicionamento mais detalhado dos béqueres no interior do forno de microondas.

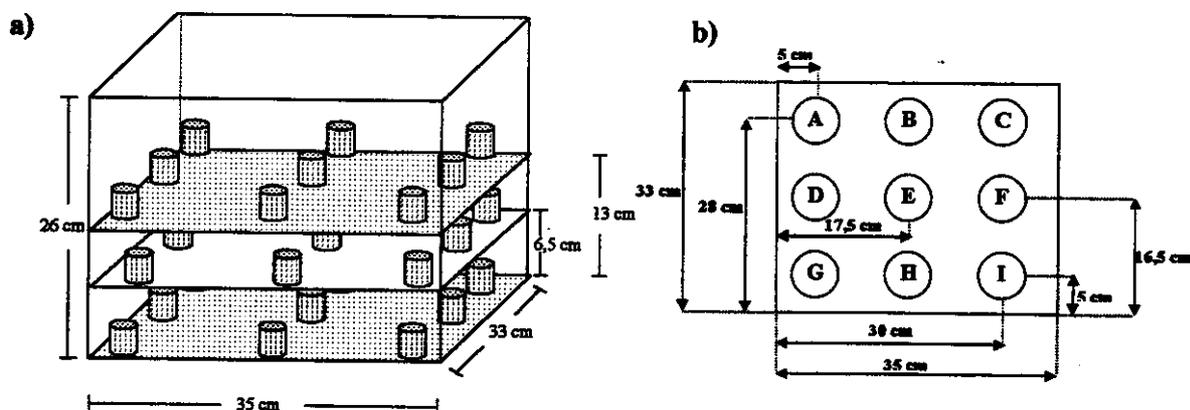


Figura 2: (a) Posicionamento dos béqueres de acordo com as três alturas investigadas e (b) posicionamento mais detalhado dos béqueres no interior do forno de microondas

O forno foi acionado por 1 minuto à potência máxima (659 W) e, após resfriados, os béqueres foram novamente pesados e a diferença de massa foi obtida. Cada experimento foi realizado em duplicata.

5.4 Decomposição das amostras pelo forno de microondas caseiro para a determinação de cálcio e magnésio

A Figura 3 ilustra o sistema empregado para a decomposição das amostras. Além do sistema de fluxo e do forno de microondas, fez parte também desse sistema, um computador Pentium e uma válvula de acrílico para manter a amostra no interior do forno de microondas. Foi utilizada também uma interface PCL 711 S para o controle da decomposição e um programa escrito em Visual Basic[®] 3.0, cuja finalidade era controlar o funcionamento da bomba peristáltica, a válvula de acrílico, o forno de microondas e o posicionamento do injetor (amostragem ou injeção).

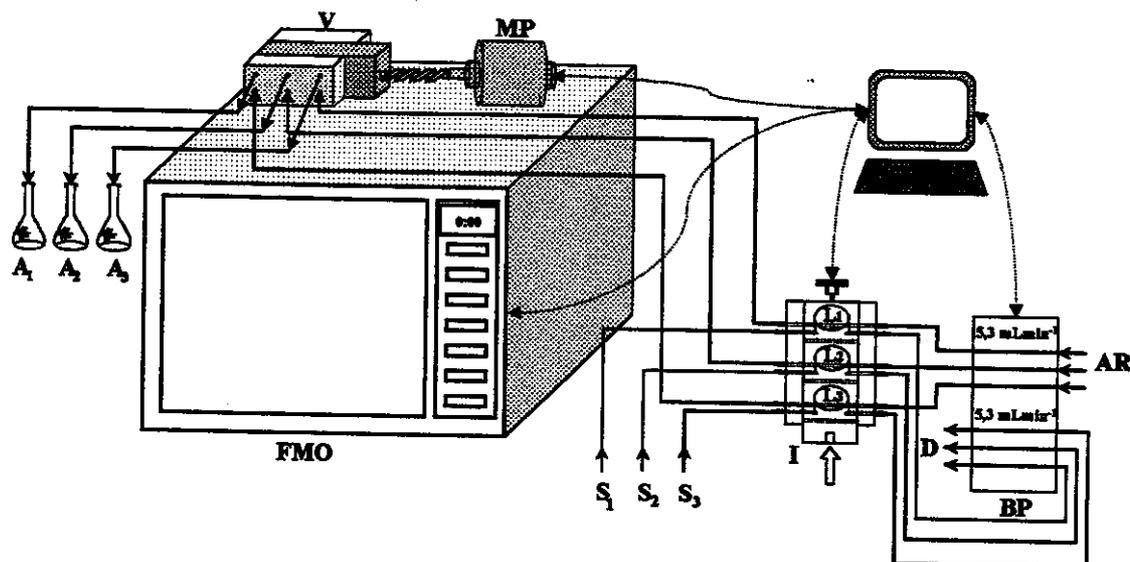


Figura 3: Sistema utilizado na decomposição das amostras de urina. $A_1 - 3$: amostras decompostas; MP: motor de passo; V: válvula para manter a amostra dentro do forno de microondas; FMO: forno de microondas; $S_1 - 3$: amostra/ácido nítrico; $L_1 - 3$: loop de amostragem; BP: bomba peristáltica; I: injetor comutador e D: descarte.

A eficiência da decomposição pelo forno de microondas depende de vários fatores, como por exemplo: a natureza da amostra, a potência do forno, o tempo de atuação das microondas, a quantidade de amostra e o ácido empregado. No caso dos fornos de microondas que utilizam frascos fechados, a pressão e a temperatura são outros fatores relevantes. Dentre esses parâmetros, a escolha do ácido é importante. Vários ácidos concentrados, como HNO_3 , HCl , H_2SO_4 ou uma mistura desses ácidos tem sido usados para auxiliar na decomposição das amostras [77].

Assim, as variáveis que foram investigadas no intuito de otimizar o procedimento de decomposição foram: a concentração do HNO_3 , a qual foi estudada num intervalo de 0 - 4 mol L^{-1} , a potência do forno (20 a 100%), o tempo de atuação das microondas (0 a 6 minutos) e o volume de amostra injetado no sistema de fluxo (150, 200, 300 e 400 μL da mistura



amostra/ácido). Esses experimentos foram realizados em triplicata e sempre havia um “branco” para cada condição estudada.

Uma mistura do fluido biológico (urina) e do HNO_3 foi empregada para estudo da decomposição das amostras pelo forno de microondas. O sistema permitiu que três amostras fossem injetadas e decompostas simultaneamente, visto que possui três bobinas de decomposição (em politetrafluoretileno - PTFE) inseridas na cavidade do forno de microondas. Cada bobina possuía aproximadamente 2 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno. Assim, três alíquotas da mistura amostra/ácido foram introduzidas em um fluxo transportador de ar, sendo bombeadas por 60 segundos até as bobinas de decomposição. Entre o injetor e as bobinas de decomposição, foi posicionada uma válvula construída em acrílico com a finalidade de interromper a passagem do fluxo e, conseqüentemente, aprisionar a amostra no interior do forno de microondas. Passado o “tempo de residência” de 60 s, a válvula foi acionada automaticamente pelo computador, a amostra aprisionada no interior do forno, e o forno de microondas foi também ligado automaticamente pelo computador. Terminado o tempo de radiação, a válvula foi novamente acionada, permitindo que as amostras decompostas fossem bombeadas para os respectivos balões volumétricos de 50 mL e um volume de 5 mL de uma solução de cloreto de lantânio (10 % m/v) foi adicionado. Uma solução de HNO_3 0,014 mol L^{-1} foi introduzida no sistema de fluxo para limpar o sistema de transmissão e completar o volume do balão volumétrico.

As concentrações de cálcio e magnésio presentes nas amostras foram determinadas utilizando-se espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS).

A Tabela 1 mostra as condições usadas na determinação de cálcio e magnésio por espectrometria de absorção atômica por chama.



Tabela 1: Condições empregadas na determinação de Ca e Mg.

	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	422,7	285,2
Largura da fenda (nm)	0,7	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	10	6
Fluxo do acetileno (L min ⁻¹)	3,0	2,5
Fluxo do ar (L min ⁻¹)	10,0	10,0
Curva analítica (mg L ⁻¹)	0 - 5,0	0 - 0,5

5.5 Estudo da estabilidade da amostra de urina

Amostras biológicas estão propensas a contaminação externa, enquanto que a urina, a qual é supersaturada à temperatura ambiente, tem o problema adicional de precipitação seguido a coleta. Essa precipitação varia entre as espécies de animais [78]. Na maioria das vezes, ocorre contaminação bacteriana, resultando na sua alcalinização devido a conversão de uréia em amônia pela espécie *Proteus*. A turvação se desenvolve à medida que as bactérias se multiplicam, ocorrendo a precipitação de proteínas e outras substâncias como urato. A cor muda (usualmente escurece) e o odor se torna desagradável. Contudo, se uma grande quantidade de glicose estiver presente (acima de 130 mg/24 horas), as bactérias e leveduras irão convertê-la em ácidos e álcoois e o pH diminui. Por isso, é fundamental que as amostras sejam analisadas rapidamente, ou refrigeradas e analisadas tão cedo quanto possível [13]. Assim, foi realizado um estudo sobre o tempo de utilização da amostra para análise após sua coleta. As amostras foram somente refrigeradas e não houve a adição de qualquer tipo de conservante químico, o qual usualmente age como agente antimicrobiano. Amostras de quatro voluntários, (dois homens e duas mulheres) coletadas pela manhã, foram utilizadas para esse teste, que consistiu em avaliar a amostra em termos de sua aparência (cor,



claridade), odor e medida de pH. Essas amostras foram coletadas no mesmo dia, pela manhã, na primeira expelida e refrigeradas sob as mesmas condições, onde a temperatura de refrigeração estava em torno de 4 °C. As leituras de pH foram realizadas com auxílio de um potenciômetro (marca Digimed, modelo D20) e de um eletrodo de vidro.

5.6 Estudo dos diferentes tipos de coletas

Existem quatro tipos de coletas que podem ser feitas para as amostras de urina: (1) aleatória, (2) cronometrada, (3) volume total de 24 horas e (4) primeira coleta da manhã. As amostras aleatórias são colhidas a qualquer hora. Muitos resultados de amostras aleatórias são expressos como “positivo” ou “negativo” indicando a presença ou a ausência de um componente em particular, como a glicose, por exemplo. As amostras cronometradas são obtidas em intervalos determinados, começando pelo “tempo zero”. Por exemplo, no teste de tolerância à glicose, as coletas são feitas a 0, 30, 60, 120 e 180 minutos [13]. As amostras de urina de 24 horas são mais difíceis de serem obtidas e requerem muita cooperação do paciente. As coletas incompletas são o maior problema. Em algumas circunstâncias ocorre uma hipercoleta. As amostras coletadas ao se levantar geralmente são as mais concentradas, além disso, o fato da urina ter sido produzida após uma noite em jejum torna as análises mais significativas para algumas investigações, uma vez que os resultados são menos afetados por recentes refeições [13]. Assim, foi realizado um estudo considerando esses dois últimos tipos de coleta com o intuito de avaliar se existe alguma diferença na quantidade de cálcio e magnésio presente nas amostras mudando-se apenas a coleta. No caso da coleta de 24 horas, a primeira amostra do dia é descartada e faz-se toda a



coleta da urina subsequente, até a primeira do dia seguinte. O volume total dessa amostra é determinado e a urina é rigorosamente homogeneizada antes que uma alíquota seja retirada para análise. Nesse estudo, empregou-se apenas uma amostra de um voluntário, a qual foi decomposta pelo forno de microondas à potência máxima (659 W) por um minuto e HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Calibração do forno de microondas

A Figura 4 mostra o resultado obtido na calibração do forno de microondas caseiro.

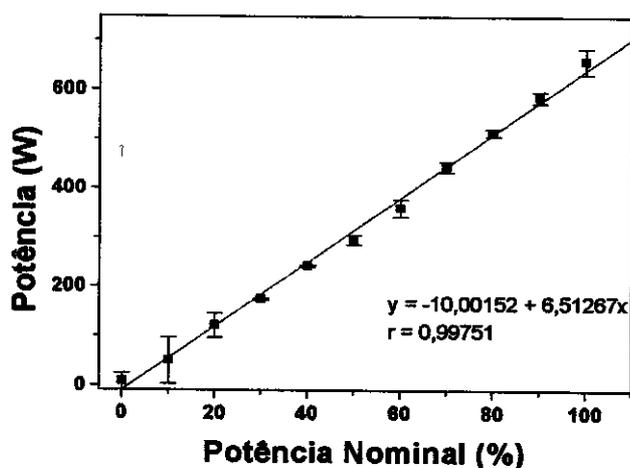


Figura 4: Curva da potência real obtida para o forno de microondas caseiro (CCE – M 34).

O forno caseiro empregado nos experimentos permite a seleção de 11 níveis distintos de potência. A Tabela 2 mostra a potência real em cada nível selecionado.



Tabela 2: Níveis de potência do forno de microondas caseiro

Nível selecionado	Potência real (W)	Porcentagem de potência
P10	659,03	100
P9	585,83	90
P8	514,35	80
P7	444,00	70
P6	360,90	60
P5	296,40	50
P4	242,35	40
P3	175,53	30
P2	122,05	20
P1	50,55	10
P0	10,95	0

Como podemos observar (Figura 4 e Tabela 2), o maior nível de potência (100 %) fornece, na realidade, 659 W e não 900 W, como descreve o fabricante. De acordo com Kingston e Jassie [3] essa diferença entre a potência teórica e a experimental pode ser devida à variação na corrente elétrica durante a calibração do forno e, segundo os autores, essa variação não pode ser maior do que ± 2 V; e também pela perda de calor no próprio magnetron, já que aproximadamente 300 W são perdidos dessa forma [3].

6.2 Investigação da distribuição das microondas no interior do forno

A investigação da distribuição das microondas no interior de um forno de microondas é um parâmetro importante, pois é possível conhecer a região de maior incidência das microondas e, conseqüentemente, obter melhores resultados para a decomposição das amostras. Essa investigação foi fundamental, pois o forno empregado para a decomposição das amostras era

um forno caseiro que não possui um dispositivo para espalhar as microondas no seu interior.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam as superfícies de resposta obtida pela perda da massa de água em função das dimensões do forno (comprimento x largura) para os béqueres posicionados na base, a 6,5 e a 13 cm de altura, respectivamente.

Nessas figuras, o eixo do comprimento é onde está localizada a porta do forno. Nesse mesmo eixo, os valores -1, 0 e +1, correspondem aos béqueres posicionados na parte esquerda (5 cm), central (17,5 cm) e direita (30 cm) do interior do forno, respectivamente. No eixo representado pela largura, esses mesmos valores (-1, 0 e +1) correspondem aos béqueres posicionados na frente (5 cm), no centro (16,5 cm) e no fundo (28 cm) da cavidade do forno, respectivamente. Assim, por exemplo, um béquer colocado na parte esquerda do forno e no fundo, é representado pelo comprimento -1 e largura +1 (ver Fig. 2b béquer na posição A).

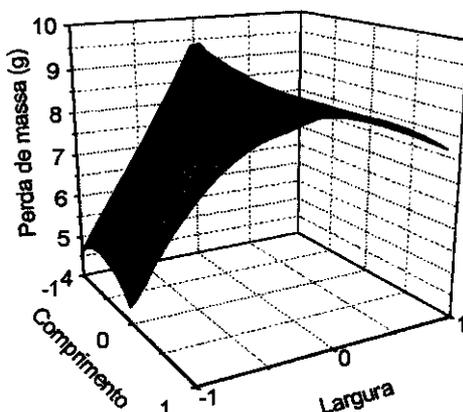


Figura 5: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos na base do forno, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima. Outras variáveis, ver texto.

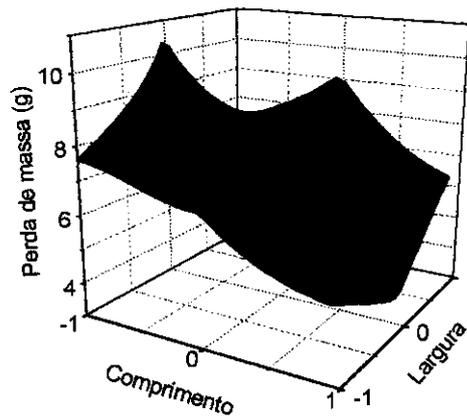


Figura 6: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos a 6,5 cm de altura, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima. Outras variáveis, ver texto.

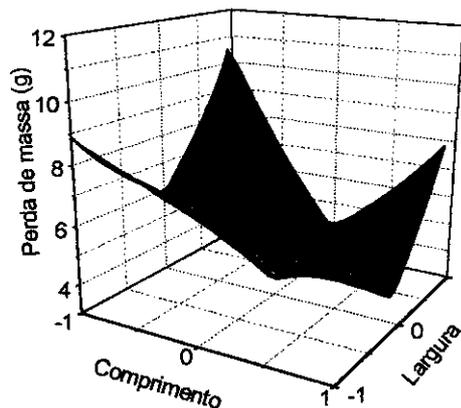


Figura 7: Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos béqueres distribuídos a 13 cm de altura, devido a atuação das microondas por 1 min. à potência máxima. Outras variáveis, ver texto.

Pela análise da Fig. 5, podemos observar que o local de maior perda de massa de água foi ao longo da região central do forno ($\text{largura} = 0$) que corresponde a uma distância de 16,5 cm da porta, sendo essa perda de aproximadamente 9,5 g. Já para a Fig. 6, que corresponde aos béqueres colocados a 6,5 cm de altura, a região que apresentou maior perda de massa de água foi do lado esquerdo do forno ($\text{comprimento} = -1$) e no centro ($\text{largura} = 0$), sendo essa perda cerca de 10,5 g. Os resultados obtidos pela Fig. 7,



ilustram que, novamente, o lado esquerdo do forno (comprimento = -1) foi o local de maior perda de massa de água, porém, na profundidade do mesmo (largura = +1), sendo essa perda de 10,5 g.

Como podemos observar em todas essas figuras, o lado esquerdo da parte interna do forno apresentou um efeito mais pronunciado de atuação das microondas, sendo que a perda de massa de água foi praticamente a mesma para as alturas estudadas (9,5 - 10,5 g). Assim, escolhemos posicionar as bobinas de decomposição do lado esquerdo e a uma altura de 6,5 cm. Na parte frontal do forno (largura = -1) e no centro (comprimento = 0), onde foi observado uma perda de massa de água de aproximadamente 4,5 g foi colocado um béquer com aproximadamente 60 mL de água para prevenir danos ao magnetron, uma vez que os volumes contidos nas bobinas de decomposição são bastante reduzidos, quando comparados com o volume do forno.

Para checar a ocorrência de vazamentos foi empregado um medidor de microondas e em nenhum momento ocorreu vazamento das mesmas.

Foi realizada também uma investigação utilizando um papel para fax, o qual é termossensível, a fim de obter mais um dado a respeito da distribuição das microondas no interior do forno. Toda base do forno foi revestida por esse papel e foi utilizado um tempo de seis minutos à potência máxima (659 W). A Figura 8 a seguir ilustra o resultado obtido.

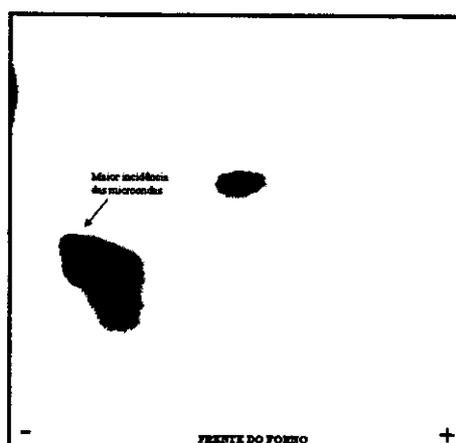


Figura 8: Resultado da incidência das microondas durante 6 min. sobre o papel de fax posicionado na base do forno (potência máxima - 659 W). Os sinais - e + indicam a parte esquerda e direita do forno, respectivamente.

A região escura corresponde à “queima” do papel pelas microondas e como podemos observar, essa região é exatamente do lado esquerdo do forno, na região mais central, ou seja, novamente verificamos que o lado esquerdo da parte interna do forno é a região de maior atuação das microondas. Assim, esse experimento veio corroborar com aqueles já feitos anteriormente.

6.3 Sistema de fluxo: investigação da alça de amostragem

Pelo estudo da quantidade da mistura amostra/ácido injetada no sistema de decomposição, observou-se que o melhor resultado, tanto para o cálcio como para o magnésio, foi empregando o volume de 200 μ L (Figuras 9 e 10). Isso provavelmente ocorreu porque com menores volumes de amostra, a energia das microondas é mais intensa sobre a mesma, tornando a decomposição mais eficiente. O volume de 150 μ L embora tenha apresentado resultados próximos aos obtidos quando do emprego de um volume de 200 μ L, apresentou um desvio padrão absoluto significativo (64 para o Ca e 7,72 para o Mg). A razão disso deve-se ao fato de, ao se trabalhar com volumes

menores, qualquer variação nas condições de decomposição, como por exemplo reprodutibilidade ao injetar as amostras no sistema de fluxo, resulta em um maior desvio dos resultados. Para volumes maiores, as condições empregadas não se mostraram adequadas, apresentando resultados inferiores. Isso pode ser observado para os dois metais estudados. Provavelmente isso ocorreu porque com maiores volumes injetados, a eficiência da decomposição através das microondas não é a mesma quando comparado quando empregava-se volumes menores.

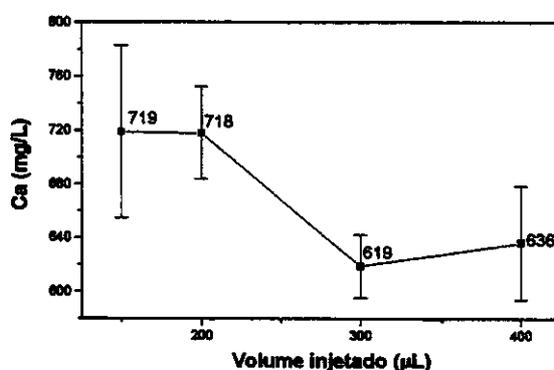


Figura 9: Concentração de cálcio presente na amostra de urina em função do volume injetado. As linhas verticais correspondem ao desvio padrão de cada condição estudada.

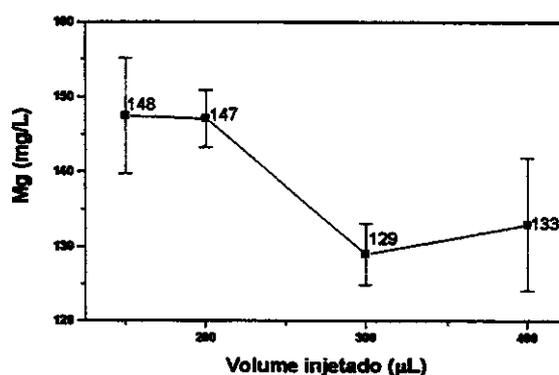


Figura 10: Concentração de magnésio presente na amostra de urina em função do volume injetado. As linhas verticais correspondem ao desvio padrão de cada condição estudada.



6.4 Investigação das condições de decomposição

A urina é um dos meios mais importantes de excreção do corpo. Assim como o sangue, ela é uma matriz complexa e sua composição é tão variável que pode dar origem a sérios e imprevisíveis efeitos de matriz, além do seu elevado conteúdo salino e da presença de vários constituintes orgânicos [39, 79]. Assim, poucos elementos podem ser determinados por espectrometria atômica por chama (FAAS) envolvendo somente diluições. Além disso, a urina não tratada ou tratada inadequadamente tende a criar espuma, dificultando sua nebulização. A liberação do analito ou a destruição da matéria orgânica podem ser alcançados por completa solubilização da amostra ou por um simples tratamento brando da urina com HNO_3 , ácido tricloroacético ou H_2O_2 [79]. Assim, foi investigado o emprego do forno de microondas caseiro para a decomposição de amostras de urina humana. As amostras utilizadas para análise foram de um único voluntário, até a otimização dos parâmetros estudados, sendo essa amostra de uma mulher adulta, a qual nunca teve indícios de problemas relacionados com pedras nos rins ou bexiga, ou alguma infecção urinária. Essas amostras foram coletadas pela manhã (primeira expelida) em recipientes de plástico, limpos e secos, lavados com HCl a 10 % (v/v) e enxaguados com água desionizada. Quando não eram usadas para decomposição logo após serem coletadas ou antes de duas horas da coleta, as mesmas eram refrigeradas até o uso, sendo que todas as decomposições ocorreram no mesmo dia da coleta. Tanto o volume (130 - 160 mL) como o pH (5 - 6) foram medidos após as coletas.



6.4.1- Avaliação do efeito da potência do forno

A potência do forno de microondas foi investigada num intervalo de 20 a 100%. Observamos que para o cálcio (Fig. 11), houve um aumento na sua extração quando era empregada a potência máxima (100 %), sendo essa extração cerca de 1,3 vezes maior do que quando se empregava 20 % de potência. Para o magnésio (Fig. 12), podemos observar que os resultados foram bastante próximos quando a potência foi variada de 20 a 80 %, sendo que a 100 % de potência houve uma pequena diminuição na sua extração. No entanto, os resultados obtidos com essa potência (100 %) apresentaram um menor desvio padrão. Como a extração de cálcio mostrou-se excelente com emprego da potência máxima, foi decidido então, usar sempre essa potência para todas as decomposições, uma vez que é nosso objetivo determinar Ca e Mg em uma amostra que sob as mesmas condições de decomposição.

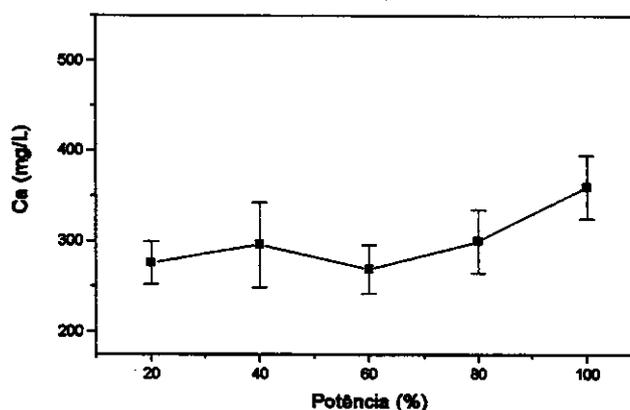


Figura 11: Eficiência da extração de cálcio presente na amostra de urina em função da potência.

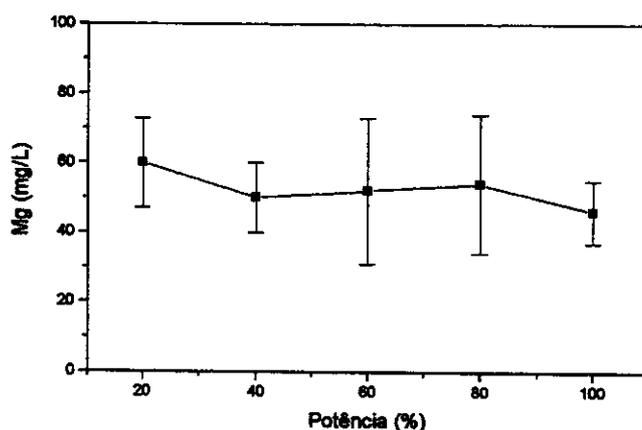


Figura 12: Eficiência da extração de magnésio presente na amostra de urina em função da potência.

6.4.2- Emprego do ácido nítrico e efeito do tempo de atuação das microondas sobre a decomposição das amostras de urina

A quantidade de potência absorvida, depende do ácido empregado e da sua concentração [5]. No pré-tratamento de amostras com ácidos minerais, as seguintes propriedades dos ácidos devem ser levadas em consideração: a força do ácido, o poder oxidante do ácido e/ou de um de seus produtos de decomposição, a solubilidade dos sais correspondentes, o grau de pureza e/ou facilidade de purificação e aspectos relacionados à segurança durante a manipulação.

Os ácidos/agentes oxidantes mais comuns empregados para a decomposição de materiais biológicos são HNO_3 e H_2SO_4 além de H_2O_2 [15].

O HCl é um ácido forte, mas não apresenta propriedades oxidantes além daquelas associadas ao íon H^+ e além do mais, ele gera cloretos voláteis quando espectrometria de absorção atômica por chama é empregada para determinação. O H_2SO_4 é um ácido forte, e uma das suas principais vantagens é justamente o fato de permitir a execução de processos de decomposição sob elevadas temperaturas, porém, seu uso não é recomendado em amostras com



altos teores de Ca, devido à baixa solubilidade do CaSO_4 (2 g L^{-1}). Já para o HClO_4 existe o perigo imprevisível de explosão face ao seu elevado poder oxidante. Assim, o HNO_3 foi empregado para a decomposição das amostras de urina, uma vez que ele gera nitratos solúveis, é de fácil purificação e, quando em sistemas fechados, possui um excelente poder oxidante [3].

A influência da concentração do ácido nítrico foi estudada em um intervalo de $0 - 4,0 \text{ mol L}^{-1}$ mantendo-se as amostras nas bobinas de decomposição por diferentes períodos (0, 1, 2, 4 e 6 min) para otimizar o tempo de decomposição, à 100 % de potência. Esses estudos foram realizados simultaneamente. Concentrações acima de $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ foram investigadas, porém, os resultados para Ca e Mg (444 mg L^{-1} e 106 mg L^{-1} , respectivamente) apresentaram-se menores quando comparado com os resultados obtidos quando empregava soluções mais diluídas, como por exemplo $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ (579 mg L^{-1} para o Ca e 131 mg L^{-1} para o Mg). Ambos usando tempo de atuação das microondas de 6 min.

O calor específico de cada ácido aumenta quando sua concentração diminui, aproximando-se do calor específico da água pura. Por causa dessa propriedade, há um aumento na absorção de potência pelo ácido quando ele torna-se mais diluído. Isso ocorre porque no aquecimento da mistura amostra/ácido, prevalece o aquecimento por rotação de dipolo à medida que a concentração do ácido diminui, resultando numa melhor decomposição das amostras [5].

Com respeito ao tempo de atuação das microondas, tempos superiores a seis minutos não foram testados, pois a velocidade analítica seria prejudicada e inviabilizaria o sistema proposto. Empregando o tempo de 6 minutos, observou-se que resultados similares (908 mg L^{-1} para o Ca e 212 mg L^{-1} para o Mg) eram obtidos quando eram empregados tempo de 2 min. (841 mg L^{-1}

para o Ca e 200 mg L^{-1} para o Mg) ou 4 minutos (889 mg L^{-1} para o Ca e 217 mg L^{-1} para o Mg). Assim, optou-se em realizar as decomposições usando no máximo, 2 minutos de atuação das microondas.

O efeito do ácido nítrico e do tempo de atuação das microondas foram investigadas simultaneamente, onde as Figuras 13 e 14 ilustram os resultados obtidos para cálcio e magnésio, respectivamente, em função dessas duas variáveis.

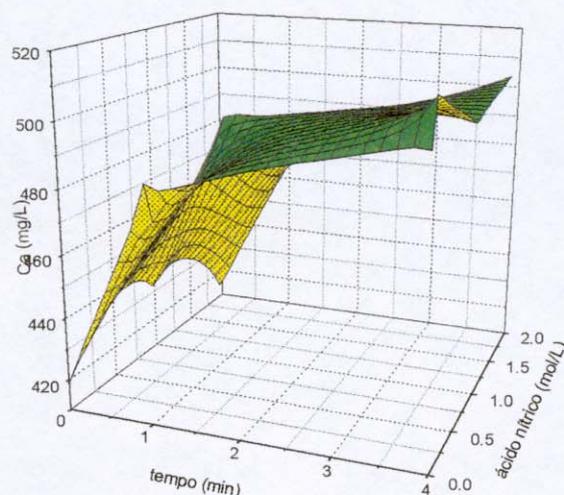


Figura 13: Superfície de resposta obtida para a concentração de cálcio devido a decomposição das amostras de urina, variando a concentração de ácido e o tempo de atuação das microondas.

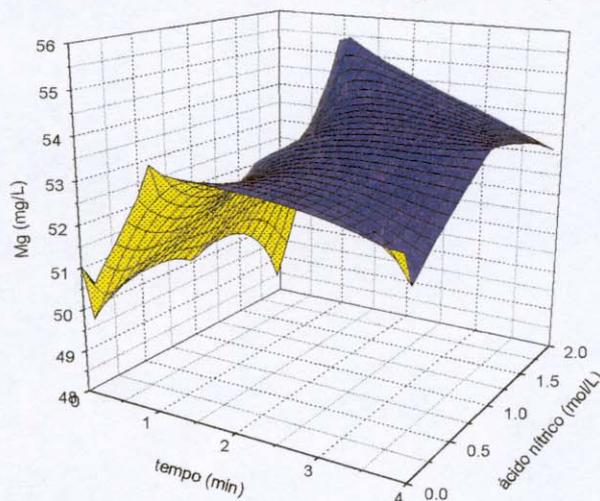


Figura 14: Superfície de resposta obtida para a concentração de magnésio devido a decomposição das amostras de urina, variando a concentração de ácido e o tempo de atuação das microondas.



Pela Fig. 13, podemos observar que os resultados obtidos para o cálcio aumentaram com o tempo de atuação das microondas. Isto pode ser verificado, comparando-se os tempos de atuação das microondas (0 - 4 min) para qualquer concentração de HNO_3 empregada, inclusive, sem o emprego deste. Se fixarmos, por exemplo, uma concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , observamos um aumento da extração de cálcio de 415 para 500 mg L^{-1} com o incremento do tempo de atuação das microondas. O melhor resultado encontrado para o cálcio foi empregando o tempo de 4 min. e HNO_3 na concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (500 mg L^{-1}). No entanto, tempo de atuação das microondas de 1 min e concentração de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ também apresentou resultados satisfatórios (480 mg L^{-1}).

Para o magnésio (Fig. 14), o melhor resultado encontrado foi quando se empregou o tempo de 1 minuto e HNO_3 na concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma vez que é nosso objetivo determinar cálcio e magnésio numa amostra que sofreu as mesmas condições de decomposição, afim de obtermos maior frequência analítica, optamos em trabalhar com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de 1 min. No caso do ácido, é uma condição menos drástica de decomposição, o valor do "branco" apresentou-se menor, além de minimizar a contaminação do meio ambiente e o consumo do próprio ácido. Em relação ao tempo de atuação das microondas de 1 min, foi possível obter uma velocidade analítica de $15 \text{ amostras h}^{-1}$ em cada bobina de decomposição, já levando-se em consideração os ciclos de limpeza do sistema de fluxo.

Um ponto importante a ser discutido, são as vantagens e limitações encontradas quando se deseja analisar amostras de urina. Ela é um amostra facilmente acessível, uma vez que é excretada naturalmente. Consequentemente, sua coleta não causa nenhum trauma ao paciente, com exceção quando se precisa realizar exames bacteriológicos, onde a



cateterização ou aspiração suprapúbica da bexiga é necessária [13]. No entanto, um problema significativo encontrado nessas amostras, é o fato de sua composição variar amplamente, mesmo para indivíduos saudáveis e até para o mesmo indivíduo. Os fatores que afetam a composição, e também o volume, dessa amostra são: os fatores dietéticos (como por exemplo, uma ingestão excessiva ou insuficiente de água, sais e etc.), os fatores fisiológicos (como atividades físicas) e em casos de doenças (como por exemplo, deficiência renal) [80]. Assim, várias substâncias são excretadas desigualmente durante o dia. No desenvolvimento desta dissertação, esse tipo de problema foi observado, além do problema de contaminação por bactérias, inviabilizando o armazenamento dessas amostras por muito tempo. Consequentemente, foi impossível utilizar a mesma amostra no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Após a otimização dos parâmetros investigados, fez-se a decomposição de seis amostras de urina, com emprego do forno de microondas, sendo que três amostras eram de voluntários masculinos e três de voluntários femininos. As amostras foram coletadas no mesmo dia e pela manhã (primeira expelida) em recipientes limpos e secos. Com o propósito de averiguar como as condições de decomposição afetam cada amostra, fez-se, também, a determinação de cálcio e magnésio nessas seis amostras sem utilizar o forno de microondas, utilizando 200 μ L da mistura amostra/ácido e concentração de HNO₃ 1 mol L⁻¹. Os resultados, expressos em mg L⁻¹, para cálcio e magnésio são mostrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Esse experimento foi realizado em triplicata.

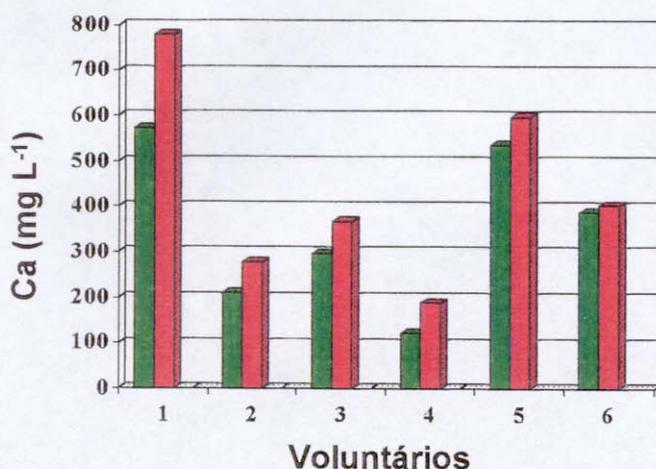


Figura 15: Concentrações de cálcio obtidas para seis amostras de urina, utilizando 200 μL da amostra, em meio ácido $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (■) após decomposição à potência máxima (659 W) por 1 min e sem usar o forno de microondas (■).

Amostras 1 - 3 = voluntários masculinos

Amostras 4 - 6 = voluntários femininos

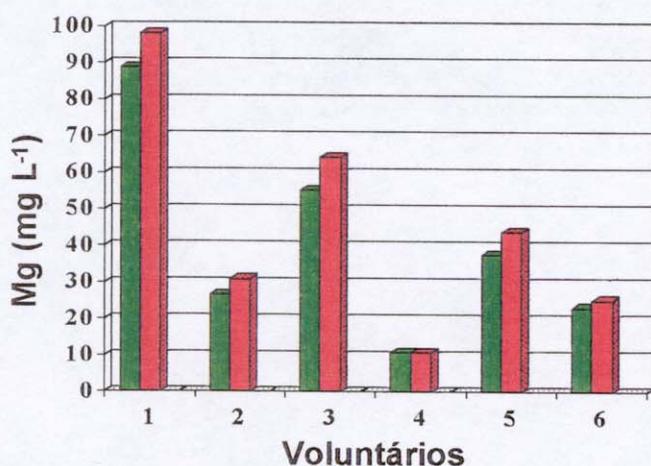


Figura 16: Concentrações de magnésio obtidas para seis amostras de urina, utilizando 200 μL da amostra, em meio ácido $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (■) após decomposição à potência máxima (659 W) por 1 min e sem usar o forno de microondas (■).

Amostras 1 - 3 = voluntários masculinos

Amostras 4 - 6 = voluntários femininos

Analisando os resultados obtidos, podemos notar que as amostras apresentaram quantidades diferentes de cálcio e magnésio entre si, sendo que para o cálcio, o menor valor encontrado foi de 100 mg L^{-1} (amostra 4) e o maior valor foi cerca de 800 mg L^{-1} (amostra 1); para o magnésio, o menor valor encontrado foi de 10 mg L^{-1} (amostra 4) e o maior foi de 100 mg L^{-1}



(amostra 1). A explicação para isso é devido à diferença na ingestão alimentar, na de água e de outros líquidos que variam de pessoa para pessoa. Além disso, podemos observar também, que para a maioria das amostras, o emprego da energia é imprescindível, como é o caso das amostras de números 1 e 4 (Fig. 15), onde a diferença da concentração de cálcio entre usar o forno de microondas e não usar foi de 200 mg L^{-1} e 90 mg L^{-1} , respectivamente. Isso provavelmente deve-se ao fato da forma com que o cálcio está ligado e, também, pela ausência ou presença de certas espécies que podem ser consideradas concomitantes.

Para o magnésio (Fig. 16), com exceção das amostras de número 4, houve uma diferença nos resultados obtidos quando se emprega ou não o forno de microondas. No caso das amostras de número 1 e 3, essa diferença foi cerca de 10 %.

Podemos observar também, que parece existir uma relação de proporcionalidade entre as concentrações de cálcio e magnésio para cada amostra, sendo que essa relação é diferenciada para amostras de voluntários do sexo masculino e feminino. Para as amostras dos voluntários masculinos, encontramos uma proporção de cálcio de 7,50 vezes maior do que a de magnésio (RSD = 21,8 %) e para as amostras dos voluntários femininos a proporção de cálcio em relação ao magnésio foi 15,6 vezes maior (RSD = 12,2 %). Sendo assim, pode ser possível determinar semi-quantitativamente o magnésio presente em amostras de urina somente pela avaliação da quantidade de cálcio, e com isso, realizar um “screening” para o magnésio de acordo com a quantidade de cálcio, ou vice-versa. Para verificar se isso é possível, foi necessário realizar a determinação de cálcio e magnésio em mais amostras de urina. Assim, 21 amostras fornecidas pelo Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas foram decompostas pelo forno de



microondas para posterior determinação de cálcio e magnésio por espectrometria atômica (FAAS).

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para cálcio e magnésio juntamente com proporção Ca/Mg encontrada.

Tabela 3: Resultados da relação da concentração entre Ca e Mg.

Voluntários	Sexo	Ca (mg L ⁻¹)	Mg (mg L ⁻¹)	Relação Ca/Mg
1	M	291,0	67,55	4,31
2	M	119,0	16,63	7,16
3	M	249,9	97,51	2,56
4	M	591,9	111,4	5,31
5	M	362,6	124,3	2,92
6	M	181,7	71,90	2,53
7	M	194,5	14,12	13,8
8	M	338,5	56,30	6,01
9	M	346,7	124,7	2,78
10	M	554,6	178,2	3,11
11	F	224,3	51,12	4,39
12	F	96,63	63,95	1,51
13	F	524,4	79,93	6,56
14	F	306,0	52,73	5,81
15	F	804,1	181,4	4,43
16	F	56,26	20,31	2,78
17	F	324,8	102,4	3,17
18	F	543,1	76,71	7,08
19	F	178,8	44,42	4,03
20	F	228,2	93,85	2,43
21	F	200,6	46,03	4,36

Como podemos observar pela Tabela 3, a relação Ca/Mg obtida para essas amostras foram ligeiramente diferentes das amostras anteriores. Para as amostras dos voluntários masculinos, a proporção entre Ca/Mg foi de 4,94 (SD = 3,48) e para as amostras dos voluntários femininos, essa relação foi de 4,23 (SD = 1,73). A explicação para essa diferença pode ser devido à diferença no procedimento de armazenagem das amostras anteriores com as obtidas do Hospital das Clínicas da Unicamp. No caso das amostras



anteriores, essas foram somente refrigeradas a 4° C e as decomposições ocorreram no mesmo dia da coleta. Para as amostras obtidas do Hospital das Clínicas, essas foram congeladas por vários dias até obter um total de 21 amostras. Assim, para afirmar se é possível ou não realizar um “screening” para o magnésio de acordo com a quantidade de cálcio, seria necessário uma quantidade mais significativa de amostras e um tempo maior de estudo.

6.5 Estudo da estabilidade das amostras de urina

Amostras de urina coletadas pela manhã de quatro voluntários (dois homens e duas mulheres) foram utilizadas com o propósito de avaliar o tempo em que as mesmas podem ser empregadas para análises sofrendo apenas refrigeração. As leituras de pH ocorreram em seqüência, com auxílio de um potenciômetro e de um eletrodo de vidro. Essa avaliação foi realizada até o momento em que as amostras não eram mais indicadas para análises (formação de precipitado, odor fortemente desagradável e mudança na coloração). A Tabela 4 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4: Resultados da avaliação da estabilidade de quatro amostras de urina.

	M1 ^(*)			M2 ^(*)		
Hora	1	24	48	1	24	48
pH	5,41	5,39	5,39	5,18	5,16	-
Cor	amarelo claro	amarelo claro	amarelo	amarelo	amarelo	-
Odor	característico	característico	desagradável	forte	desagradável	-
Obs.	-	-	-	-	precipitado	-
	F1 ^(*)			F2 ^(*)		
Hora	1	24	48	1	24	48
pH	5,92	5,92	5,95	5,75	5,75	5,77
Cor	amarelo claro	amarelo claro	amarelo	amarelo	amarelo	laranja
Odor	característico	característico	desagradável	característico	característico	desagradável
Obs.	-	-	precipitado	-	-	-

^(*) M1 e M2 = amostras de voluntários masculinos

^(*) F1 e F2 = amostras de voluntários femininos



Embora o pH de todas as amostras não tenha apresentado uma alteração significativa durante os três dias de avaliação, pode-se notar que as amostras foram adquirindo uma cor amarela escura, além do odor que foi se tornando desagradável. Esse odor possuía um forte cheiro amoniacal devido a ação de bactérias sobre compostos nitrogenados (principalmente uréia). Podemos notar também a formação de precipitado em duas amostras, após o segundo ou terceiro dia da coleta. Segundo Burden e colaboradores [78], as amostras de urina possuem uma tendência à precipitação. Sua natureza exata não é clara, apesar desse precipitado provavelmente conter cálcio. De acordo com Burden, após dissolução do sólido, o sinal do cálcio pelo ICP-OES foi significativamente elevado, em contraste com o sinal do magnésio.

Pelos resultados obtidos, verificamos que as amostras de urina podem ser utilizadas para análises por até 48 horas, sofrendo apenas refrigeração. Esses resultados estão condizentes com Henry [13] e Hawcroft e Hector [80], segundo os quais, mudanças pouco significativas podem ser observadas quando uma amostra recente for refrigerada adequadamente por até 48 horas.

6.6 Estudo dos diferentes tipos de coleta

A Tabela 5, mostra os resultados obtidos para cálcio e magnésio presentes nas amostras de urina mudando-se o tipo de coleta. Esse experimento foi realizado em triplicata.



Tabela 5: Quantidade de cálcio e magnésio (mg L^{-1}) presente nas amostras de urina, mudando-se o tipo de coleta ($n = 3$).

1º expelida		Coleta de 24 horas	
Ca	402,45	Ca	496,07
SD	13,3	SD	17,04
RSD	3 %	RSD	3 %
Mg	47,97	Mg	47,23
SD	0,81	SD	1,32
RSD	2 %	RSD	3 %

No caso da coleta total, em vez de descartar a primeira amostra do dia, como é correto fazer, esta foi coletada num frasco plástico e utilizada como a amostra da primeira expelida e mantida sobre refrigeração até a decomposição pelo forno de microondas, o qual ocorreu no dia seguinte. Toda urina subsequente a esta, incluindo a primeira amostra do dia seguinte, foi usada como a coleta de 24 horas, sendo o volume final de 550 mL. Essa amostra foi rigorosamente agitada antes que alíquotas fossem retiradas para análise. Ambas amostras foram decompostas no mesmo dia pelo forno de microondas.

A quantidade de magnésio, presente nos dois tipos de coleta foi praticamente a mesma. Para o cálcio, houve uma diferença na sua concentração entre as duas coletas, onde as amostras da primeira expelida mostraram uma concentração menor.

Para a determinação de cálcio, o ideal seria realizar uma coleta de 24 horas, uma vez que a sua quantidade mostrou-se maior do que na coleta da primeira expelida. Obter uma coleta de 24 horas em princípio é fácil, mas na prática, é bem mais complexo, devido a alguns inconvenientes, como por exemplo: às vezes ocorre uma hipercoleta, a amostra deve ficar sob refrigeração até o término da coleta e, às vezes, a temperatura de refrigeração



é inadequada para conservar a amostra e o paciente pode esquecer de coletar toda a urina e descartá-la [81].

6.7 Estudo dos concomitantes

Após a otimização do método proposto, foi realizado um estudo referente à interferência de outros metais e de algumas espécies sobre a determinação de cálcio e magnésio. As Tabelas 6 e 7 ilustram os metais e as espécies investigadas, juntamente com suas respectivas concentrações encontradas na amostra de urina e suas proporções em relação ao cálcio e ao magnésio, respectivamente.

Tabela 6: Metais e espécies investigadas e suas respectivas concentrações em relação ao cálcio.

Concomitante	[concomitante] presente na urina (mg L⁻¹)	Proporção [Metal/Ca]
Cromo (VI)	9 x 10 ⁻²	1,12 x 10 ⁻⁴
Cobre	940	1,17
Chumbo	1 x 10 ⁻¹	1,25 x 10 ⁻⁴
Níquel	3,3 x 10 ⁻¹	4,16 x 10 ⁻⁴
Zinco	243	0,3
Sódio	3935	5,0
Potássio	1839	2,3
Magnésio	120	0,15
Cádmio	9 x 10 ⁻²	1,12 x 10 ⁻⁴
Cromo (III)	8,5 x 10 ⁻²	1,0 x 10 ⁻⁴
Cloreto	4600	5,75
Sulfato	2500	3,13
Fosfato	600	0,75
Cobalto	9,6 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ⁻⁶



Tabela 7: Metais e espécies investigadas e suas respectivas concentrações em relação ao magnésio.

Concomitante	[concomitante] presente na urina (mg L⁻¹)	Proporção [Metal/Mg]
Cromo (VI)	9×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-4}$
Cobre	940	7,8
Chumbo	1×10^{-1}	$8,3 \times 10^{-4}$
Níquel	$3,3 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-3}$
Zinco	243	2,0
Sódio	3935	32,8
Potássio	1839	15,32
Cálcio	800	6,7
Cádmio	9×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-4}$
Cromo (III)	$8,5 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-4}$
Cloreto	4600	38,33
Sulfato	2500	20,83
Fosfato	600	5,0
Alumínio	$3,1 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-4}$
Manganês	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Ferro	1×10^{-2}	$8,3 \times 10^{-5}$
Cobalto	$9,6 \times 10^{-4}$	8×10^{-6}

Inicialmente, a concentração dessas espécies e dos metais foram baseadas naquelas concentrações normalmente encontradas na amostra de urina, de acordo com a literatura [7, 81 - 85], e aumentadas até um nível onde se produzisse, no máximo $\pm 10\%$ de interferência. Na execução desse estudo, foi empregada uma solução de cálcio de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e uma outra solução contendo a mesma concentração de cálcio mais o metal a ser investigado. Para o magnésio, foi preparada uma solução de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, e uma outra solução contendo a mesma concentração de magnésio mais o metal investigado. Uma solução de lantânio, de concentração final de 1% (m/v) foi adicionada em todas as soluções para assegurar um máximo de recuperação do cálcio, visto que para concentrações menores de que 1% observava-se uma forte interferência do fosfato sobre o cálcio. Isso ocorre porque o fosfato se

combina com o cálcio na fase condensada, formado um composto menos volátil [86].

Os resultados das espécies e dos metais investigados sobre o sinal do cálcio estão mostrados nas Figuras 17 a 20.

Na concentração máxima investigada de 24 mg L^{-1} , o cobre (Figura 17a) apresentou uma interferência de 7,55 % sobre o sinal do cálcio. Apesar deste metal não apresentar uma interferência significativa ($\pm 10\%$), sua concentração estava extremamente elevada (ca de 8 vezes maior do que o valor normalmente encontrado).

Na concentração de 20 mg L^{-1} , o potássio (Figura 17 b) apresentou uma interferência de -10,63 % sobre o sinal do cálcio, sendo essa concentração 3,5 vezes maior do que aquela normalmente encontrada na urina.

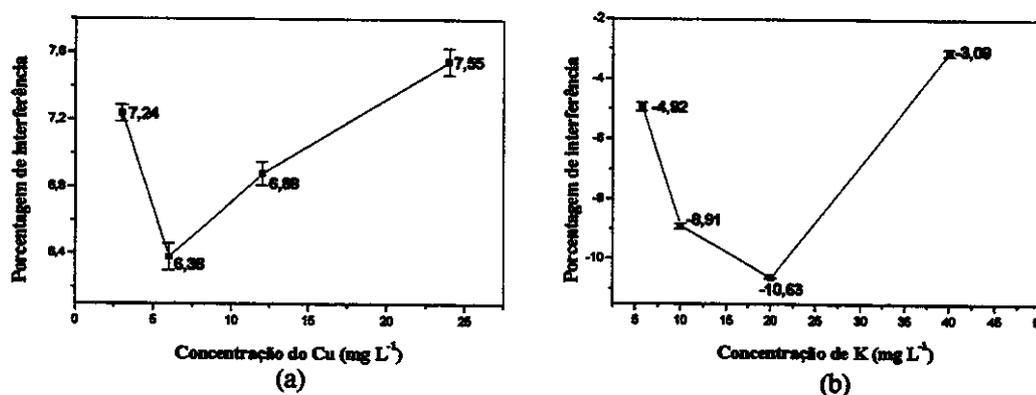


Figura 17: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo cobre (a) e potássio (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

Cloreto (Figura 18 a) e magnésio (Figura 18 b) mostraram uma interferência de - 4,45 % e - 9,57 % à concentração de 112 mg L^{-1} e $3,2 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, sendo essas concentrações, 8 e 7,8 vezes maior do que as encontradas em amostras de urina. Assim como aconteceu com o cobre

(Figura 17 a), o íon cloreto não apresentou uma interferência significativa mesmo em concentrações elevadas.

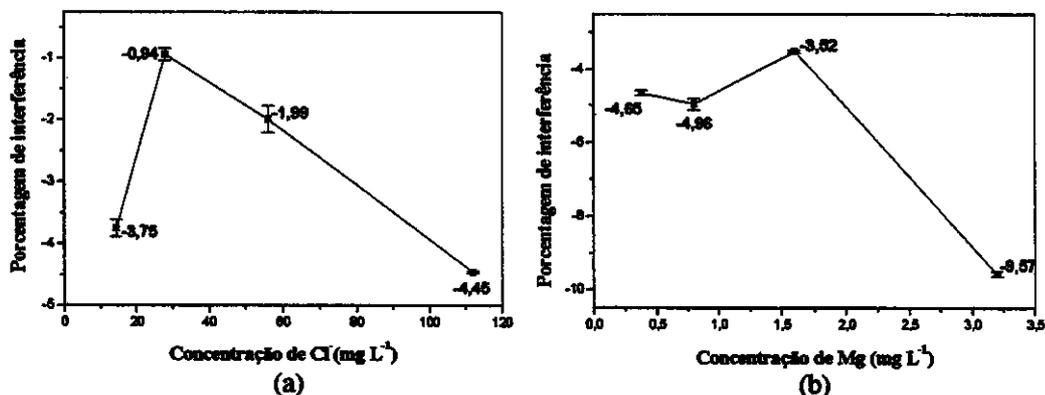


Figura 18: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo cloreto (a) e magnésio (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

Nas concentrações investigadas, ambos zinco (Figura 19 a) e sulfato (Figura 19 b), não apresentaram uma interferência significativa sobre o sinal do cálcio. No caso do zinco, este apresentou uma interferência positiva levemente constante, sendo 4,13 % a 6 mg L⁻¹.

Sulfato não mostrou uma interferência significativa mesmo quando sua concentração máxima investigada (64 mg L⁻¹) estava 8,2 vezes maior do que o nível normalmente encontrado em amostras de urina.

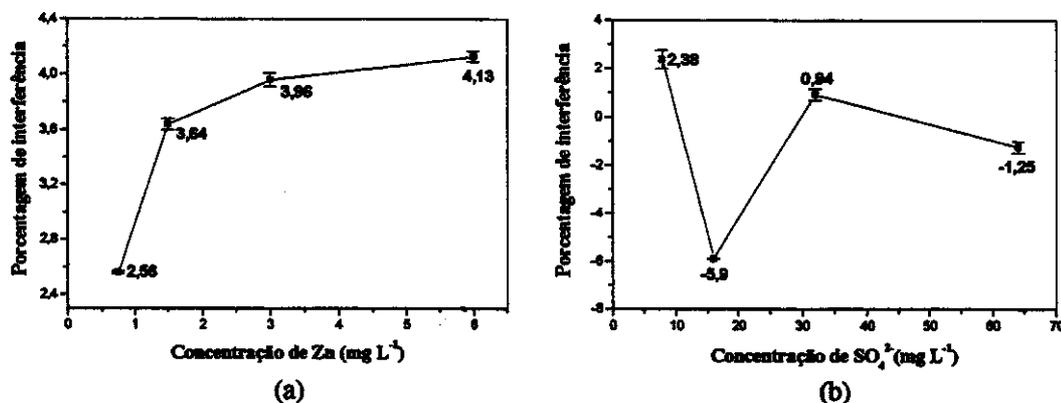


Figura 19: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo zinco (a) e sulfato (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

O fosfato (Figura 20 a) apresentou uma interferência de +10,43 % à concentração de 1,88 mg L⁻¹ (nível normal encontrado em amostras de urina). Porém, essa interferência manteve-se constante até 8 mg L⁻¹.

Já o chumbo (Figura 20 b) apresentou uma interferência negativa que variou entre 1,64 e 4,34 %. Esse metal foi estudado numa concentração cerca de 1000 vezes maior do que o nível normalmente encontrado em amostras de urina.

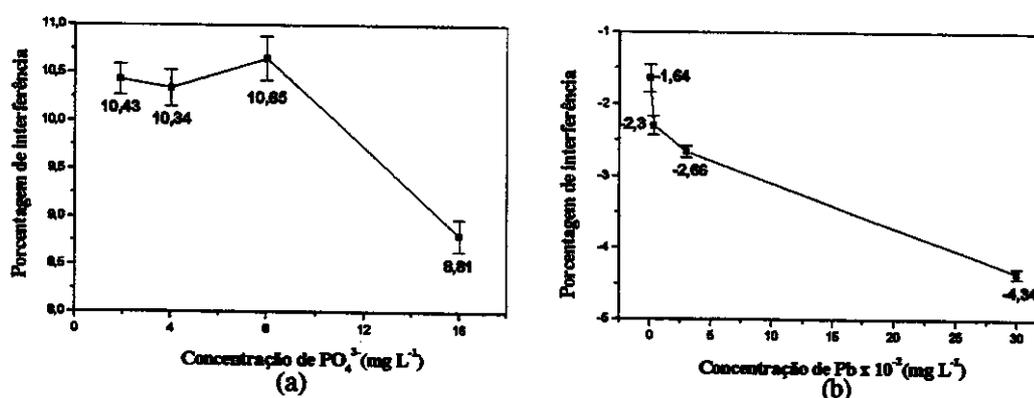


Figura 20: Resultados de seletividade na determinação de cálcio, tendo fosfato (a) e chumbo (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

Os resultados das espécies e dos metais investigadas sobre o sinal do magnésio estão mostrados nas Figuras 21 a 25.

As Figuras 21a e 21b mostram que zinco e potássio apresentaram um comportamento semelhante sobre o sinal do magnésio. Até a concentração máxima estudada (32 mg L⁻¹), zinco (Figura 21 a) não apresentou nenhuma interferência significativa.

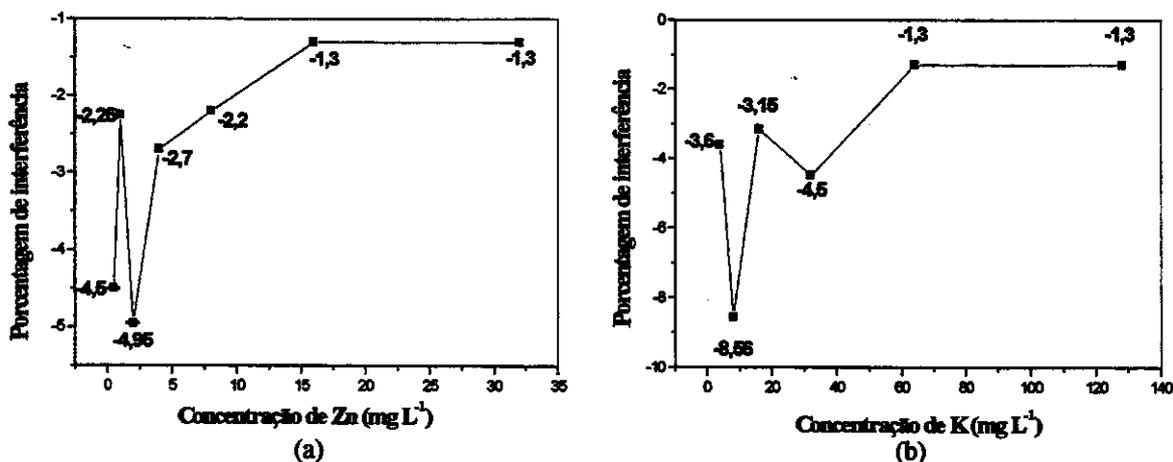


Figura 21: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo zinco (a) e potássio (b) como concomitantes.

Potássio (Figura 21 b) mostrou uma interferência de -8,56 % à 8 mg L⁻¹, no entanto, a concentrações mais elevadas, essa interferência foi praticamente inexistente.

Na concentração de 8 mg L⁻¹, o cobre (Figura 22 a) apresentou uma interferência de 9,7 % sobre o sinal do magnésio, sendo essa concentração cerca de 4 vezes maior do que o valor normalmente encontrado em amostras de urina. Quando sua concentração foi elevada para 16 mg L⁻¹ essa interferência foi bastante reduzida.

Já o alumínio (Figura 22 b) não apresentou uma interferência significativa, mesmo quando sua concentração foi elevada de $6,5 \times 10^{-5}$ para $6,5 \times 10^{-2}$.

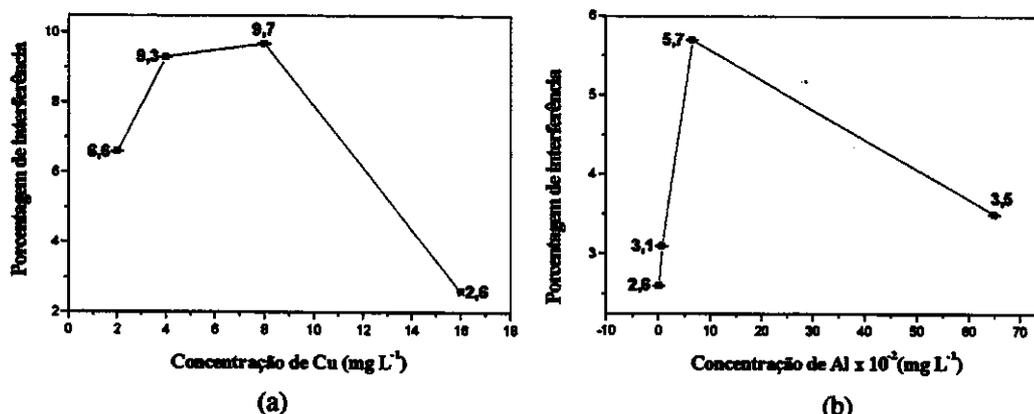


Figura 22: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo cobre (a) e alumínio (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

O íon cloreto (Figura 23 a) na concentração de 8 mg L⁻¹ apresentou uma interferência negativa de 7,66 %. As demais concentrações investigadas não apresentaram uma interferência significativa. A 128 mg L⁻¹, o cloreto apresentou uma interferência de -1,3 %, sendo essa concentração cerca de 36 vezes maior do que os níveis normalmente encontrados em amostras de urina.

O cálcio (Figura 23 b), outro metal investigado sobre o sinal do magnésio, foi estudado até a concentração de 26,88 mg L⁻¹ e não foi observado nenhuma interferência significativa.

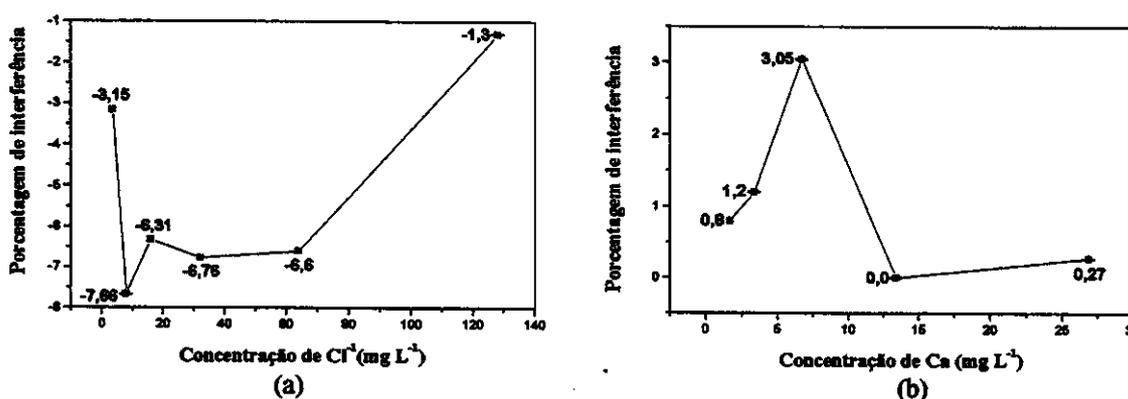


Figura 23: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo cloreto (a) e cálcio (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.



Tanto o chumbo (Figura 24 a) como o níquel (Figura 24 b), não apresentaram interferências significativas. As concentrações desses metais foram estudados a níveis extremamente elevados, os quais não são encontrados em amostras de urina, sendo que a concentração máxima investigada foi de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para o chumbo e $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ para o níquel.

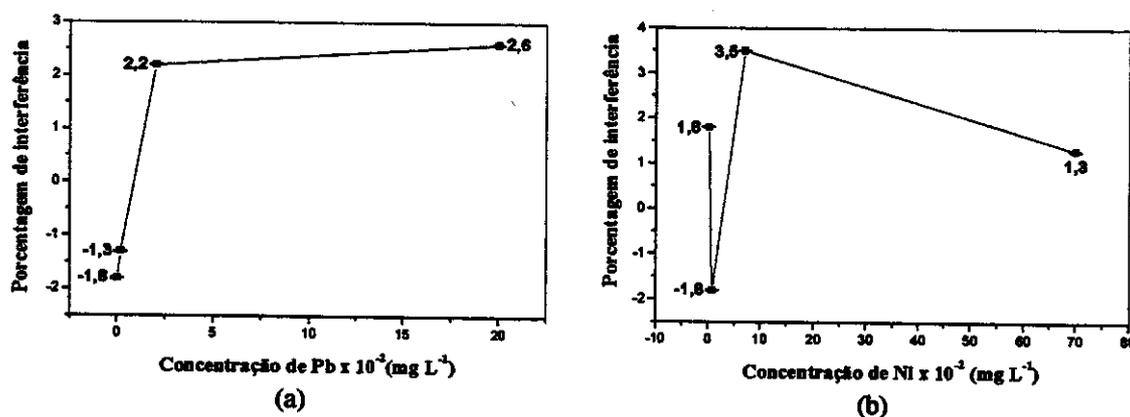


Figura 24: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo chumbo (a) e níquel (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

O fosfato (Figura 25), a última espécie investigada, não apresentou interferência significativa de $\pm 10 \%$, mesmo a 80 mg L^{-1} , que equivale a uma concentração 64 vezes maior do que os valores normais encontrados na urina.

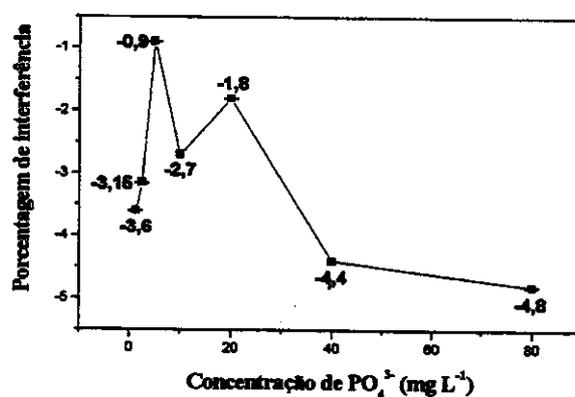


Figura 25: Resultados de seletividade na determinação de magnésio, tendo fosfato como concomitante.



6.8 Comparação de resultados empregando duas técnicas de detecção

Nesta parte do trabalho, foram executadas algumas comparações de resultados, utilizando duas técnicas de detecção: a espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

As Tabelas 8 e 9 ilustram os resultados obtidos para Ca e Mg, respectivamente, empregando as duas técnicas.

Tabela 8: Resultados obtidos para Ca em diferentes voluntários empregando ICP-OES e FAAS (n = 3).

Voluntários	ICP-OES	Procedimento proposto (FAAS)
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	254,30 ± 66,89	224,30 ± 34,31
2	169,50 ± 12,97	178,80 ± 16,95
3	95,84 ± 5,75	96,56 ± 13,94
4	474,30 ± 42,05	524,40 ± 34,31
5	225,60 ± 18,81	228,20 ± 19,92
6	61,25 ± 11,73	53,37 ± 5,98
7	286,30 ± 32,64	306,00 ± 11,90
8	278,50 ± 6,36	291,00 ± 9,95
9	756,50 ± 57,06	804,10 ± 37,26
10	35,12 ± 3,76	56,34 ± 1,77
11	120,40 ± 18,92	119,00 ± 6,04
12	294,90 ± 21,29	324,80 ± 30,63
13	239,30 ± 70,67	249,90 ± 74,09
14	581,20 ± 20,58	590,80 ± 119,8
15	180,40 ± 24,59	181,70 ± 27,50
16	523,80 ± 20,84	543,10 ± 26,15
17	191,10 ± 15,95	194,50 ± 25,39
18	312,00 ± 10,99	338,50 ± 13,72
19	322,40 ± 21,91	346,70 ± 15,68
20	187,80 ± 6,45	200,60 ± 5,97
21	108,40 ± 20,80	105,30 ± 17,04
22	524,90 ± 74,16	554,60 ± 96,35
23	304,80 ± 26,67	362,60 ± 62,62

Tabela 9: Resultados obtidos para Mg em diferentes voluntários empregando ICP-OES e FAAS (n = 3).

Voluntários	ICP-OES	Procedimento proposto (FAAS)
	Mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	54,92 ± 12,23	51,10 ± 4,21
2	47,20 ± 2,26	52,71 ± 4,79
3	60,35 ± 6,00	63,98 ± 6,10
4	73,39 ± 11,47	79,95 ± 10,60
5	101,40 ± 12,36	104,90 ± 10,86
6	35,26 ± 2,53	36,23 ± 0,89
7	49,14 ± 3,39	52,71 ± 4,45
8	65,21 ± 1,10	67,53 ± 1,66
9	176,00 ± 5,47	181,40 ± 1,83
10	19,82 ± 0,48	20,27 ± 0,54
11	14,23 ± 1,61	16,62 ± 0,96
12	84,13 ± 13,33	102,40 ± 3,17
13	88,40 ± 11,35	97,52 ± 9,78
14	130,60 ± 8,59	135,90 ± 4,96
15	128,20 ± 2,94	124,30 ± 2,54
16	108,80 ± 1,54	111,40 ± 3,41
17	194,60 ± 1,98	193,70 ± 1,53
18	131,20 ± 3,49	134,40 ± 3,50
19	50,50 ± 2,18	53,13 ± 2,11
20	63,89 ± 5,86	69,54 ± 7,34

Essas medidas foram realizadas em triplicata e sempre havia um “branco”. No caso do FAAS, o valor do “branco” foi de 10,64 mg L⁻¹ e 2,60 mg L⁻¹ para o Ca e o Mg, respectivamente e para as leituras feitas no ICP-OES, o valor do “branco” foi de 23,79 mg L⁻¹ e 3,44 mg L⁻¹ para o Ca e o Mg, respectivamente.

Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado um teste *t* pareado. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95 % para todas as amostras. Para esses testes, foram utilizadas amostras de urina obtidas do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual



de Campinas (Unicamp) e de alguns voluntários do próprio laboratório onde está dissertação foi desenvolvida.

6.9 Comparação da decomposição empregando o forno de microondas caseiro e o bloco digestor

Foi realizada a comparação de resultados empregando a decomposição assistida por microondas com a decomposição empregando o bloco digestor.

No caso da decomposição assistida por microondas, essa foi conduzida injetando 200 μL da mescla amostra/ácido no sistema de fluxo e o forno foi acionado por 1 minuto à potência máxima. As amostras foram coletadas em balões volumétricos de 50 mL e um volume de 5,0 mL de uma solução de cloreto de lantânio (10 % m/v) foi adicionado. As decomposições foram realizadas em triplicatas e sempre havia um “branco”.

Para a decomposição empregando o bloco digestor, 2,0 mL da amostra foram decompostas juntamente com 3,0 mL de HNO_3 concentrado e 1,0 mL de H_2O_2 (30 % v/v) por aproximadamente 3 horas. Neste caso a amostra foi levada quase à secura e o volume completado para 10 mL. Uma alíquota de 200 μL da amostra decomposta foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, seguido pela adição de uma alíquota de 2,5 mL da solução de cloreto de lantânio 10 % (m/v) e o volume completado com HNO_3 0,014 mol L^{-1} . As decomposições foram realizadas em triplicata juntamente com um “branco”. Para o cálcio, o valor do “branco” foi de 21 mg L^{-1} e para o magnésio, esse valor foi de 2,5 mg L^{-1} . Esse sistema permitiu a decomposição simultânea de 40 amostras h^{-1} .

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados obtidos para cálcio e magnésio, respectivamente. As leituras foram realizadas no FAAS.



Tabela 10: Resultados obtidos para cálcio (mg L^{-1}) em diferentes voluntários empregando o forno de microondas e o bloco digestor.

Voluntários	Forno de microondas	Bloco digestor
A	$951,60 \pm 75,55$	$757,50 \pm 40,61$
B	$591,90 \pm 17,76$	$520,00 \pm 32,50$
C	$362,60 \pm 62,62$	$310,00 \pm 26,83$
D	$354,60 \pm 25,50$	$312,90 \pm 8,87$

Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado um teste *t* pareado. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 99 % para as amostras B, C e D e 99,5 % para a amostra A.

Tabela 11: Resultados obtidos para magnésio (mg L^{-1}) em diferentes voluntários empregando o forno de microondas e o bloco digestor.

Voluntários	Forno de microondas	Bloco digestor
A	$132,70 \pm 7,14$	$124,20 \pm 4,69$
B	$111,40 \pm 3,41$	$110,20 \pm 2,37$
C	$134,40 \pm 3,50$	$127,30 \pm 2,37$
D	$53,13 \pm 2,11$	$48,75 \pm 4,72$

Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado um teste *t* pareado. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95 % para as amostras A, B e D e de 99 % para a amostra C.

Podemos observar pelas Tabelas 10 e 11 que os dois modos de decomposição apresentaram resultados concordantes entre si, onde a decomposição pelo forno de microondas permitiu um rápido tratamento das amostras de urina, sendo a velocidade analítica cerca de 45 amostras h^{-1} , incluindo a limpeza do sistema de fluxo. No caso das decomposições empregando o bloco digestor, cerca de 40 amostras eram decompostas a cada 3 horas. Os volumes de ácido e da amostra empregado nos dois sistemas de



decomposição foram outros fatores relevantes. Podemos observar também, tanto para o Ca como para o Mg, que todos os resultados obtidos para as decomposições empregando o bloco digestor, foram ligeiramente menores quando comparados com as decomposições empregando o forno de microondas caseiro. No caso das decomposições empregando o forno de microondas, estas foram realizadas no mesmo dia da coleta das amostras de urina. Para as decomposições empregando o bloco digestor, as mesmas ocorreram após um período de 48 horas, sendo que as amostras ficaram sob refrigeração a 4° C durante esse tempo. Provavelmente, devido a esse tempo entre a coleta e a decomposição das amostras pelo bloco digestor, pode ter ocorrido perdas de Ca e de Mg, como, por exemplo, perdas por adsorção na superfície do frasco de armazenagem. Parece que o período de armazenagem possui um papel importante, já que os resultados para o “screening” também apresentaram diferenças significativas quando comparado com as amostras decompostas no mesmo dia. Pode ser que algum dos metais formem complexos mais insolúveis, dificultando a decomposição.

6.10 Características analíticas

O método proposto apresenta um limite de detecção e quantificação de 0,072 e 0,14 mg L⁻¹, respectivamente para o cálcio e 0,065 e 0,091 mg L⁻¹, respectivamente para o magnésio, de acordo com as recomendações da IUPAC [87]. A precisão para o cálcio, expressa como desvio padrão relativo (RSD), foi de 1 % (n = 12) para a repetibilidade e 11 % (n = 10) para a reprodutibilidade, utilizando amostras de urina. Para o magnésio esses mesmos fatores foram 3 % (n = 11) e 11 % (n = 12), respectivamente.



7. CONCLUSÃO

A decomposição em linha por microondas, permitiu um rápido tratamento da amostra de urina (ca. 45 amostras/h), já que três bobinas de decomposição estavam inseridas no forno de microondas, e apresentou-se bastante versátil, com precisões aceitáveis. Com este sistema, os riscos ao operador são significativamente minimizados, já que o mesmo requer somente alguns μL de amostra/reagente, evitando ou minimizando problemas ambientais.

Não houve problemas de interferência sobre o cálcio e o magnésio, mesmo quando alguns metais estavam a concentrações elevadas.

Podemos verificar que as amostras podem ser utilizadas para análises por um período de até 48 horas, apenas com refrigeração.

Houve uma diferença significativa na quantidade de cálcio presente nas amostras, quando fez-se o estudo dos diferentes tipos de coletas. Podemos encontrar uma diferença de $93,62 \text{ mg L}^{-1}$ entre as amostras da primeira expelida e as amostras coletadas num período de 24 horas. Já para o magnésio, isso não foi observado. Pode-se verificar também para algumas amostras, parece que as microondas atuaram com maior eficiência.

A quantidade de cálcio e de magnésio presentes nas amostras investigadas apresentaram um intervalo bastante amplo, variando de 35 à 804 mg L^{-1} para o cálcio de 10 à 194 mg L^{-1} para o magnésio. Em dietas normais, os adultos saudáveis excretam cerca de $100 - 300 \text{ mg L}^{-1}$ de cálcio e cerca de $30 - 60 \text{ mg L}^{-1}$ de magnésio.

A relação Ca/Mg encontrada para as amostras obtidas do Hospital das Clínicas da Unicamp foi de 4,94 para as amostras dos voluntários masculinos e 4,23 para as amostras dos voluntários femininos. Parece que existe uma



relação muito parecida ente Ca e Mg para todos os casos. No entanto, é necessário empregar uma quantidade mais significativa de amostras, além de um tempo maior de estudos para verificar essa suspeita.

O emprego do sistema de fluxo acoplado ao forno de microondas, para a decomposição de amostras, e da espectrometria atômica por chama (FAAS), como técnica de detecção, apresentou várias vantagens como velocidade, simplicidade, precisão, custo e facilidade de operação, sendo ideal para determinação de vários analitos em laboratórios clínicos de rotina.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Christian, G. D., **Analytical Chemistry**, 4^a edição, ed. John Wiley & Sons, Washington, 1986.
- [2] Torres, P.; Ballesteros, E.; Luque de Castro, M. D.; *Anal. Chim. Acta*, 1995, **308**, 371.
- [3] Kingston, H. M.; Jassie, L. B.; **Introduction to Microwave Sample Preparation, Theory and Practice**, ed. American Chemical Society, Washinton, 1988.
- [4] Mingorance, M. D.; Pérez-Vazquez, M. L.; Lachica, M.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 853.
- [5] Kingston, H. M.; Jassie, L. B.; *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2534.
- [6] Stewart, L. J. M.; Barnes, R. M.; *Analyst*, 1994, **119**, 1003.
- [7] Krachler, M.; Alimonti, A.; Petrucci, F.; Forastiere, F.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 701.
- [8] Burguera, M; Burguera, J. L.; *Anal. Chim. Acta*, 1986, **179**, 351.
- [9] Matusiewicz, H.; Sturgeon, R. E.; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **349**, 428.
- [10] Guo, T.; Baasner, J.; *Talanta*, 1993, **40**, 1927.
- [11] Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E.; *Quim. Nova*, 1997, **20**, 638.
- [12] Uchida, T.; Vallee, B. L.; *Anal. Sci.*, 1986, **2**, 243.
- [13] Henry, J. B.; **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. Tradução: Dr Nelson G. de Oliveira e colaboradores, 18^a edição, ed. Manole Ltda, 1995.
- [14] Baranski, S.; Czerski, P; **Biological Effects of Microwave**, ed. Dowden, Hutchinsonson and Ross, Inc., Pennsylvania, EUA, 1976.



- [15] Krushevskaja, A.; Barnes, R. M.; Amarasiriwardena, C.; *Analyst*, 1993, **118**, 1175.
- [16] Feinberg, M.; *Analisis*, 1991, **19**, 47.
- [17] Lui, J.; Sturgeon, R. E.; Willie, S. N.; *Analyst*, 1995, **120**, 1905.
- [18] Sheppard B. S.; Heitkemper, D. T.; Gaston, C. M.; *Analyst*, 1994, **119**, 1683.
- [19] Smith, F. E.; Arsenault, E. A.; *Talanta*, 1996, **43**, 1207.
- [20] Tseng, C. M.; Garraud, H.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X.; Diego, A.; *J. Autom. Chem.*, 1998, **20**, 99.
- [21] Kubrakova, I.; *Spectrochim. Acta*, 1997, **52B**, 1469.
- [22] Abu-Samra, A.; Morris, J. S.; Koirtiyohann, S. R.; *Anal. Chem.*; 1975, **47**, 1475.
- [23] Karanassios, V.; Li, F. H.; Liu, B.; Salin, E. D.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **6**, 457.
- [24] Kojima, I.; Uchida, T.; Iida, C.; *Anal. Sci.*, 1988, **4**, 211.
- [25] Carbonell, V.; de la Guardia, M.; Salvador, A.; Burguera, J. L.; M. Burguera; *Anal. Chim. Acta*, 1990, **238**, 417.
- [26] Arruda, M. A. Z., Galego, M.; Valcárcel, M.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 501.
- [27] Pereira-Filho, E. R.; Rohwedder, J. R.; Arruda, M. A. Z.; *Analyst*, 1998, **123**, 1023.
- [28] Oliveira, C. C.; Zagatto, E. A. G.; Araújo, A. N.; Lima, J. L. F. C.; *Anal. Chim. Acta*, 1998, **371**, 57.
- [29] Oliveira, A. F.; Fatibello-Filho, O.; *Talanta*, 1999, **50**, 899.
- [30] Burguera, M.; Burguera, J. L.; *Lab. Rob. Autom. (LRA)*, 1993, **5**, 277.



- [31] Welz, B.; Tsalev, D. L.; Sperling, M.; *Anal. Chim. Acta*; 1992, **261**, 91.
- [32] Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B.; *Analyst*, 1992, **117**, 1735.
- [33] Burguera, J. L.; Burguera, M.; Carrero, P.; Rivas, C.; Gallignani, M.; Brunetto, M. R.; *Anal. Chim. Acta*, 1995, **308**, 349.
- [34] Arruda, M. A. Z.; Gallego, M.; Valcárcel, M.; *J. Anal. At. Spectrom.*; 1996, **11**, 169.
- [35] Hanna, C. P.; McIntosh, S. A.; *At. Spectrosc.*, 1995, Maio/Junho, 106.
- [36] Willians, K. E.; Haswell, S. J.; Barclay, D. A.; Preston, G.; *Analyst*, 1993, **118**, 245.
- [37] Burguera, M.; Burguera, J. L.; Rondón, C.; Rivas, C.; Carrero, P.; Gallignani, M.; Brunetto, M. R.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 343.
- [38] Iyengar, G. V.; Subramanian, K. S.; Woittiez, J. R. W.; **Elemental Analysis of Biological Samples, Principles and Practice**, ed. CRC Press, 1998.
- [39] Das, A. K.; Chakraborty, R.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M.; *Mikrochim. Acta*, 1996, **122**, 209.
- [40] Paschal, D. C.; *Spectrochim. Acta*, 1989, **44B**, 1229.
- [41] Truchaud, A.; Schnipelsky, P.; Pardue, H. L.; Place, J.; Ozawa, K.; *J. Autom. Chem.*, 1994, **16**, 67.
- [42] Leach, C. S.; Rambault, P. C.; Fischer, C. L.; *Clin. Biochem.*, 1975, **8**, 108.
- [43] Cornelis, R.; Speecke, A.; Hoste, J.; *Anal. Chim. Acta*, 1975, **78**, 317.
- [44] Omang, S. H.; Vellar, O. D.; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1974, **269**, 177.
- [45] Bradley, C. R.; Rechnitz, G. A.; *Anal. Lett.*, 1986, **19**, 151.
- [46] Masoom, M.; Townshend, A.; *Anal. Chim. Acta*, 1984, **166**, 111.



- [47] Blotcky, A. J.; Rack, E. P.; J. Research Nat. Bureau Standards, 1986, **91**, 93.
- [48] Leflon, P.; Plaquet, R., Clin. Chem., 1986, **32**, 521.
- [49] Flanjak, J.; Hodda, A. E.; Anal. Chim. Acta, 1988, **207**, 283.
- [50] Matusiewicz, H.; Anal. Chim. Acta, 1988, **207**, 349.
- [51] Fliss, M. S.; Usadel, H.; Caballero, O. R.; Wu, L.; Buta, M. R.; Eleff, S. M.; Jen, J.; Sidransky, D; Science, 2000, **287**, 2017.
- [52] Petit de Peña, Y.; Gallignani, M; Burguera, M.; Burguera, J. L.; Añez, N., J. Braz. Chem. Soc., 1990, **1**, 72.
- [53] Faria, L. C.; Pasquini, C.; J. Autom. Chem., 1992, **14**, 97.
- [54] Tyson, J. F.; Sundin, N. G.; Hanna, C. P.; McIntosh, S. A.; Spectrochim. Acta, 1997, **52B**, 1773.
- [55] Liang, Y.-Z.; Li, M.; Rao, Z.; Anal. Sci., 1996, **12**, 629.
- [56] Thomson, C. D.; Analyst, 1998, **123**, 827.
- [57] Robberecht, H. J.; Deelstra, H. A.; Talanta, 1984, **31**, 497.
- [58] Smith, S. M.; Wastney, M. E.; Nyquist, L. E.; Shih, C.-Y.; Wiesmann, H.; Nillen, J. L.; Lane, H. W.; J. Mass Spectrom., 1996, **31**, 1265.
- [59] Arnow, L. E.; **Introduction to Physiological and Pathological Chemistry**, 9^a ed., ed. C. V. Mosby Company, Saint Louis, EUA, 1976.
- [60] Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Valentine, J. S.; **Bioinorganic Chemistry**, ed. University Science Books, California, 1994.
- [61] Embree, H. D.; Debey, H. J.; **Introduction to the Chemistry of Life**, ed. Addison-Wesley Publishing Company Inc., California, New York, 1968.



[62] Seiler, H. G.; Sigel, H. Sigel, A.; **Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds**, ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1988.

[63] Burritt, M. F.; *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 409R.

[64] McKenzie, H. A.; Smythe, L. E.; **Quantitative Trace Analysis of Biological Materials**, ed. Elsevier, Amsterdam, New York, 1988.

[65] Fernández - Romero, J. M.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta*, 1993, **283**, 447.

[66] McCarroll, N. A.; *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 388R.

[67] Toffaletti, J.; *Anal. Chem.*, 1991, **63** 192R.

[68] J. B. Willis; *Spectrochim. Acta*, 1999, **54B**, 1971.

[69] Hulanicki, A.; Lewandowshi, R.; Michalska, A.; *Anal. Chim. Acta*, 1990, **233**, 269.

[70] Anker, P; Wieland, E; Simon, D.; Dohner, R. E.; Asper, R.; Simon, W.; *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 1970.

[71] Manzoni, A.; Premoli, P.; **Methodology and Clinical Applications of Ion-Selective Electrodes**, Copenhagen, 1985.

[72] Matsushita, S.; *Anal. Chim. Acta*, 1985, **172**, 249.

[73] Kroll, M. H.; Elin, R. J.; *Clin. Chem.*, 1985, **27**, 244.

[74] Godlewska-Zylkiewicz, B.; Lésniewska, B.; Hulanicki, A. ; *Anal. Chim. Acta*, 1998, **358**, 185.

[75] Stegmann, W.; Goldstein, S. L.; Georgieff, M.; *Analyst*, 1996, **121**, 901.

[76] van Staden, J. F.; Taljaard, R. F., *Anal. Chim. Acta*, 1996, **323**, 75.

[77] Wong, M. K.; Gu, W.; Ng, T. L.; *Anal. Sci.*, 1997, **13**, 97.



- [78] Burden, T.; Powell, J. J.; Thompson, R. P. H.; *Anal. Proc. Incl. Anal. Comm.*, 1994, **31**, 153.
- [79] Subramanian, K. S.; *Spectrochim. Acta*, 1996, **51B**, 291.
- [80] Hawcroft, D.; Hector, T.; **Clinical Specimens**, ed. John Wiley & Sons, London, 1987.
- [81] Batchelor, J. D.; Thomas, S. E.; Jones, B. T.; *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 1086.
- [82] Krushevska, A.; Waheed, S.; Nóbrega, J.; Amarisiriwardena, D. e Barnes, R. M.; *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 205.
- [83] Bozsai, G. Melegh, M.; *Microchem. J.*, 1995, **51**, 39.
- [84] Szpumar, J.; Bettmer, J.; Robert, M.; Chassaigne, H.; Cammann, K.; Lobinski, R. e Donard, O. X. F.; *Talanta*, 1997, **44**, 1389.
- [85] Chen, S. -C; Shiere, M. -Y.; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1997, **357**, 1192.
- [86] Long, G. L.; Boss, C. B. *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 624.
- [87] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1987, **112**, 199.