



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BACHARELADO EM QUÍMICA

Flávia Brito Hanzel

**AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS USANDO
HIDROXIAPATITA PARA ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS**

Santa Maria, RS
2021

Flávia Brito Hanzel

**AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS USANDO HIDROXIAPATITA
PARA ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

Orientador: Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS
2021

Flávia Brito Hanzel

**AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS USANDO HIDROXIAPATITA
PARA ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

Aprovado em 11 de fevereiro de 2021:

Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)

(Orientador)

Vinicius Machado Neves, Me. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

RESUMO

AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS USANDO HIDROXIAPATITA PARA ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS

AUTORA: Flávia Brito Hanzel

ORIENTADOR: Dr. Valderi Luiz Dressler

Neste trabalho foi investigado um procedimento de calibração com hidroxiapatita para a determinação de Mn, Sr, Cd, Ba, Li, Al, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Mg, Fe, Fe e Ca em polivitamínicos por ablação com laser combinada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). Cálcio foi utilizado como elemento para normalização (padrão interno, IS). A hidroxiapatita foi utilizada como material para ajuste de matriz na calibração, sendo que a mesma foi enriquecida com soluções de referência a fim de obter uma curva de calibração. A hidroxiapatita foi escolhida devido a semelhança com a composição das amostras e a distribuição homogênea de Ca, usado como IS. Tais condições, associadas a outras propriedades dos elementos determinados, possibilitaram a utilização do isótopo de ^{43}Ca como elemento de referência para a normalização durante as análises por LA-ICP-MS. As vantagens do uso do método são a utilização de soluções de referência transferidas diretamente sobre o material, mínima manipulação das amostras e uso de poucos reagentes, conseqüentemente pouca geração de resíduos. Dessa maneira, foram avaliados efeitos da normalização do sinal de cada analito em função do ^{43}Ca , a vazão de gás carregador, energia e diâmetro do feixe de laser e homogeneidade das amostras. O procedimento possibilitou a análise multielementar direta em amostras de polivitamínicos, além da determinação da influência da homogeneidade nos resultados finais.

Palavras-chave: Polivitamínicos, hidroxiapatita, LA-ICP-MS.

ABSTRACT

EVALUATION OF CALIBRATION IN LA-ICP-MS USING HYDROXYAPATITE FOR ANALYSIS OF MULTIVITAMINS

AUTHOR: Flávia Brito Hanzel

ADVISOR: Dr. Valderi Luiz Dressler

In this work, a calibration procedure was investigated to determine Mn, Sr, Cd, Ba, Li, Al, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Mg, Fe, Fe, and Ca in multivitamins by laser ablation combined mass spectrometry with inductively coupled plasma (LA-ICP-MS). Hydroxyapatite was used for matrix matching and Ca as internal standard (IS). Hydroxyapatite was chosen for calibration as a support material for reference solutions due to the similarity with the composition with the samples. Calcium was used due to its homogeneous distribution in hydroxyapatite. These conditions, associated with other properties of the determined elements, enabled the use of the ^{43}Ca isotope as IS for the determination of several elements by LA-ICP-MS. The main advantages of using the method are related to the use of references solution spiked to the material, minimal handling of the samples and low use of reagents, minimizing the production of chemical residues. In this way, the effects of normalizing the signal of each analyte to ^{43}Ca , the flow of carrier gas, energy and diameter of the laser beam, and Ca homogeneity in hydroxyapatite enables the application of LA-ICP-MS for elements quantification in multivitamins. The procedure allowed the direct multi-element determination in multivitamins. In addition it is possible to evaluate the distribution (homogeneity) of the elements in the multivitamins.

Keywords: Multivitamins, hydroxyapatite, LA-ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tabela periódica dos elementos de ocorrência natural. Acredita-se que os elementos sombreados em cinza sejam essenciais para a vida, incluindo o Br que não está sombreado	13
Figura 2 - Representação do laser de rubi feito por Maiman	15
Figura 3 - Representação básica de um sistema laser	15
Figura 4 - Transições eletrônicas na emissão estimulada (A) O átomo no estado fundamental (B) O átomo no estado excitado (C) Fenômeno de emissão estimulada. 16	
Figura 5 - Laser de três níveis.....	16
Figura 6 - Esquema básico dos componentes de um sistema de geração de laser com bombardeamento óptico.....	17
Figura 7 - Esquema montagem LA-ICP-MS	20
Figura 8 - (A) foto do equipamento de ICP-MS; (B) está em destaque o detalhe da conexão do nebulizador e em (C) em detalhe a conexão com o tubo para ablação com laser	24
Figura 9 - Foto do sistema laser utilizado.....	25
Figura 10 – As amostras utilizadas no trabalho podem ser vistas na fileira de cima e abaixo o comprimido confeccionado após a moagem e prensagem.....	27
Figura 11 - Sinais obtidos na avaliação da vazão de gás.....	30
Figura 12 - Sinais obtidos na avaliação da energia do laser.....	31
Figura 13 - curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS para ^{57}Fe , ^{56}Fe , ^{66}Zn , ^{65}Cu , ^{138}Ba , ^{112}Cd , ^{55}Mn e ^{87}Sr	35
Figura 14 - Foto de um comprimido de amostra após a ablação pelo laser.....	37
Figura 15 - Perfis obtidos por LA-ICP-MS para os padrões e amostras	38
Figura 16 - Comprimidos de amostra com superfície lixada para ablação, fixados sobre lâmina de vidro.....	40
Figura 17 - Sinais das amostras antes e depois da moagem	41
Figura 18 - Sinais antes e depois da aplicação da correção de ^{43}Ca	33
Figura 18 - Sinais antes e depois da aplicação da correção de ^{43}Ca	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições operacionais do equipamento de ICP-MS.....	24
Tabela 2 - Parâmetros do laser usados para as análises.....	26
Tabela 3 - Limites de detecção e quantificação para a técnica de LA-ICP-MS empregando pastilhas de hidroxiapatita para a calibração	36
Tabela 4 - Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos por LA-ICP-MS e valores informados na tabela nutricional.	37

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado)
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado)
LA-ICP-MS	<i>Laser Ablation Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Ablação com Laser Combinada à Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado)
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limites de Detecção)
LA	<i>Laser ablation</i> (Ablação a laser)
LA-ICP OES	<i>Laser ablation coupled to inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (ablação com laser combinada à espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado)
UV	<i>Ultra violeta</i>
PTFE	<i>Politetrafluoretileno</i>
CCD	<i>Coupled charge device</i> (dispositivo de carga acoplada)
IS	<i>Internal standard</i> (padrão interno)
Fs	<i>femtosecond</i> (femtosegundo)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 POLIVITAMÍNICOS	12
2.2 LASER	14
2.3 COMPONENTES DO LASER.....	15
2.4 UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE ABLAÇÃO À LASER PARA INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS EM ICP-MS	18
2.5 ABLAÇÃO POR LASER ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO.....	19
2.6 ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	23
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	26
3.3 AMOSTRAS.....	27
3.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS UTILIZANDO HIDROXIAPATITA... 28	
3.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE POLIVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS.	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA DE LA-ICP-MS.....	29
4.2 NORMALIZAÇÃO DO SINAL DOS ELEMENTOS EM RELAÇÃO AO ⁴³ Ca.....	32
4.4 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR LA-ICP-MS	36
4.5 ANÁLISE DE POVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS.....	36
4.6 HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os polivitamínicos são suplementos alimentares constituídos por diversas vitaminas e minerais essenciais e que tem como objetivo suprir carências que podem estar relacionadas a alimentação ou deficiência na fixação ou síntese dessas espécies (FENNEMA, 2010).

As vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis para o funcionamento do corpo, sendo que a maioria existe como grupos de compostos relacionados estruturalmente, os quais apresentam funções nutricionais (FENNEMA, 2010).

Os minerais estão presentes nos alimentos em muitas formas químicas diferentes. Essas formas costumam ser chamadas de espécies, podendo ser denominadas como compostos complexos e íons livres. Como não há uma definição para mineral que é aceita de maneira universal, quando aplicada a alimentação esse termo costuma se referir a elementos presentes nos alimentos que não sejam C, H, N e O (FENNEMA, 2010).

Como nossa alimentação é baseada em vegetais e carnes podemos esperar encontrar todos os minerais essenciais e vitaminas necessárias para nosso corpo através da alimentação (FENNEMA, 2010). Porém, há casos onde é necessário o uso de suplementos vitamínicos, seja pela dificuldade de disponibilidade de alimentos, carência causada por alguma doença e até mesmo para auxiliar em processos como, por exemplo, no período gestacional, onde a quantidade de vitaminas e minerais necessárias para o desenvolvimento é maior (FENNEMA, 2010).

Independente do motivo, suplementos polivitamínicos ganham cada dia mais lugar nas prateleiras das farmácias. Diante disso, é objetivo do presente trabalho desenvolver uma metodologia simples para a análise quantitativa desses polivitamínicos, podendo facilitar o controle de qualidade. A técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado combinada a ablação a laser (LA-ICP-MS), permite uma análise sem a necessidade de

morosos preparos de amostra e pouca manipulação das amostras (NUNES, 2015).

Ao passo que o corpo pode bioacumular tanto metais pesados que podem estar na forma de contaminantes, quanto elementos essenciais, se consumidos em quantidades superiores que as necessárias podem levar a efeitos adversos (FENNEMA, 2010). Portanto, foram escolhidas quatro amostras de polivitamínicos disponíveis em farmácias locais para avaliar a sua composição elementar. Dessa forma, foram realizados estudos avaliando as melhores condições do sistema LA-ICP-MS, preparo de amostra necessário, bem como o desenvolvimento de uma curva de calibração para a quantificação dos elementos nas amostras com normalização utilizando o ^{43}Ca . Também, foi avaliada a influência da homogeneidade dos elementos na amostra na quantificação. A técnica LA-ICP-MS foi escolhida por apresentar alta sensibilidade e limites de detecção (LOD) na faixa de ng g^{-1} a $\mu\text{g g}^{-1}$.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 POLIVITAMÍNICOS

Polivitamínicos são suplementos alimentares, constituídos de diversas vitaminas e minerais. O principal objetivo do uso de suplementos vitamínicos na dieta é evitar a carência desses nutrientes, que por vezes não são obtidos em quantidades suficientes através da alimentação (FENNEMA, 2010).

Os micronutrientes são nutrientes essenciais que devem ser providos ao organismo, sendo que vitaminas e minerais pertencem a este grupo. Vitaminas são compostos orgânicos com funções específicas, que devem ser providos em quantidades controladas. Os minerais são substâncias puramente inorgânicas com funções reguladoras, não sintetizados pelo organismo e, portanto, devem ser fornecidos (SILVA, 2018).

Uma parcela crescente da população vem consumindo vitaminas e minerais na forma de suplementos, sendo que em inúmeros casos o suplemento representa a principal fonte de ingestão de tais compostos (FENNEMA, 2010). Os alimentos em suas formas vegetais e animais fornecem esse aporte de micronutrientes, porém, atualmente, o suprimento alimentar é cada vez mais dependente de alimentos processados industrialmente que, muitas vezes, causam a perda ou degradação desses compostos presentes no alimento *in natura* (FENNEMA, 2010). Há informações disponíveis a respeito de perda e estabilidade de vitaminas e minerais, no entanto, essas informações não costumam ser consideradas nos processos industriais, pois ainda é limitado o conhecimento a respeito de mecanismos de reação, cinética e termodinâmica sob condições diversas. De tal maneira, é difícil dizer se determinados tratamentos, condições de manipulação e armazenamento influenciarão na retenção de vitaminas (FENNEMA, 2010).

Dos elementos químicos de ocorrência natural na crosta terrestre, 27 são considerados essenciais a vida. Como não existe uma definição de “mineral” é aceito que esse termo refere-se a outros elementos que não sejam C, H, O e N, que também estão presentes nos alimentos (FENNEMA, 2010). Esses quatro elementos constituem cerca de 99% do número total de átomos dos sistemas vivos. Assim sendo, os demais elementos minerais estão presentes em

concentrações relativamente baixas nos seres vivos, bem como em grande parte dos alimentos. Entretanto, eles desempenham funções essenciais nos sistemas vivos (FENNEMA, 2010).

Os principais nutrientes incluem cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e cloreto. Os elementos traço incluem ferro, iodo, zinco, selênio, cromo, cobre, flúor e estanho. A quantidade necessária em humanos desses minerais varia de alguns microgramas até cerca de 1g/dia. Se por um período de tempo houver baixa ingestão surgem sintomas de deficiência. Inversamente a ingestão excessiva pode se tornar tóxico (FENNEMA, 2010). Devido aos mecanismos homeostáticos dos organismos vivos, a faixa de ingestão segura e a que causará toxicidade é ampla e controlada. A persistência de baixa ingestão de nutrientes não é incomum, sendo mais pronunciada em populações menos favorecidas ao acesso de uma alimentação balanceada (FENNEMA, 2010). Na Figura 1 é possível visualizar os elementos essenciais sombreados, Br não está sombreado, mas foi considerado essencial a partir do ano de 2014 (MCCALL *et al.*, 2014).

Figura 1 - Tabela periódica dos elementos de ocorrência natural. Acredita-se que os elementos sombreados em cinza sejam essenciais para a vida, incluindo o Br que não está sombreado

1A	2A	3B	4B	5B	6B	7B	8B	8B	8B	1B	2B	3A	4A	5A	6A	7A	O
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Ln	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U												

Fonte: Fennema (2019).

Cada elemento tem uma função primordial e bem definida. O Ca auxilia na mineralização dos ossos e dentes, coagulação do sangue, secreção de hormônios e neurotransmissores (FENNEMA, 2010). Oxigênio e P tem função também na mineralização dos ossos e dentes, síntese de DNA, RNA e fosfolipídios, metabolismo energético e sinalização celular (FENNEMA, 2010). O Mg é cofator para diversas enzimas (FENNEMA, 2010). O Na participa do

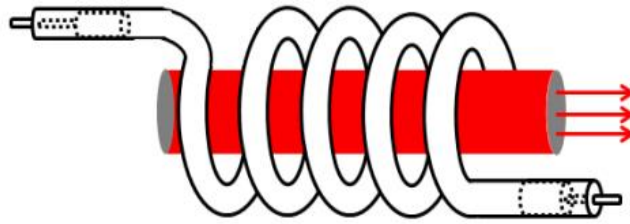
controle do volume líquido extracelular e pressão sanguínea, participa do transporte de nutrientes para dentro e fora da célula (FENNEMA, 2010). O Fe tem função de transportar oxigênio na respiração, no metabolismo energético, na destruição do peróxido de hidrogênio e na síntese de DNA (FENNEMA, 2010). O Zn é um cofator de metaloenzimas, auxilia também na regulação da expressão genética (FENNEMA, 2010). O I é necessário à síntese de hormônios da tireoide. O Se tem função antioxidante. O Pb, Hg e Cd não são nutrientes essenciais, mas são contaminantes comuns (FENNEMA, 2010).

2.2 LASER

O laser é um dispositivo amplificador de radiação eletromagnética e produz um feixe altamente direcionado e de alta intensidade, geralmente possui uma frequência única e, portanto, comprimento de onda específico. O feixe do laser pode variar desde, aproximadamente, um décimo do diâmetro de um fio de cabelo e ir até o tamanho de um prédio, a variação de potência pode ser desde 10^{-9} até 10^{20} W; em comprimento de onda a variação pode ir desde a região espectral das micro-ondas até os raios-X, o que corresponde a frequências de 10^{11} a 10^{17} Hz. Os pulsos de energia são altos (da ordem de 10^4 J) e de curta duração, como 5×10^{-15} s (fs). O laser interage com a matéria e pode facilmente provocar a erosão (ablação) em materiais altamente resistentes. Para simplificar, pode-se comparar o laser com uma vela, quando acesa ela irradia igualmente para todas as direções, um laser focaliza e amplifica a fonte de radiação, focalizando toda a radiação em uma única direção, produzindo assim um feixe de radiação de alta intensidade (SILFWAST, 2008)

Theodore Maiman, em 1960, nos Estados Unidos, foi o primeiro a produzir radiação laser. Ele utilizou um cristal de rubi como fonte de emissão de radiação e uma lâmpada de arco de xenônio como fonte de excitação. Na Figura 2 é possível observar a configuração original, onde uma lâmpada com formato helicoidal está envolta de um bastão de rubi com as extremidades revestidas com um material refletivo que forma a cavidade óptica. Ao ligar a lâmpada Theodore observou a emissão da radiação na forma de um feixe que emergia diretamente da ponta do bastão de rubi (SILFWAST, 2008).

Figura 2 - Representação do laser de rubi feito por Maiman



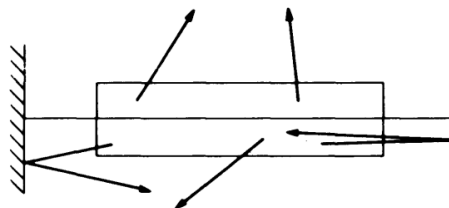
Fonte: Silfwast (2008).

2.3 COMPONENTES DO LASER

Um laser consiste de uma fonte de laser colocado em uma cavidade óptica adequada, geralmente composto por dois espelhos, um frente ao outro. Mesmo que a luz fluorescente não sendo direcional, uma parte da emissão do material atinge os espelhos e retorna para a fonte, como representado na Figura 3. Se a configuração de espelhos estiver correta e o meio for opticamente homogêneo, são possíveis múltiplas reflexões (YOUNG, 1992).

A radiação que passa pela substância fluorescente pode ser amplificada por um processo conhecido como emissão estimulada. A emissão estimulada pode exceder a absorção de radiação, caso for devidamente preparada. O caráter de emissão se altera completamente quando ocorre amplificação suficiente. E, então, um feixe altamente direcional e bastante energético é produzido ao longo do eixo definido pelos dois espelhos. Quando esse tipo de emissão ocorre, a montagem é denominada de laser (YOUNG, 1992).

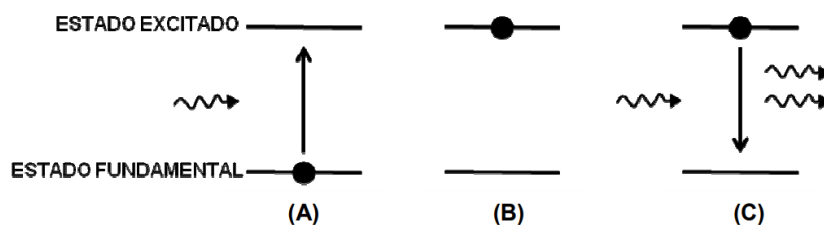
Figura 3 - Representação básica de um sistema laser



Fonte: Young (1992)

Óptica por emissão estimulada é o processo pelo qual um átomo, ao ser perturbado por um fóton, emite outro fóton. Nos lasers é possível observar esse fenômeno, quando um elétron excitado vai para um nível menos energético liberando o fóton. Essa transição ocorre quando o átomo é atingido por um fóton com a mesma energia que este átomo pode emitir quando excitado. O processo de absorção da radiação pela fonte excitadora e emissão de radiação pelos átomos voltando ao estado menos energético ocorrem simultaneamente. Na Figura 4 são demonstradas as transições que ocorrem durante o processo de emissão óptica estimulada (Young, 1992).

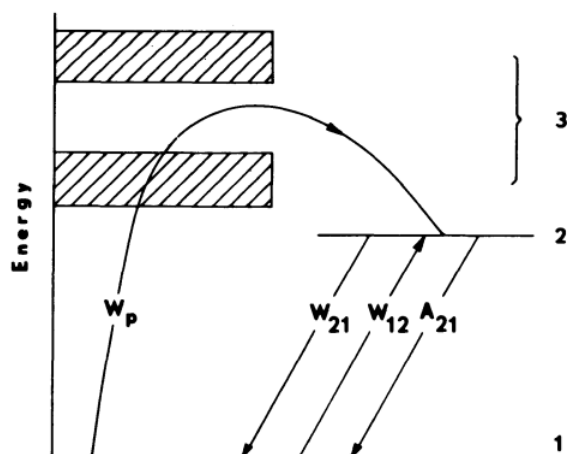
Figura 4 - Transições eletrônicas na emissão estimulada (A) O átomo no estado fundamental (B) O átomo no estado excitado (C) Fenômeno de emissão estimulada



Fonte: Young (1998).

Há fatores fundamentais para a formação do laser, sendo o meio ativo composto por átomos ou moléculas que tem a capacidade de emitir radiação eletromagnética. Tal meio por ser um sólido (como o rubi que Maiman usou em 1960), um líquido ou um gás. É imprescindível que ocorra também a inversão de população (SILFWAST, 2004). Essa inversão de população ocorre através do

Figura 5 - Laser de três níveis

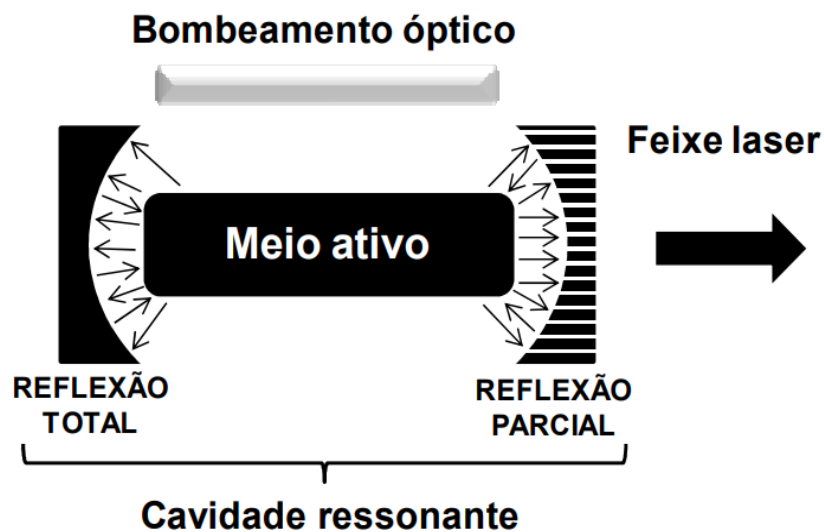


Fonte: Young (1998).

bombeamento óptico, conhecido como laser de três níveis. Os níveis 1 e 2 são os níveis envolvidos na transição real do laser como na Figura 5 (YOUNG, 1992).

Em um laser de bombeamento óptico o material ativo é irradiado por uma lâmpada de alta potência, conhecida como bomba. O laser absorve fortemente a bomba de luz em banda (nível 3). Porém, essa é uma banda quase nunca populada, pois ocorre uma transição quase instantânea e sem emissão do nível 3 para o nível 2. Portanto, se átomos, íons e moléculas podem ser bombeados para o nível 2 mais rapidamente que por emissão espontânea para o nível 1, é condição estabelecida para a inversão de população (YOUNG, 1992). O bombeamento óptico causa essa inversão de população. No esquema da Figura 6, é possível visualizar como o bombeamento óptico gera o laser.

Figura 6 - Esquema básico dos componentes de um sistema de geração de laser com bombardeamento óptico.



Fonte: Nunes (2015).

Como é mostrado na Figura 6, para que haja a geração do feixe de radiação é necessário uma cavidade ressonante, onde estão dispostos paralelamente dois espelhos, perpendiculares ao eixo do meio ativo, um deles com capacidade de reflexão total e outro com capacidade de reflexão parcial. Dentro da cavidade os átomos são estimulados continuamente pelo bombeamento óptico, essa radiação que permanece dentro da cavidade

estimula o decaimento e produz o feixe que é liberado pelo espelho que tem reflexão parcial (SILFWAST, 2004).

2.4 UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE ABLAÇÃO À LASER PARA INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS EM ICP-MS

A propriedade da radiação laser mais útil no campo da Química Analítica, é a radiação na forma de um feixe estreito com elevada potência (SILFWAST, 2004). A primeira aplicação da ablação com laser (LA) para introdução de amostra em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), relatada na literatura, foi para a análise de particulados em suspensão no ar. As partículas suspensas no ar foram coletadas na superfície adesiva da fita Mylar flexível e, em seguida, vaporizadas por um laser CO₂ de pressão atmosférica excitada transversalmente. O vapor foi transportado para o ICP com um fluxo de argônio através de uma cela contendo a amostra (DARKE; TYSON, 1993).

Desde a primeira publicação sobre LA-ICP OES a escolha de laser para o processo de ablação variou entre os pesquisadores. Várias energias de laser foram usadas, variando de 12 mJ a 30 J, para vaporizar amostras sólidas antes da introdução no ICP (DARKE; TYSON, 1993).

Porém, o acoplamento da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado por ablação a laser (LA-ICP-MS) provou ser uma ferramenta mais útil para análises quantitativas de múltiplos elementos bem como a determinação isotópica de materiais sólidos em vários campos. Aliado a essas características, a técnica de ICP-MS tem uma elevada sensibilidade, permitindo determinar a maioria dos elementos com limites de detecção da ordem de ng g⁻¹ a µg g⁻¹. Ao longo dos anos foram testados vários tipos de laser pulsados para ablação, indo desde a faixa do infravermelho e visível e até os mais usados hoje na faixa do ultravioleta (266, 213 e 193 nm). Possivelmente os menores efeitos térmicos causados pela radiação nesses baixos comprimentos de onda resultam nas melhores características do laser na ablação por laser quando usada para introduzir amostras em ICP-MS (OHATA *et al.*, 2014).

Ao considerar o uso de lasers, encontra-se a interação dos feixes de laser com a matéria. Essa interação ocorre em um meio de ganho e também em janelas, espelhos, moduladores ópticos instalados na cavidade do laser e outras ópticas associadas (SILFWAST, 2004).

É notável uma tendência ao uso de lasers com comprimentos de onda na região do UV e pulsos de ablação cada vez menores na técnica de LA-ICP-MS. Nesse sentido, lasers com pulsos de ns a fs são usados, onde os lasers fs resultam, geralmente, em melhor desempenho. O maior limitante para a disseminação desses sistemas é o alto custo com instrumentação e a calibração sem correção de efeito matriz para todo tipo de amostra (NUNES, 2015).

2.5 ABLAÇÃO POR LASER ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

Desde o surgimento de técnicas com plasma indutivamente acoplado seu uso majoritariamente exige amostras em forma líquida, o que requer etapas de decomposição ou extração para a análise de amostras sólidas ou similares, que, de maneira geral exigem condições extremas de temperatura e pressão (GRAY, 1985). Entretanto, o ICP-MS permite a introdução de amostras de variadas fontes, desde que possam ser arrastadas por um fluxo de gás, como um vapor, aerossol de partículas sólidas ou gotículas de líquido (GRAY, 1985). Em 1985, Gray empregou pela primeira vez a técnica de ablação a laser como uma forma de introdução de amostras em ICP-MS (GRAY, 1985).

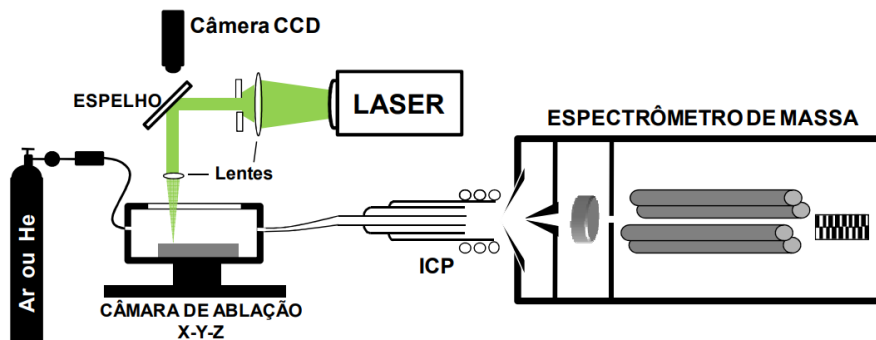
O método que utiliza o laser pulsado para remover a amostra diretamente do sólido para um fluxo de gás de arraste até o plasma (ICP), é particularmente atraente. Tem como vantagem a amostra permanecer a pressão atmosférica, a troca de amostras é simples e rápida, a amostra pode ser analisada sem passar por nenhum preparo, exceto pela preparação de uma superfície plana com tamanho adequado (GRAY, 1985). Devido as suas características, a LA-ICP-MS tornou-se comercialmente disponível a partir da década de 1990 (NUNES, 2015).

Desde o advento do laser em 1960, demorou 20 anos para que a combinação do laser ao ICP-MS fosse usada para uma amostragem com uma

fonte de excitação separada capaz de realizar análise multielementar. Porém essa configuração geral do LA-ICP-MS não foi modificada significativamente nas últimas décadas. A amostra é posta em uma câmara de ablação fechada, que é purgada com Ar ou He, que é usado também como gás de transporte, e o feixe de laser é focalizado na superfície da amostra através de uma janela de quartzo na célula. Tendo energia suficiente, o material será ablado gerando vapor, partículas e aglomerados que serão transportados ao ICP-MS (GUNTER e HATTENDORF, 2005).

Nessa montagem o ICP-MS é apenas uma fonte de excitação separada, onde todas as partículas que foram geradas no laser são vaporizadas, atomizadas e ionizadas. E, por fim, esses íons serão levados ao analisador de massa, onde ocorrerá a separação pela razão massa/carga (m/z) e, por fim, a detecção. A imagem na Figura 7, mostra a montagem do sistema LA-ICP-MS (GUNTER e HATTENDORF, 2005).

Figura 7 - Esquema montagem LA-ICP-MS



Fonte: Nunes (2015).

Uma desvantagem do LA-ICP-MS é a ocorrência de efeitos não estequiométricos na análise. Por outro lado, a maior vantagem é o fato de que a amostragem e a excitação/detecção podem ser otimizadas separadamente e o sinal depende apenas da massa ablada. Um desafio nesse tipo de análise sempre foi a calibração e ausência de materiais de referência para avaliar a exatidão, visto a diversidade de amostras que podem ser analisadas por esse método e, portanto, análise quantitativa. Dessa forma, inicialmente, a técnica ficou restrita a análise de poucos materiais com elementos que possuíam um comportamento muito semelhante (GUNTER e HATTENDORF, 2005).

Porém, com o passar do tempo foram produzidos materiais de referências produzidos no laboratório com matriz similar, possibilitou aumentar a gama de materiais analisados por LA-ICP-MS (GUNTER e HATTENDORF, 2005).

2.6 ANÁLISE DE POLIVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS

Controle de qualidade de fármacos é uma etapa crucial para que o produto possa ser colocado no mercado. Nos últimos anos a quantificação precisa e exata de certos elementos e impurezas em fármacos tem sido cada vez mais exigida pelas autoridades de supervisão e farmacopeias oficiais, já que alguns deles podem representar risco significativo para a saúde humana. Muitas vezes, impurezas são introduzidas aos fármacos de forma não intencional, através das matérias primas contaminadas, reagentes e equipamentos utilizados. As impurezas geralmente podem estar presentes no produto final na faixa de concentração de traço ou ultra-traço (PLUHÁČEK *et al.*, 2019).

Métodos por precipitação para metais pesados são imprecisos e têm baixa sensibilidade; a visualização dos precipitados é dificultada com a baixa concentração e interferências. Portanto, métodos espectrométricos, como ICP OES e ICP-MS são os mais indicados para a quantificação de elementos presentes como impurezas. São também indicados métodos baseados na espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) ou espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (PLUHÁČEK *et al.*, 2019).

Atualmente, ICP-MS e ICP OES são as técnicas de uso mais comum, porém, normalmente, requerem preparo de amostra de forma apropriado. O método de preparo de amostra e introdução pode ser definido quanto as necessidades e a praticidade. O método mais utilizado é a introdução de amostra nessas técnicas é na forma líquida. Portanto, para amostras sólidas, viscosas, com alto teor de matéria orgânica, entre outras, é necessário fazer uma decomposição prévia da mesma. A decomposição pode ser feita de diferentes formas, mas atualmente as decomposições em frasco fechado e com aquecimento via micro-ondas é bastante comum (PLUHÁČEK *et al.*, 2019).

Entretanto, está se tornando cada vez mais comum a utilização de métodos de introdução de amostra sólida, pois exige pequena quantidade de amostra, economiza tempo de preparo de amostra e minimiza o uso de reagentes. O acoplamento do LA ao ICP-MS é uma ferramenta de grande potencial, para análise de amostras sólidas. Contudo, raramente é utilizada para análise de fármacos devido indisponibilidade de materiais de referência para a calibração, dificuldade na definição de padrão interno e homogeneidade da amostra (PLUHÁČEK *et al.*, 2019). Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um método de calibração com hidroxiapatita para quantificação de polivitamínicos por LA-ICP-MS, bem como avaliar a influência da homogeneidade das amostras e da normalização ao ^{43}Ca nos resultados finais, por fim desenvolver um método prático, rápido e com o emprego de poucos reagentes.

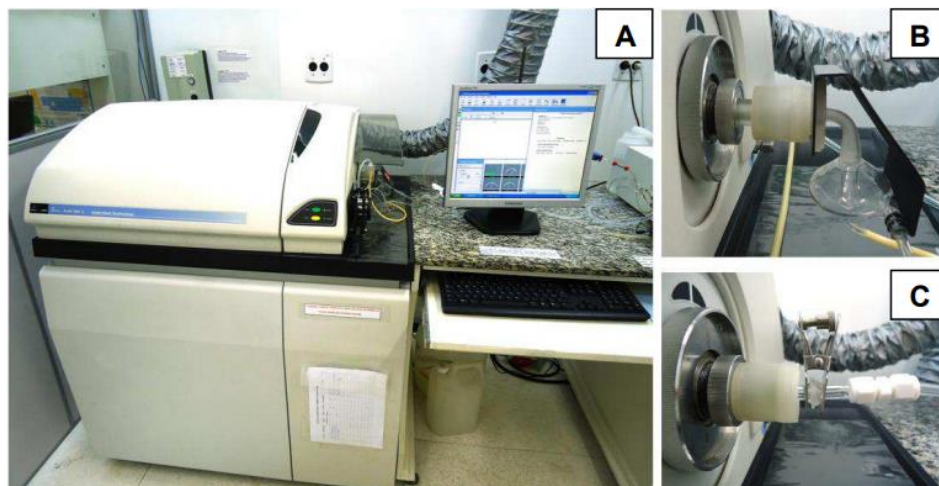
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados a instrumentação, soluções e reagentes utilizados para desenvolver o trabalho. Bem como, os procedimentos realizados para as análises dos polivitamínicos, como o preparo das amostras, curva de calibração e análise por LA-ICP-MS.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

O equipamento utilizado para a análise das amostras foi um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Canadá), que pode ser visto na Figura 8. Quando utilizado na forma convencional para introdução de amostras em solução é equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália) e tocha de quartzo com injetor com 2 mm de diâmetro interno. Equipado com um separador de massas do tipo quadrupolo e cela de reação dinâmica, a qual não foi utilizada. Para a realização dos experimentos com LA-ICP-MS removeu-se a câmara de nebulização e conectou-se o sistema ablação à laser diretamente na tocha do equipamento. Para isso foi utilizado um tubo de Tygon recoberto internamente com politetrafluoretileno (PTFE) de 4 mm de diâmetro interno. O plasma foi gerado a partir de argônio com pureza de 99,996%, proveniente de um tanque contendo Ar líquido. O mesmo gás foi utilizado como gás carregador do vapor gerado no laser. As condições operacionais utilizadas estão mostradas na Tabela 1.

Figura 8 - (A) foto do equipamento de ICP-MS; (B) está em destaque o detalhe da conexão do nebulizador e em (C) em detalhe a conexão com o tubo para ablação com laser



Fonte: Autora (2021).

Tabela 1 - Condições operacionais do equipamento de ICP-MS

ICP-MS	Condição
Potência de radiofrequência, W	1300
Vazão do gás principal, L min⁻¹	15
Vazão do gás auxiliar, L min⁻¹	1,2
Vazão do gás de nebulização, L min⁻¹	1,00
Cone de amostragem e skimmer	Pt
Isótopos monitorados	⁵⁵ Mn, ⁸⁷ Sr, ¹¹² Cd, ¹³⁸ Ba, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁴³ Ca

Fonte: Autora (2021).

A performance do equipamento foi avaliada em relação a formação de íons óxidos e íons de carga dupla. Para isso foi utilizada uma solução a 1 µg L⁻¹ de In e Ce e 10 µg L⁻¹ de Ba. Foram monitoradas as intensidades dos isótopos de ¹¹⁵In⁺, ¹⁵⁶CeO⁺/¹⁴⁰Ce⁺ e ¹³⁸Ba⁺⁺/¹³⁸Ba⁺.

Para a análise dos polivitamínicos por ablação a laser utilizou-se um equipamento contendo uma fonte de laser no estado sólido, composto pelo meio ativo Nd:YAG, operando com comprimento de onda de 266 nm (modelo LSX-266, Cetac Technologies, USA). Na Figura 9 está mostrado o sistema LA. A performance do equipamento LA-ICP-MS foi ajustada de forma a obter a melhor razão sinal/ruído (SBR).

Figura 9 - Foto do sistema laser utilizado



Fonte: Autora (2021).

O sistema do laser consiste em um microcomputador utilizado para operar o software de controle operacional do laser (DigiLaz G2, versão 4.1.2.1940). A fonte de laser de Nd:YAG, que é excitada por uma lâmpada de arco de xenônio que é mantida em 605 V, 72 W e pulso de 20 Hz. Um circulador de água também é parte da montagem e seu papel é refrigerar o sistema de geração de radiação laser, a temperatura normal de funcionamento é de 35 ± 3 °C. A duração do pulso de laser é inferior a 6 ns e a energia nominal do feixe é de 15 mJ. A frequência dos pulsos pode ser ajustada de 5 a 10 Hz. Uma câmara de ablação em formato circular faz parte do sistema e serve para alojar a amostra. A parte superior da câmara, por onde incide o feixe de laser, é de quartzo. Além disso, possui um orifício de entrada e outro de saída para Ar, o qual permite o carregamento do vapor da amostra até o ICP. Através da janela de quartzo é possível visualizar a amostra através de uma câmera digital (CCD) com resolução de 2 μ m. Os parâmetros avaliados e condições do laser podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros do laser usados para as análises

LA-ICP-MS	Condição
Vazão do gás de arraste, L min⁻¹	1,18
Diâmetro do feixe, µm	150
Velocidade de varredura, µm s⁻¹	100
Frequência do pulso do laser, Hz	20
Dwell time, ms	10
Varreduras (sweeps)	1
Varredura por replicata (readings)	variável
Replicatas	1
Energia*, %	50

* 100% de energia equivale a 15mJ.

Fonte: Autora (2021).

Uma prensa hidráulica (modelo Hydraulic Press 15 ton, Specac, Inglaterra) foi utilizada para a confecção de comprimidos, sendo feitos a pressão de 5 toneladas por 2 min. Esses comprimidos foram utilizados para análise em LA-ICP-MS.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as vidrarias ou frascos de polipropileno foram previamente descontaminados com HNO₃ 5% (v/v) por no mínimo 24 horas e posteriormente lavados com água de alta pureza. A água utilizada nos procedimentos passou por processos de destilação e deionização. A deionização foi feita em coluna de troca iônica (condutividade máxima de 1,2 µS cm⁻¹) e em sistema Milli-Q (Ultrapure Water Purification Systems, Millipore, Estados Unidos), cuja resistividade final foi maior do que 18,2 MΩ cm. O ácido nítrico concentrado (65% m m⁻¹, 1,4 kg L⁻¹, ALPHATEC, Brasil) foi purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição (modelo duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália).

Aas determinações por LA-ICP-MS foram feitas monitorando os isótopos de ⁵⁵Mn, ⁸⁷Sr, ¹¹²Cd, ¹³⁸Ba, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn, ⁵⁶Fe, ⁵⁷Fe e ⁴³Ca, sendo as curvas de calibração preparadas a partir de uma solução estoque multielementar a 10 mg L⁻¹ (SCP33MS, SCP Science, Canadá) e uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ (Merck IV, Certipur, Estados Unidos).

3.3 AMOSTRAS

Quatro amostras de polivitamínicos comerciais de diferentes marcas foram adquiridas em uma farmácia local e utilizadas para o desenvolvimento do trabalho. Para as análises por LA-ICP-MS, as amostras foram moídas em gral de ágata até granulometria inferior a 100 μm . Cerca de 300 mg do pó foram utilizados para a obtenção dos comprimidos. Na Figura 10 pode ser observada a aparência dos polivitamínicos e dos comprimidos obtidos. As amostras que possuíam cápsula de gelatina como invólucro do pó, tiveram as suas cápsulas descartadas antes da moagem, sendo utilizado somente o conteúdo do interior das cápsulas para a confecção dos comprimidos.

Figura 10 – As amostras utilizadas no trabalho podem ser vistas na fileira de cima e abaixo o comprimido confeccionado após a moagem e prensagem.



Fonte: Autora (2021).

3.4 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE LA-ICP-MS

A otimização da vazão do gás carregador foi feita de forma a obter uma condição de baixa taxa de formação de íons óxidos e de carga dupla, além de uma elevada sensibilidade, avaliada através da SBR. Nesse sentido, um dos comprimidos de polivitamínico foi fixado em uma lâmina de vidro e posicionado na câmara de ablação. Foram avaliadas vazões de Ar de 1,16 a 1,30 L min^{-1} .

A energia do laser foi avaliada de 10 a 100%, variando a cada dezena. O diâmetro do feixe do laser também foi avaliado na faixa de 50 a 200 μm . A

velocidade de varredura de 20 a 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ foi avaliada para a escolha da melhor condição, nesse sentido foi fixada em 100 $\mu\text{m s}^{-1}$.

3.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO EM LA-ICP-MS UTILIZANDO HIDROXIAPATITA

Para a calibração foram utilizadas porções de 300 mg de hidroxiapatita em pó, que foram pesados diretamente em frascos de polipropileno. Foram então adicionados 200 μL de solução de calibração com concentração crescentes na faixa de 0,25 mg L^{-1} a 1000 mg L^{-1} , homogeneizados e secos a temperatura ambiente. Após a secagem foram feitos comprimidos assim como com as amostras. A concentração foi estabelecida em função do volume e da concentração da solução adicionada e da massa do comprimido.

Após a avaliação das condições operacionais do sistema LA-ICP-MS, a calibração foi feita utilizando os comprimidos de 300 mg de hidroxiapatita previamente preparados com a adição de 200 μL de solução de calibração em concentrações crescentes. A ablação foi feita na forma de linha, com 3 linhas paralelas, representando assim três leituras ($n = 3$).

A calibração foi feita pelo método do padrão interno (IS), sendo usado o ^{43}Ca com IS. Para tal, foi feita a razão da intensidade média do sinal dos analitos em relação ao IS, considerando os 3 sinais (3 linhas) obtidos na ablação dos comprimidos. Ou seja, para a correção de sinal com ^{43}Ca a intensidade do analito foi dividida pela intensidade de ^{43}Ca da leitura correspondente.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método de LA-ICP-MS foram obtidos a partir da ablação de 10 linhas no comprimido do branco da curva (hidroxiapatita). O LOD e LOQ foram calculados utilizando-se a relação $\text{LOD} = B + k \cdot \sigma$ (B é a média de 10 leituras do branco, k é equivalente a 3,33 e o σ desvio padrão relativo das 10 leituras) e $\text{LOQ} = B + k \cdot \sigma$ (B é a média de 10 leituras do branco, k é equivalente a 10 e o σ desvio padrão relativo das 10 leituras).

3.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE POLIVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS.

Após estabelecer as condições de ablação e obter as curvas de calibração, as amostras de polivitamínicos foram analisadas por LA-ICP-MS. Para tal, 3 linhas foram ablatadas e escolhidas em diferentes regiões na amostra e de forma aleatória.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes a análise das amostras de polivitamínicos. Serão mostrados os perfis de sinais obtidos por LA-ICP-MS, as curvas de calibração, e também, as concentrações finais dos elementos determinados.

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA DE LA-ICP-MS

Os sinais obtidos a partir das análises por LA-ICP-MS podem ser contínuos ou transientes, inteiramente dependente da forma como o pulso de laser é aplicado na amostra durante a ablação, podendo ser pulsado ou contínuo (NUNES, 2015). Fatores como tempo de aquisição, quantidade de material vaporizado, limites de detecção, entre outros, podem ser afetados pela forma de ablação. No caso da análise de polivitamínicos foi aplicado o modo de ablação contínuo, em virtude do equipamento de ICP-MS ser sequencial e, portanto, a ablação contínua da amostra resulta na aquisição de um sinal mais estável, o que auxilia na precisão já que esse tipo de material é bastante heterogêneo (NUNES,2015). No modo de ablação contínuo, uma linha é traçada ao longo da amostra, com o auxílio de ferramentas do programa do sistema de LA. A aquisição do sinal se inicia no momento em que o laser é ativado para ablação (NUNES,2015).

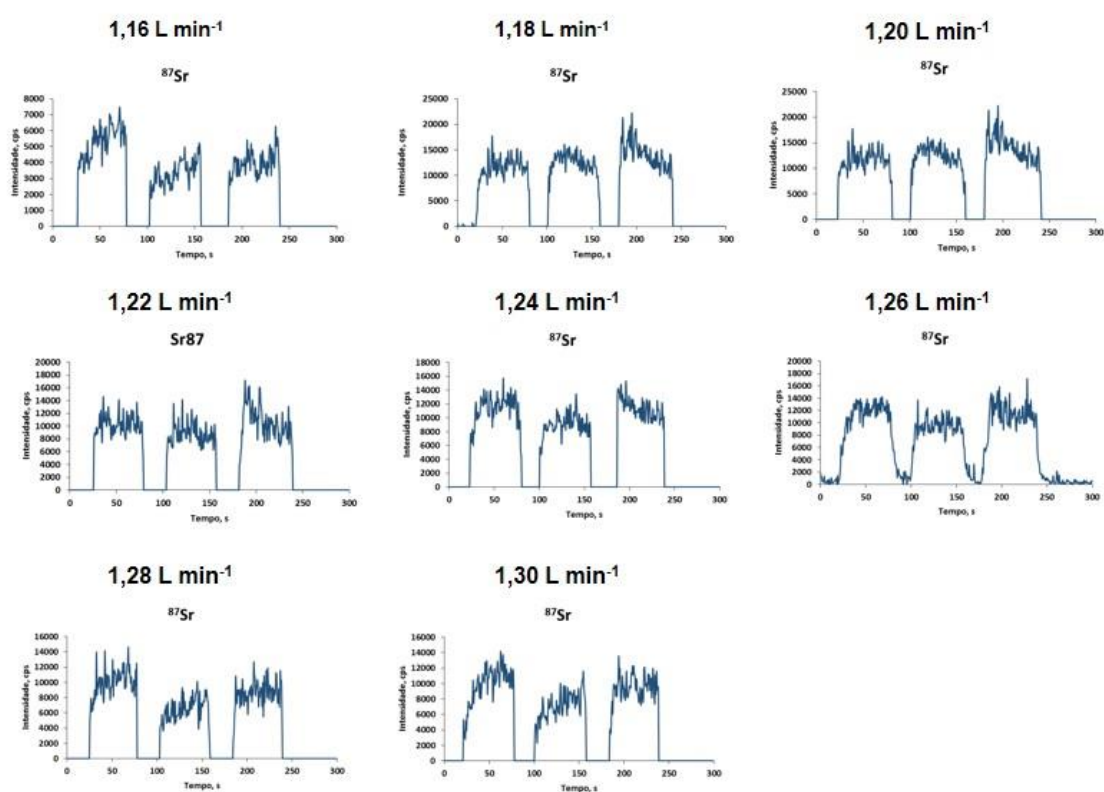
Nas análises por LA-ICP-MS, é necessário realizar a otimização da vazão de gás tanto do sistema de ablação quanto do espectrômetro, para obter a melhor relação sinal/ruído. Para a detecção, é necessária uma intensidade suficientemente boa para quantificar os analitos e evitar saturação da intensidade do sinal nas razões m/z de interesse. O excesso de material ablado pode causar problemas, como, efeito de memória, instabilidade no plasma e deposição de material na interface (NUNES, 2015).

Devido ao fato do mecanismo de interação do laser com os diferentes tipos de materiais ser complexo, é necessário ajustar as condições operacionais do sistema de LA-ICP-MS, de tal maneira que esses efeitos sejam eliminados ou minimizados, resultando em uma atomização/ionização completa no plasma. De maneira similar como se faz otimizações para análises de soluções, as

condições do equipamento para análise por LA-ICP-MS também necessitam de otimizações. O ajuste dos parâmetros como vazão de gás carregador, tempo de leitura em cada m/z, número de varreduras em cada leitura (sweeps per reading), leituras por replicatas (readings per replicate) e número de replicatas (number of replicates) auxiliam na obtenção de uma boa resposta do ICP-MS.

De acordo, o parâmetro de dwell time foi ajustado em 10 ms. A vazão de gás carregador foi otimizada visando melhor sensibilidade do equipamento ao longo da faixa de m/z a ser estudada. Vazões de gás entre 1,16 e 1,30 L min⁻¹, foram avaliadas, sendo 1,18 L min⁻¹ escolhida para as análises, os sinais obtidos para as diferentes vazões de gás estão na Figura 11.

Figura 11 - Sinais obtidos na avaliação da vazão de gás

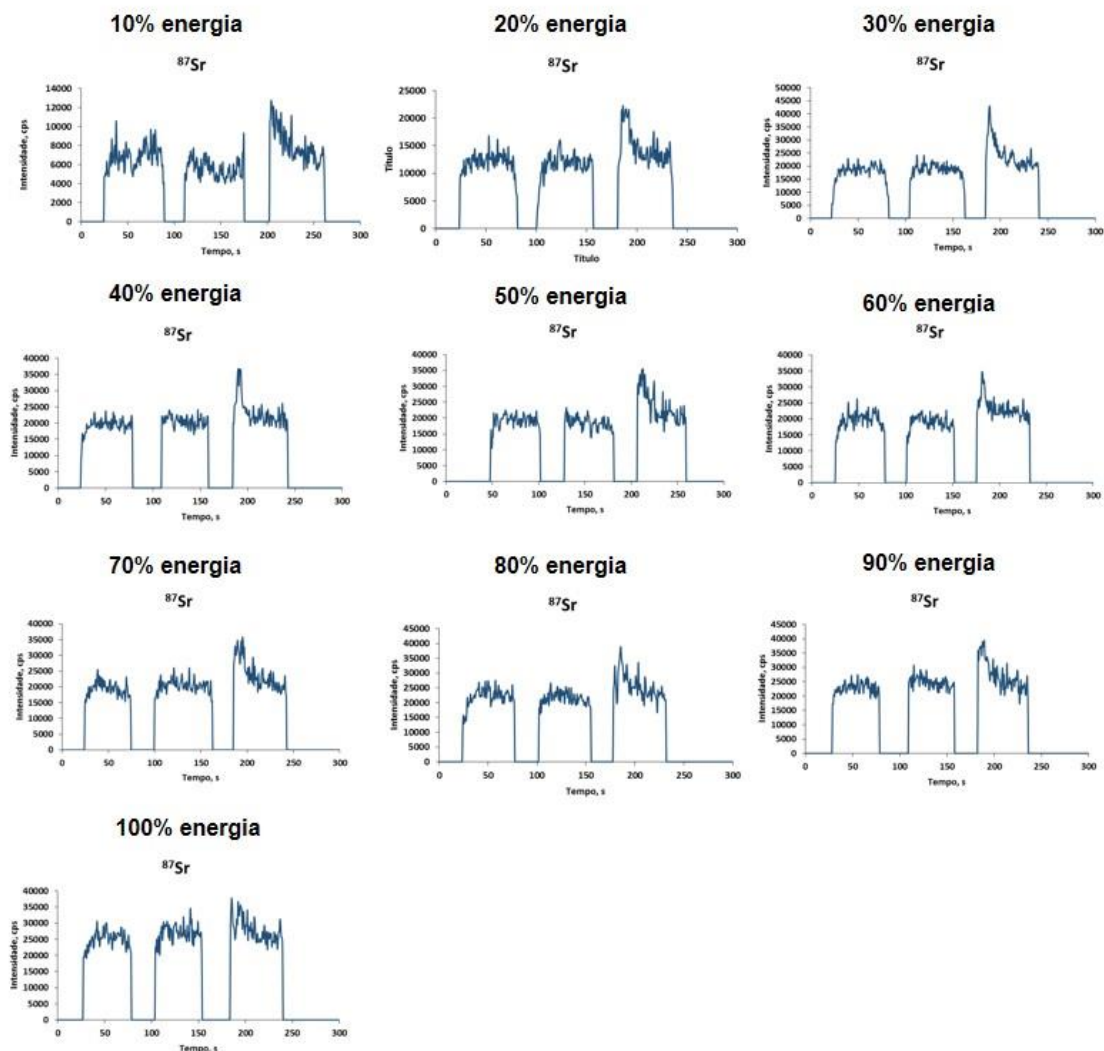


Fonte: Autora (2021).

A energia do laser, o diâmetro do feixe e a velocidade de varredura, são as condições de ablação que podem ter maior influência nos resultados e, portanto, devem ser avaliadas.

A energia do laser utilizada nos procedimentos envolvendo tanto as curvas de calibração em hidroxiapatita, quanto as amostras foi mantida em 50%. Foram avaliadas condições de energia de 10 a 100% em um comprimido da amostra A, considerando 50% energia suficiente para a completa remoção de uma fina camada da superfície da amostra. Energias superiores contribuem para o transporte de uma maior quantidade de material ablado, porém não foi observado melhora significativa na razão sinal/ruído. Na Figura 12 podem ser vistos os sinais para cada uma das energias.

Figura 12 - Sinais obtidos na avaliação da energia do laser



Fonte: Autora (2021).

A velocidade de varredura do laser também foi avaliada, usando o modo de ablação contínua na amostra A, sendo avaliadas velocidades de 20 a 150 $\mu\text{m s}^{-1}$. A melhor condição foi de 100 $\mu\text{m s}^{-1}$.

O efeito do diâmetro do feixe de laser nas intensidades de sinais também foi avaliado. Foram avaliados feixes de 50 a 200 μm , sendo 150 μm fixado como melhor condição. O diâmetro do feixe influencia diretamente na quantidade de material removido na ablação que pode influenciar em parâmetros como LOD.

4.2 NORMALIZAÇÃO DO SINAL DOS ELEMENTOS EM RELAÇÃO AO ^{43}Ca

O sinal adquirido durante as análises pela técnica de LA-ICP-MS durante a introdução de amostras é proporcional à concentração do analito na amostra. Quando se trata da introdução de amostras líquidas há muita facilidade em encontrar materiais de referência na forma de soluções multielementares, para a confecção de curvas de calibração. Entretanto, em contrapartida o maior desafio em se trabalhar com o método de introdução de amostra sólida por LA-ICP-MS é a ausência de materiais de referência suficientemente semelhantes às amostras, a ponto de evitar interferências não espectrais e possibilitar a obtenção de curvas de calibração com boa linearidade (NUNES,2015).

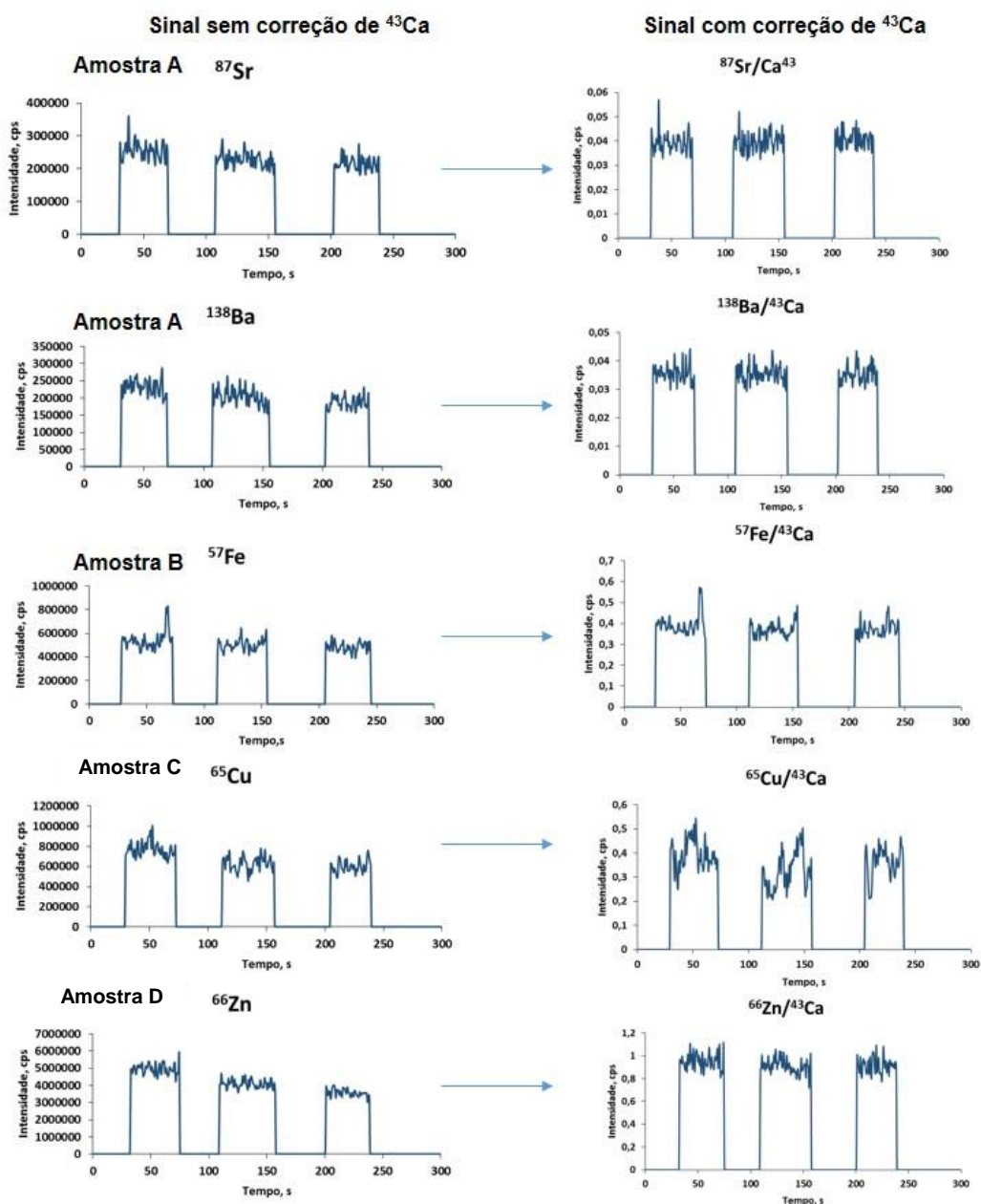
Para corrigir efeitos, como a eficiência de ablação e transporte dos vapores das amostras até o plasma e da curva (caso a matriz em ambos materiais seja diferente), evitando possíveis interferências não espectrais, uma saída é o uso da calibração com padrão interno (normalização do sinal) (FRICK *et al*, 2012).

O procedimento de correção consiste na utilização de um elemento que esteja homogeneamente distribuído na amostra e no material suporte para a curva, neste caso o ^{43}Ca foi escolhido como elemento de referência. Apesar do ^{43}Ca ser um dos principais constituintes tanto nas amostras quanto na hidroxiapatita, a sua utilização como elemento de referência precisou ser avaliada.

Para a normalização, primeiramente foi calculado o fator de ajuste para o ^{43}Ca nas amostras em relação a hidroxiapatita. Calculou-se o percentual de Ca nas amostras e na hidroxiapatita e foi calculado o fator de ajuste que é o percentual de Ca na hidroxiapatita, dividido pelo percentual de Ca na amostra.

Este fator foi então multiplicado pela intensidade de Ca na amostra e então divide-se a intensidade do sinal do elemento a ser quantificado pela intensidade do Ca multiplicada pelo fator de correção. A concentração dos analitos foi então calculada a partir da média da intensidade da razão $M^+/^{43}\text{Ca}$ (M é o analito). Na Figura 18, é possível ver a diferença no sinal com a correção de ^{43}Ca e sem a correção para alguns analitos.

Figura 18 - Sinais antes e depois da aplicação da correção de ^{43}Ca



Fonte: Autora (2021).

Quando fazemos a correção para Ca, corrigimos as possíveis interferências não espectrais que podem ser causadas, principalmente, pela diferença na quantidade ablada dos materiais da curva e das amostras e, também, os efeitos de transportes dos gases e aerossóis (FRICK *et al.*, 2012). Com o uso do a como IS foram obtidas curvas de calibração com boa linearidade, para alguns elementos estudados.

4.3 CALIBRAÇÃO POR LA-ICP-MS UTILIZANDO HIDROXIAPATITA

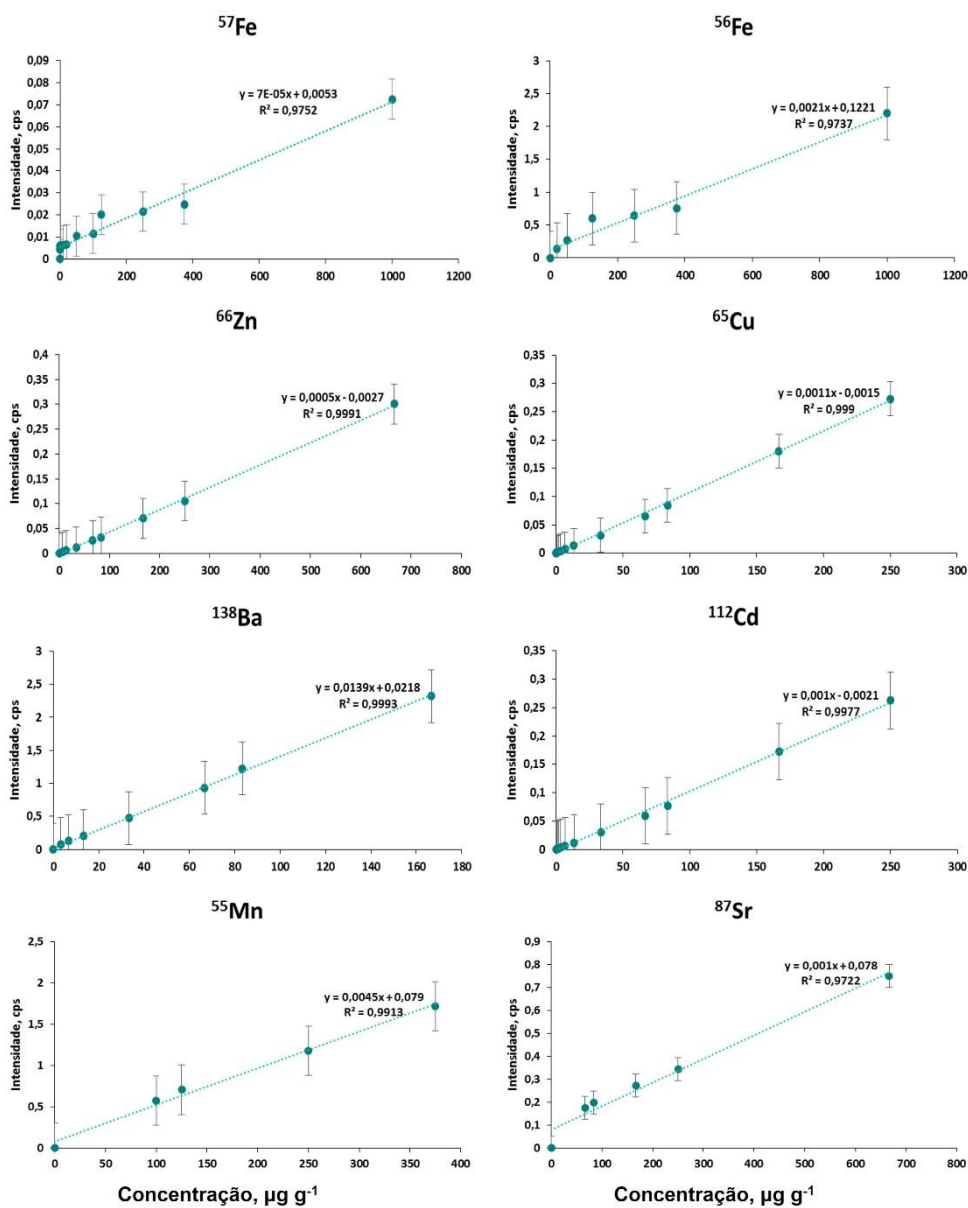
Diferentes estratégias de calibração em LA-ICP-MS têm sido propostas para a análise de amostras com diferentes composições. Entretanto, o procedimento proposto no presente trabalho, utilizando soluções de referência adicionadas em hidroxiapatita na forma de comprimidos, foi desenvolvido baseado na metodologia utilizada por Neves *et al.* (2018), onde foram utilizadas soluções de referência em solo na forma de comprimidos para a calibração.

Após realizadas as otimizações de ablação e detecção, o sistema LA-ICP-MS foi utilizado para a obtenção de curvas de calibração para os analitos estudados.

Cada comprimido foi inserido individualmente na câmara de ablação, após ser colocado sobre uma lamina de vidro que serviu como suporte. Para cada ponto da curva foram marcadas três linhas para ablação sobre o comprimido.

Cada linha foi ablada nas condições de 1300 W de potência de radiofrequência do equipamento, vazões de gás principal, auxiliar e carregador de 15, 1,20 e 1,18 L min⁻¹, respectivamente. As condições de ablação citadas acima foram mantidas. Todas as intensidades foram processadas para a obtenção das curvas de calibração com normalização ao ⁴³Ca, considerando as intensidades médias das três linhas de ablação. Todas as curvas de calibração obtidas para cada um dos isótopos monitorados estão mostradas na Figura 13.

Figura 13 - curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS para ^{57}Fe , ^{56}Fe , ^{66}Zn , ^{65}Cu , ^{138}Ba , ^{112}Cd , ^{55}Mn e ^{87}Sr .



Fonte: Autora (2021).

As curvas de calibração obtidas para os oito isótopos avaliados, permitiram a obtenção de bons valores de R^2 . Entretanto as curvas de calibração para Fe, Sr e Mn não estão analiticamente hábeis, Fe pode ter sofrido interferências tanto do íon poliatômico Ar e O, quanto interferências de homogeneidade, assim como Sr e Mn podem ter sido afetados pela falta de homogeneidade e formação de íons poliatômicos (NEVES, 2010). Foi possível verificar a viabilidade de utilizar soluções referência em pastilhas de sólido para uma faixa ampla de calibração para as análises por LA-ICP-MS.

4.4 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR LA-ICP-MS

Além da linearidade das curvas de calibração, uma técnica analítica também deve ser caracterizada quanto aos limites de detecção. Esse parâmetro é relacionado à concentração de analito que produz uma intensidade de sinal significativamente diferente do ponto correspondente ao branco ou da linha base do instrumento (MILLER *et al*, 2005).

Os LOD e LOQ do método de LA-ICP-MS foram calculados a partir da ablação de 10 linhas na pastilha do branco da curva. O LD e o LQ foram calculados como $I + 3,33 SD$ e $I + 10 SD$, onde I é a média da intensidade das 10 linhas do branco e SD é o desvio padrão das intensidades médias. Os valores obtidos para a intensidade de cada um dos isótopos foram interpolados nas curvas de calibração e os resultados obtidos para cada um, podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites de detecção e quantificação para a técnica de LA-ICP-MS empregando pastilhas de hidroxiapatita para a calibração

	LD $\mu\text{g g}^{-1}$	LQ $\mu\text{g g}^{-1}$
⁶⁶ Zn	9,37	13,94
⁶⁵ Cu	2,02	2,78
¹³⁸ Ba	1,86	2,11
¹¹² Cd	2,66	2,94

Fonte: Autora (2021).

Como já foi observado através de outros trabalhos, geralmente os valores de LOD e LOQ para LA-ICP-MS são superiores aos observados em técnicas de ICP-MS com nebulização pneumática. Apesar de serem superiores, são satisfatórios para a análise de muitos materiais (MONTASER, 1998).

4.5 ANÁLISE DE POVITAMÍNICOS POR LA-ICP-MS

Após o preparo dos comprimidos para a análise por LA-ICP-MS, as amostras A, B, C e D foram submetidas a ablação com as mesmas condições já descritas acima; a potência de radiofrequência em 1300 W, a energia do laser

foi mantida em 50%, a velocidade de varredura em $100 \mu\text{m s}^{-1}$, a frequência de pulso do laser em 20 Hz e o diâmetro do feixe em $150 \mu\text{m}$.

Cada comprimido de amostra foi ablado em três linhas. Uma imagem do comprimido depois de ablado é mostrada na Figura 14.

Figura 14 - Foto de um comprimido de amostra após a ablação pelo laser



Fonte: Autora (2021).

As intensidades dos sinais dos analitos foram normalizadas em relação a intensidade do ^{43}Ca que foi utilizado como padrão interno (IS), pois estava presente nas amostras e na curva de calibração. E as concentrações determinadas para cada elemento foram comparadas com os valores das tabelas de informação nutricional contidos nas embalagens. Os resultados obtidos por LA-ICP-MS e os valores das tabelas de informação nutricional estão mostrados na Tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 4, na tabela nutricional não constavam valores para ^{55}Mn , ^{87}Sr , ^{112}Cd e ^{138}Ba . Manganês foi detectado em todos os 4 suplementos em uma faixa de 300 a $650 \mu\text{g g}^{-1}$, os outros ficaram todos abaixo do LOQ, com exceção de ^{87}Sr e ^{112}Cd para a amostra C. Dos elementos que consta o valor na tabela nutricional, o ^{65}Cu apresentou uma diferença significativa nas amostras A e B, porém, as amostra C e D tiveram um valor muito próximo ao esperado. A diferença nos valores para as amostras A e B, pode ter sido ocasionado pela heterogeneidade do material, esse fato será tratado na seção 4.6 *Homogeneidade das amostras*. Para ferro e zinco, os erros associados foram significativos, exceto pelo ^{56}Fe e ^{57}Fe na amostra C, que foi baixo como o esperado. Para as amostras A, B e D, as causas dessas diferenças significativas podem estar associadas, principalmente, a variações na

homogeneidade das partículas em cada amostra, assim como à diferente distribuição dos elementos nas partículas que constituem os comprimidos.

Tabela 4- Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos por LA-ICP-MS e valores informados na tabela nutricional.

Elemento		Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
Cd 112	Tabela nutricional	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	LA-ICP-MS	<2,94	<2,94	7,94 \pm 1,15	3,82 \pm 0,08
Cd 112	Tabela nutricional	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	LA-ICP-MS	<2,11	<2,11	<2,11	<2,11
Cu 65	Tabela nutricional	250	1142,86	307,69	301
	LA-ICP-MS	145,85 \pm 27,16	273,31 \pm 52,27	329,85 \pm 31,06	231,12 \pm 0,96
Zn 66	Tabela nutricional	1941,67	10000	7692,31	4682,27
	LA-ICP-MS	765,98 \pm 66,34	2572,83 \pm 328,80	5501,14 \pm 410,27	1857,74 \pm 48,23

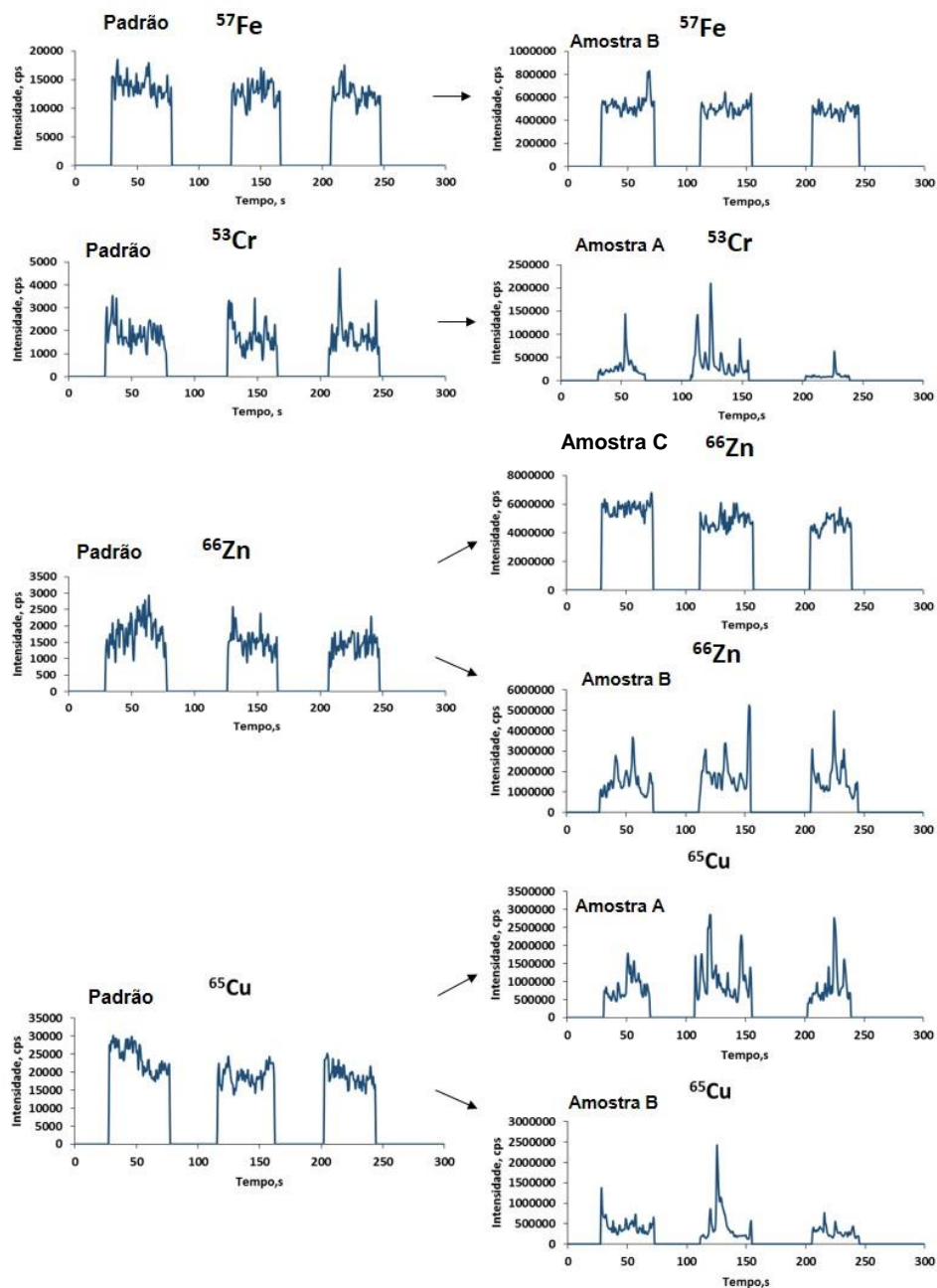
*N.C. = Não consta

Fonte: Autora (2021).

4.6 HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS

Para o preparo da curva de calibração, foi adicionada e homogeneizada sobre a hidroxiapatita uma solução de referência com concentrações conhecidas dos elementos a serem quantificados, após a homogeneização e secagem foram preparados os comprimidos. As amostras passaram por uma etapa de moagem com gral e pistilo de ágata até um tamanho de partícula inferior a 100 μm para melhor homogeneização e logo após a confecção dos comprimidos. Pode-se observar através dos perfis obtidos por LA-ICP-MS a homogeneidade das amostras. Na Figura 15, no perfil do padrão de hidroxiapatita, pode-se observar um sinal contínuo e sem muito ruído, assim como em alguns dos elementos como por exemplo ^{57}Fe na amostra A, ^{66}Zn na amostra C; já para elementos como o ^{53}Cr na amostra A, ^{66}Zn na amostra B e ^{65}Cu nas amostras A e B é possível observar uma alta variação no sinal, o que indica que possivelmente a distribuição não é homogênea ou interferências de íons poliatômicos no plasma.

Figura 15 - Perfis obtidos por LA-ICP-MS para os padrões e amostras



Fonte: Autora (2021).

Essa inconsistência nos sinais pode acarretar em erros na quantificação pois, caso o problema seja a homogeneidade ou formação de íons poliatômicos, a porção ablada não foi representativa da amostra como um todo e, portanto, os resultados na quantificação podem não ser satisfatórios. Como foi visto na Seção 4.5 *Análise de Polivitamínicos por LA-ICP-MS*, nas amostras A e B para ^{65}Cu houve um erro significativo; esse erro pode ter sido causado pela falta de

homogeneidade nas amostras como se pode observar na Figura 15, onde a esquerda temos o perfil de sinal do padrão de hidroxiapatita que tem uma boa homogeneidade e ao lado direito temos os sinais das amostras onde é notável a alta variação do sinal.

Foram feitos testes de homogeneidade com as amostras na sua forma original. Para tal, os comprimidos foram apenas “lixados” até a obtenção de uma superfície plana para a ablação e, então, foram fixados sob uma lâmina de vidro e ablados. Na Figura 16 é mostrada uma foto dos comprimidos.

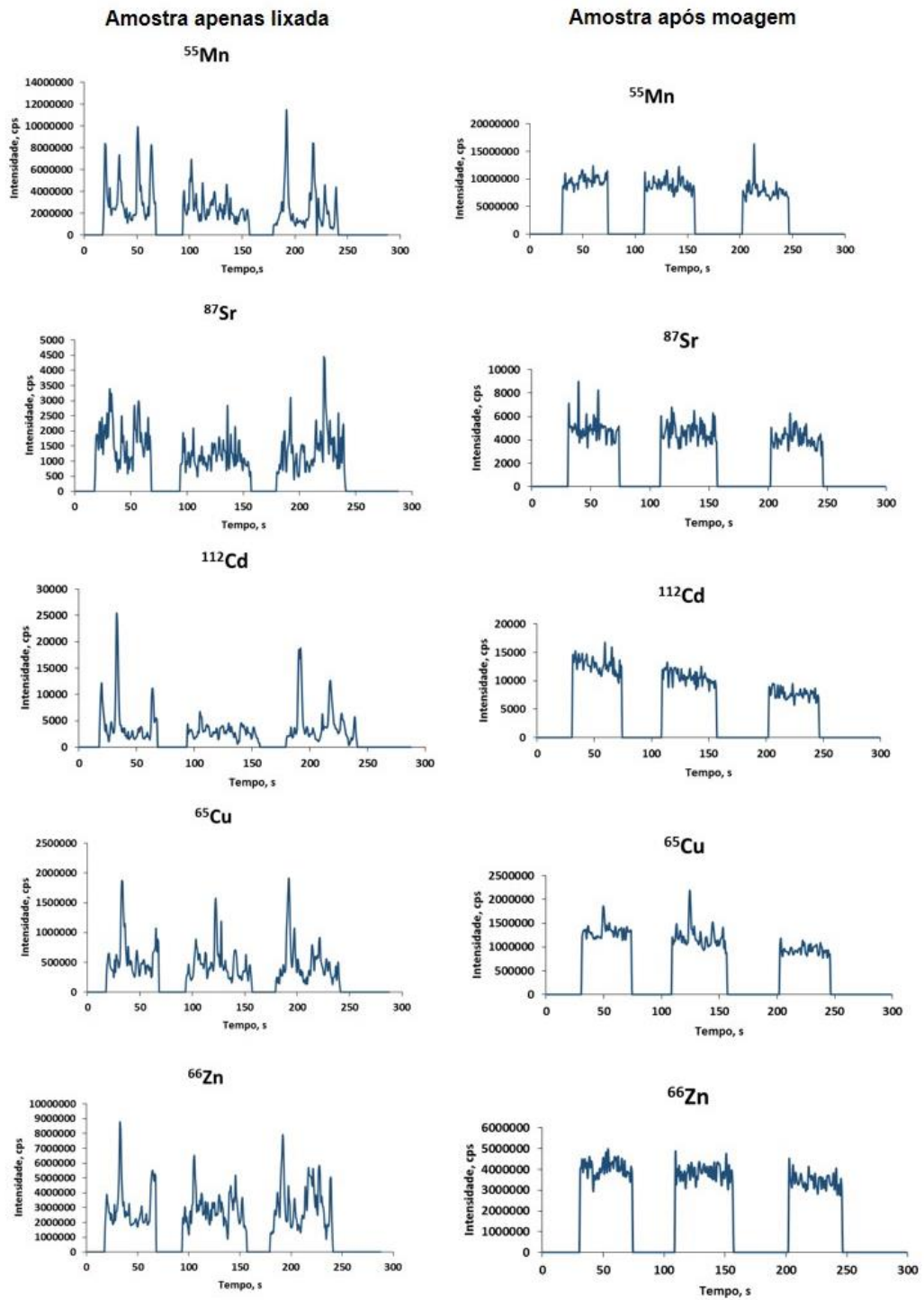
Figura 16 - Comprimidos de amostra com superfície lixada para ablação, fixados sobre lâmina de vidro



Fonte: Autora (2021).

Os sinais obtidos para a amostra lixada foram comparados com os sinais da amostra após a moagem e podem ser vistos na Figura 17. A partir da análise dos sinais obtidos para a amostra no seu estado natural, é possível observar a influência da homogeneidade nos resultados finais. Os sinais para todos os elementos tem elevada variação e com um ruído significativo, o que interfere na quantificação, pois a porção ablada não é representativa do todo que está presente na amostra.

Figura 8 - Sinais das amostras antes e depois da moagem



Fonte: Autora (2021).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia de calibração para a análise quantitativa de elementos em polivitamínicos por LA-ICP-MS. A utilização da hidroxiapatita como uma forma de ajustar a matriz entre a curva de calibração e dos fármacos, mostrou-se eficiente para tal função. Após serem avaliadas e otimizadas as condições do ICP-MS e do sistema LA-ICP-MS, pôde-se observar o efeito de condições de preparo de amostra, como o tamanho de partícula e homogeneidade, na precisão e exatidão dos resultados. Notou-se, também, a necessidade de utilizar o ^{43}Ca para correção de efeitos relacionados à quantidade de material ablado.

Os limites de detecção obtidos no procedimento, foram maiores que os usuais em ICP-MS por nebulização pneumática, porém é compensado pela simplicidade no preparo de amostras, uma vez que o procedimento só envolve moagem e prensagem do comprimido.

O trabalho supriu limitações do uso da técnica pela ausência de matérias de referência certificados (CRM), uma vez que o procedimento de calibração com hidroxiapatita se mostrou simples e eficiente. Possibilita a análise direta de sólidos, rápida e sem grande manipulação das amostras, bem como pouco uso de reagentes.

Os resultados obtidos são promissores em relação a análise de polivitamínicos, possibilitando o desenvolvimento de trabalhos futuros relacionados a avaliação de tamanho de partícula e homogeneidade dos comprimidos e comparação a outras técnicas já estabelecidas para validar o procedimento.

REFERÊNCIAS

- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química dos alimentos de Fennema**. 4ª edição, São Paulo. ARTMED, 900 p, 2010.
- FRICK, D. A., GUNTHER, D., **Fundamental studies on the ablation behavior of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard**, Journal of Atomic Spectrometry 27 (2012) 1284-1303.
- GUNTHER, D., HATTERNDORF, B., **Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry**, Trac-Trends in Analytical chemistry 24 (2005) 255-265.
- GRAY, A. L. **Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry**. Analyst 110, 5551-556, 1985.
- MCCALL, A. S.; CUMMINGS, C. F.; BHAVE, G.; VANACORE, R.; PAGE-MCCAW, A.; HUDSON, B. G. **Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture**. Cell 157, 1380-1392, June 5, 2014.
- MILLER, J. N., MILLER, J. C., **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**, 5th ed., Pearson, 2005, p 285.
- MONTASER, A., **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Wiley-VCH, 1998, p 1004.
- NEVES, V. M.; HEIDRICH, G. M.; HANZEL, F. B.; MULLER, I. E.; DRESSLER, V. L. **Rare earth elements profile in a cultivated and non-cultivated soil determined by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry**. Chemosphere, 198, 2018.
- NUNES, M. A.G. **Avaliação da calibração em LA-ICP-MS usando papel filtro para análise de plantas**. Tese (doutorado)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- PLUHÁČEK, T.; RUCKA, M.; MAIER, V. **A direct LA-ICP-MS screening of elemental impurities in pharmaceutical products in compliance with USP and ICH-Q3D**. Analytica Chimica Acta, 1078, 2019.
- SILFVAST, W. T. **Laser Fundamentals**, 2nd ed., Cambridge University Press, p. 674, 2008.
- SILVA, P. S. **Bioquímica dos alimentos**. Editora Sagah, p. 168, 2018.
- YOUNG, M. **Optics and Lasers Including Fibers and Optical Waveguides**. 4th ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, p. 344, 1992.
- YOUNG, M. **Óptica e Lasers**. Editora da Universidade São Paulo, p. 448, 1998.