INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

L. 19 743

NÃO CIRCULAR

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Introdução da Técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por
Electrospray para Determinação da Razão Isotópica Baseada em Complexos de
Carga Simples com Ligantes Monoisotópicos. Uma Nova Alternativa para Boro e
Metais de Transição**

Maria Carolina Blassioli Moraes

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo

17 de agosto de 2001

0843

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004046

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

M827i Moraes, Maria Carolina Blassioli
Introdução da técnica de espectrometria de massas com
ionização por electrospray para determinação da razão isotópica
baseada em complexos de carga simples com ligantes
monoisotópicos. Uma nova alternativa para boro e metais de
transição / Maria Carolina Blassioli Moraes. -- São Paulo, 2001.
160p.

Tese (doutorado) -- Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Lago, Claudimir Lucio do

I. Espectrometria de massa : Química analítica I. T. II.
Lago, Claudimir Lucio do, orientador.

543.0873 CDD

“Introdução da Técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray para Determinação da Razão Isotópica Baseada em Complexos de Carga Simples com Ligantes Monoisotópicos. Uma Nova Alternativa para Boro e Metais de Transição”

MARIA CAROLINA BLASSIOLI MORAES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. ELISABETH DE OLIVEIRA
IQ – USP

Prof. Dr. PAULO CELSO ISOLANI
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA FERNANDA GEORGINA GUINÉ ROSIAS
CENA – USP – Piracicaba

Prof. Dr. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
17 DE AGOSTO 2001.

Sou vil, sou reles, como toda a gente,
Não tenho idéias, mas não os tem ninguém.
Quem diz que os tem é como eu, mas mente.
Quem diz que busca é porque não os tem.

É com a imaginação que eu amo o bem.
Meu baixo ser porém não mo consente.
Passo, fantasma do meu ser presente,
Ébrio, por intervalos, de um Além.

Como todos não creio no que creio.
Talvez possa morrer por esse ideal.
Mas, enquanto não morro, falo e leio.

Justificar-me? Sou quem todos são...
Modificar-me Para meu igual?...
-Acaba lá com isso, ó coração!

Fernando Pessoa (Álvaro de Campos)

Dedico este trabalho ao amigo e orientador
Claudimir Lucio do Lago

Agradecimentos

As pessoas mencionadas nesta página contribuíram direta ou indiretamente para a execução e confecção desta tese. A essas pessoas, o meu agradecimento pelos anos de amizade e aprendizado que foram proporcionados.

Ao pessoal da CPG, Milton, Cibele, Maria Inês e Emiliano

Aos professores Claudimir, Lúcio Agnes, Gutz, Mauro Bertotti e Helena Ferraz.

Aos técnicos Renato, Marcel, Ricardo e Fernando.

Ao pessoal do laboratório Alberto, Alexandre, Zé Geraldo, Adalgiza, Carlos, Dosil, , Flávio, Osmar, Rogério, Eduardo, Heron, Rodrigo, Márcio, Beirute, William, Valberes, Jairo, Carla, Patrícia, Daniela, Adriana, Vítor, Lúcia, Andréa, Zé Maria.

Agradecimentos especiais aos amigos Renato, Vânia e Robinson.

Aos colegas de baladas Fernando (Macabro), Laerte, Mimi, Ana Paula, Daniela, Fábio, Vânia, Marco Antônio, Guilherme, Greg, Marconi, Luis, PC, Fernando, Gustavo, Luciene, Denise.

Aos amigos de graduação: Cristina, Vítor, Chico, Carla, Núria, Paulo, Lia, Xuxu, Lolo, Osmar, Luli, Helen, Maria Amélia, Rose, Ritinha, Benê, Zé Formol, Fabiana, Lúcio, Marcos Masliaev, Evelise, Saldanha, Padilha,

À minha mãe, Elizabeth e minhas irmãs Carlota e Maria.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

A espectrometria de massas com ionização por electrospray (ES-MS) foi proposta para medidas da razão isotópica de alguns metais de transição e boro através de complexos com carga simples e ligantes monoisotópicos. Vários experimentos combinando estes elementos com iodeto e fluoreto são apresentados. Cloreto e cianeto foram utilizados em estudos sobre o comportamento destes complexos. De um modo geral, os metais geraram picos mais intensos com cloreto e iodeto, já o boro forneceu um cluster abundante como BF_4^- . A principal tendência é a formação de espécies com carga simples pela associação dos íons metálicos com os ânions presentes na solução ou pela perda de um ou mais ligantes. Em alguns casos, esta tendência é mais forte que a manutenção do estado de oxidação do metal na fase líquida. Para cobre e ferro, a variação dos estados de oxidação depende do solvente, de outras espécies em solução e das tensões aplicadas ao cone de amostragem. Estes e outros resultados mostram que a quantificação e especiação não são tarefas muito fáceis, mas há a possibilidade de usar a técnica para medidas isotópicas com os complexos formados com os ligantes monoisotópicos. As principais vantagens neste caso seriam a mudança de m/z para região de massa alta, o que diminui as chances de interferência isobárica, e a ausência de hidretos, comumente observados no modo de íons positivos e sem ligantes. O tetrafluoroborato foi proposto para determinações de razão isotópica do boro ($^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$). Os espectros obtidos em condições brandas mostram-se livres de interferência isobárica e com resolução de linha base na região de m/z 86 e 87, que corresponde a $^{10}\text{BF}_4^-$ e $^{11}\text{BF}_4^-$. Soluções predominantemente aquosas em meio ácido não devem ser armazenadas, pois ocorre a hidrólise do BF_4^- .

Para minimizar o efeito de memória na fonte de íons, um novo contra eletrodo, tipo *cross-flow*, foi manufaturado e substituiu o contra-eletrodo original do tipo *pepper-pot*. Além disto, foram feitos estudos sobre a ação de algumas substâncias que formam complexos não voláteis com boro, como manitol, Triton X-100 e amônia.

Estas substâncias são comumente usadas para auxiliar na minimização do efeito de memória em ICP-MS. Observou-se uma diminuição no tempo necessário para limpar a fonte de electrospray, mas o resultado não foi satisfatório. Um procedimento alternativo – e bem mais eficaz – é provocar a hidrólise do BF_4^- residual, o que pode ser feito com um spray de ácido sulfúrico 1mmol/L.

Descarga corona é um evento raro, mas que altera drasticamente o espectro. Assim, a mediana e o desvio absoluto da mediana (MAD) foram usados como avaliadores da tendência central e do desvio, respectivamente.

A influência das tensões da fonte, do detector, e os fluxos dos gases sobre a razão isotópica foram investigados. Nenhum efeito sistemático foi observado, mas existe discriminação de massas que pode ser corrigida por calibração com padrão certificado do National Institute of Standards and Technology (NIST) de ácido bórico SRM 951.

Foram realizados estudos de interferência isobárica e supressão da espécie de interesse. Íons comuns como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Br^- e Cl^- não causaram interferência isobárica e fracionamento isotópico. A precisão obtida para a medida da razão isotópica para injeções de 5 min de solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de B foi tipicamente 0,4 ‰, que é comparável àquela obtida por ICP-MS e TIMS. O método proposto também permite a quantificação através da diluição isotópica.

Como a técnica de electrospray exige uma concentração do analito superior a 10^{-6} mol/L para obter um pico detectável e não sofrer supressão pelos eletrólitos em solução, um passo importante na análise de amostras é a pré-concentração. Procedimentos de abertura, pré-concentração e eliminação de interferentes catiônicos foram propostos para amostras de solo, sabão em pó e folhas de algodoeiro. Além destes, duas amostras de plantas certificadas para concentração de boro, pelo National Institute of Standards and Technology, foram avaliadas - folhas de pessegueiro e folhas de macieira. Os resultados obtidos foram excelentes, mostrando que o procedimento desenvolvido para a abertura da amostra, pode vir a ser um método bastante simples e eficaz para análise de boro em amostras reais. É claro que dependendo da amostra a matriz será diferente e outros procedimentos precisarão ser tomados.

ABSTRACT

A negative-mode electrospray ionization mass spectrometry was proposed to study of isotopic measurements some transition metal ions and boron through of complexes with monoisotopoic ligands. Several experiments combining these elements with iodide, fluoride, chloride, and cyanide are presented. Methanol/water was mainly used as the solvent in order to reduce the surface tension and, thus, the voltage at the capillary tip. Some common behaviors could be observed. Metals give more abundant peaks with iodide and chloride, while boron gives an abundant cluster for BF_4^- . In general, the complexes are singly charged formed by association of the metal ions with the anions present in the solution or by loss of one or more ligands from species previously present in solution. In some cases, this tendency surpasses the maintenance of the oxidation state of the metal in liquid phase. The interconversion of low and high oxidation states of copper and iron ions depends on the solvent and other species from the solution, but in the gas phase the high oxidation state species can be reduced by collision induced dissociation at low sampling cone voltages. Surprisingly, ferricyanide and ferrocyanide anions render almost the same spectrum. The results suggest that $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ lose one electron to a leaving solvent molecule to form $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in the final steps of desolvation. These and other results suggest that, for the ligands studied in this work, quantitation and speciation are not easy tasks, but there is the possibility of to perform isotope ratio measurements with the complexes formed with monoisotopic anions. The main advantages in this case would be the shift of the m/z to high mass region, which diminishes the chance of isobaric interference, and the inexistence of hydrides, commonly observed in the positive mode ES/MS spectra of metal ions and that cause isobaric interference.

The use of electrospray mass spectrometry (ES-MS) of tetrafluoroborate solutions was proposed for the determination of the boron isotopic ratio ($^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$). When a mixture of methanol and water is used as the solvent and neutral to alkaline medium

is kept, spectra obtained at mild electrospray conditions show free-of-interference peaks with base-line resolution in the region of m/z 86 and 87, which corresponds to $^{10}\text{BF}_4^-$ and $^{11}\text{BF}_4^-$. The study was carried out on a quadrupolar mass spectrometer Platform II (Micromass, UK). To minimize the memory effect in the ion source, the original pepper pot counter electrode was substituted by a cross-flow counter electrode. This geometry reduces the memory effect, but a cleaning process based on mannitol injection assures a suitable background level. Another procedure to eliminate the memory effect could be the hydrolyze of BF_4^- ion using a sulfuric acid spray.

Occasional corona discharge corrupts the numerical results, thus median and median of absolute deviations were used as central tendency and dispersion estimators, respectively, because spikes and outliers do not affect them. The influence of the source and detector voltages and the gas flows over the isotopic ratio was investigated. No systematic effect was observed, but there are mass discrimination and drift that were corrected by successive injection of solution of boric acid NIST 951 converted to sodium tetrafluoroborate. Common ions such as K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Br^- and Cl^- do not cause significant isobaric interference and isotopic fractionation. The isotopic ratio precision obtained for 5-min injection of 100- $\mu\text{mol/L}$ boron solution at 10- $\mu\text{L/min}$ was typically 0.4‰, which is comparable to those from induced coupled plasma (ICP-MS) and thermal ionization mass spectrometry (TIMS). Besides, through of isotope dilution it is possible quantitative analysis of boron.

Electrospray needs a minimal concentration of analyte, above of 10^{-6} mol/L, to obtain a detectable peak and it do not suffer suppression of other electrolytes presents in solution. Therefore, an important step in the analyses of real samples is the pre-concentration and elimination of cationic interference. Procedures of dissolution and digestion to soil, washing powder and plants were proposed. Besides, two certified samples of plants from National Institute of Standards and Technology were evaluated- peach leaves and apple leaves. The results obtained were excellent, showing that the procedure developing can be an alternative method to boron analyses.

Resumo	i
Abstract	iv
Índice	vii
Símbolos e Abreviações	v
 Capítulo 1. Introdução e Objetivos	 1
1.1 Isótopos	2
1.1.1 Efeito isotópico	3
1.1.2 Processos levando ao fracionamento isotópico	3
1.1.2.1 Troca de isótopos	4
1.1.2.2 Processos de evaporação – condensação	4
1.1.2.3 Efeitos Cinéticos	5
1.1.3 Espectrometria de massas e a razão isotópica	6
1.1.4 Parâmetros instrumentais afetando a exatidão da medida isotópica.	10
1.1.4.1 Efeito carga-espaco	12
1.2 Importância do estudo da razão isotópica do boro	13
1.2.2 Determinação isotópica do boro por espectrometria de massas	14
1.3 Electrospray	16
1.3.1 Aspectos Fundamentais da ionização por electrospray	16
1.3.2 O processo de ionização	17
1.3.3 O electrospray como uma célula eletroquímica	18
1.3.4 Dessolvatação das gotas	19
1.3.5 Formação do íon na fase gasosa	21
1.3.6 Dissociação induzida por colisão	21
1.3.7 Intensidade do pico versus concentração	23
1.3.8 Descarga Corona	24
1.3.9 Mudanças no interior da gota devido a sua dessolvatação	24

1.3.10 Aplicações	25
1.4 Objetivos	29
 Capítulo 2. Aplicabilidade analítica de metais de transição e boro em ES-MS	 30
2.1 Parte Experimental	31
2.1.1 Fonte Electrospray	31
2.1.2 Parâmetros do espectrômetro de massas	33
2.1.3 Reagentes	33
2.2 Resultados e Discussões	34
2.2.1 Avaliação do sistema de injeção por gravidade	34
2.2.2 Redução eletroquímica no capilar	36
2.2.3 Estudos no modo íons positivos e negativos	36
2.2.4 Estudos no modo íons negativos	43
2.2.4.1 Intensidade do pico versus concentração	45
2.2.4.2. Complexos com iodeto	48
2.2.4.2.1 Mudanças no estado de oxidação	52
2.2.5 Complexos com cianeto	56
2.2.6 Complexos com fluoreto	59
2.2.7 Complexos com cloreto	60
2.2.8 Conclusões	61
 Capítulo 3. Medidas Isotópicas	 64
3.1 Parte Experimental	64
3.1.1 Parâmetros Instrumentais do espectrômetro de massas	64
3.1.2 Reagentes	64
3.2 Resultados e Discussões	65
3.2.1 Estabilidade da razão medida	65
3.2.2 Tratamento de dados e aquisição	68
3.3.3 Padrão interno – zinco e cobre	69

3.4 Conclusões	71
Capítulo 4. Medidas Isotópicas para Boro por ES-MS	73
4.1 Parte Experimental	74
4.1.1 Sistema de injeção e sonda da fonte de electrospray	74
4.1.2 Reagentes	75
4.2 Resultados e Discussões	76
4.2.1 Efeito de memória	77
4.2.2 Parâmetros Instrumentais e razão isotópica	80
4.2.3 Correção da discriminação de massas	82
4.2.4 Íons interferentes	86
4.2.5 Diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas	87
4.2.6 Estabilidade do íon tetrafluoroborato	89
4.2.7 Efeito de Memória e a hidrólise do íon BF_4^-	92
4.2.8 Formação do tetrafluoroborato	95
4.3 Conclusões	97
Capítulo 5. Aplicações de Método Desenvolvido para $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$	98
5.1 Parte Experimental	99
5.1.1 Instrumentação e Reagentes	99
5.1.2 Colunas de troca iônica	99
5.1.3 Amostras	100
5.2 Resultados e Discussões	100
5.2.1 Estudo da formação do complexo do manitol com o íon borato e tetrafluoroborato	100
5.2.2 Comparação de resultados interlaboratoriais	105
5.2.3 Pré-concentração do boro usando a resina Ambelite IRA-743	107
5.2.4 Competição entre a resina e o manitol pelo íon borato	109
5.2.5 Amostra de solo	110
5.2.5.1 Abertura das amostras de solo	111

5.2.5.2 Quantificação e medida da razão isotópica	112
5.2.6 Amostras de plantas	112
5.2.6.1 O procedimento de abertura das amostras de plantas	113
5.2.6.2 Quantificação e medida da razão isotópica	114
5.2.7 Amostras de sabão	116
5.2.7.1 O procedimento de abertura das amostras de sabão	117
5.2.7.2 Quantificação e medida da razão isotópica do boro	117
5.3 Conclusões	118
 Capítulo 6. Conclusões Gerais e Perspectivas	 121
Bibliografia	125

Anexos

Glossário

σ	desvio padrão
α	fator de fracionamento
A/D	analógico/digital
AAS	espectroscopia de absorção atômica
AC	corrente alternada
CID	dissociação induzida por colisão
CRM	modelo da carga residual
DC	corrente contínua
e^-	elétron
ES-MS	espectrometria de massas com ionização por electrospray
F_{DM}	fator de discriminação de massas
GC-IRMS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas aplicada a medidas de razão isotópica
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
ICP-OES	espectroscopia de emissão atômica com fonte de plasma indutivo.
ICP-MS	espectrometria de massas com ionização por plasma acoplado indutivamente
IDMS	espectrometria de massas com diluição isotópica
IEM	modelo da evaporação do íon
IRMS	espectrometria de massas aplicada a medida de razão isotópica
m/z	massa/carga
M+nH	íon formado pelo ganho de um ou mais átomos de hidrogênio
MAD	mediana dos desvios absolutos
M-nH	íon formado pela perda de um ou mais átomos de hidrogênio

MS-MS	espectrometria de massas seqüencial
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
NTIMS	espectrometria de massas com ionização térmica no modo íons negativos
PI	padrão isotópico
PTIMS	espectrometria de massas com ionização térmica no modo íons positivos
R	razão entre dois isótopos
rf	rádio-frequência
sa	solvente aprótico
sp	solvente prótico
<i>outliers</i>	interferência em um conjunto de dados que se caracteriza por apresentar um valor bastante distinto da tendência central do conjunto de dados e por ser um evento raro
TIMS	espectrometria de massas com ionização térmica
u	unidade de massa atômica
d.i.	diâmetro interno
d.e.	diâmetro externo

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

A intenção deste capítulo é fornecer subsídios para a leitura desta tese. São abordados conceitos básicos sobre isótopos, a técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ES-MS) e o elemento boro. São apresentados o uso analítico das medidas isotópicas e a significância da sua determinação, a importância do estudo do boro e a técnica de electrospray como uma nova ferramenta analítica, ainda pouco explorada. Por fim, serão apresentados os objetivos desta tese.

1.1 Isótopos

Desde 1930 sabe-se que a maior parte dos elementos consiste de uma mistura de isótopos. Estes podem ser divididos em dois grupos fundamentais: espécies estáveis e instáveis ou radioativos. Até hoje foram descobertos 300 nuclídeos estáveis e mais de 1200 instáveis [1].

Ao contrário do que se pode imaginar, as abundâncias naturais dos isótopos para qualquer elemento não é constante. Existe uma considerável variação nas abundâncias isotópicas devido a uma variedade de processos de fracionamento isotópico, isto é, processos que fazem com que haja diferentes quantidades de cada isótopo em um determinado ambiente ou corpo. É justamente esta variação que torna a investigação das razões dos isótopos tão importante para estudos geoquímicos, biológicos e arqueológicos, na detecção de adulteração de alimentos e bebidas, contaminação antropogênica ou antrópica do meio ambiente, entre outros. O fluxograma na Figura 1.1 mostra os vários campos em que a análise isotópica pode ser utilizada na química analítica [2].

1.1.1 Efeito isotópico

A diferença no comportamento físico e químico dos isótopos é chamada de efeito isotópico. Um elemento tem suas características químicas controladas essencialmente pela sua estrutura eletrônica. Já o núcleo é basicamente responsável pelas suas propriedades físicas. Como os isótopos de um mesmo elemento têm suas estruturas eletrônicas iguais, eles apresentam uma grande similaridade no comportamento químico. Mas isto não é absoluto, certas diferenças existem nas propriedades físico-químicas devido à diferença de massas dos isótopos. A substituição de qualquer átomo na molécula por um dos seus isótopos produz uma pequena perturbação no comportamento químico [1].

Fracionamento isotópico pode ocorrer durante uma variedade de processos físico-químicos, tais como mudanças de fase, reações químicas, e difusão molecular. Um exemplo é o processo de denitrificação do solo por bactérias. A razão isotópica do N_2 gerado pelas bactérias é diferente da razão isotópica dos compostos nitrogenados do qual aquele foi gerado. Isto porque é mais fácil romper as ligações com ^{14}N do que com ^{15}N [3]. Por que os isótopos mais leves têm suas ligações mais facilmente rompidas pode ser explicada através da mecânica quântica.

De acordo com a mecânica quântica, a energia de uma molécula é restrita a certo níveis discretos de energia e o menor nível, não é o mínimo de energia que se pode observar nas curvas de potencial de energia e sim uma quantidade $1/2h\nu$ acima, onde h é a constante de Planck e ν é frequência com que os átomos da molécula vibram um em relação aos outros. Considerando que a ligação C-H tem uma vibração de estiramento de $\nu=(1/2h\nu)(k/\mu)^{1/2}$, sendo que $\mu=m_1m_2/(m_1+m_2)$, onde m_1 é a massa do H e m_2 é a massa do resto da molécula. Quando substituímos o H por D ($m_1=m_D=2m_H$) a frequência de estiramento diminuirá, $\nu_{CD}=\nu_{CH}/(2)^{1/2}$, aumentando a energia potencial necessária para romper a ligação C-D. Isto significa que ligações formadas por isótopos leves são mais fracas do que as ligações envolvendo isótopos pesados. Assim, em geral, moléculas contendo o isótopo mais leve podem acabar reagindo mais facilmente do que aquelas contendo os isótopos pesados [1,4].

1.1.2 Processos levando ao fracionamento isotópico

Os principais fenômenos produzindo fracionamento isotópico são reações de troca de isótopos e processos cinéticos.

1.1.2.1 Troca de isótopos

Troca de isótopos (*isotopes exchange*) inclui diferentes processos físico-químicos. O termo pode ser usado para situações onde a distribuição dos isótopos muda entre diferentes substâncias químicas, diferentes fases ou diferentes moléculas.

1.1.2.2 Processos de evaporação – condensação

A molécula de água contendo o isótopo mais leve H_2^{16}O sofre evaporação mais facilmente do que H_2^{18}O . Assim o vapor da água estará relativamente enriquecido no isótopo leve do oxigênio. A extensão deste fracionamento dependerá da temperatura. Os fatores de fracionamento para sistemas simples podem ser calculados de princípios teóricos como destilação fracionada ou condensação em condições de equilíbrio. Através da equação de Rayleigh (equação 1.1) é possível calcular o fator de fracionamento para as diferentes fases formadas: condensado, vapor e líquido residual. Na equação 1.1, R_{n0} é a razão dos isótopos do oxigênio nas fase condensada, vapor ou líquida no início do processo e R_n a razão dos isótopos do oxigênio na mesma fase em algum momento do processo, f é a fração do líquido, vapor ou condensado residual, e α é o fator de fracionamento [1].

$$\frac{R_n}{R_{n0}} = \alpha \cdot f^{\alpha-1} \quad (1.1)$$

Em estudos de geoquímica dos isótopos é muito comum expressar a composição isotópica em termos de delta (equação 1.2). O valor de delta relaciona a medida da razão isotópica de uma amostra com a medida da razão isotópica de um padrão certificado. O delta é definido como:

$$\delta \text{‰} = \left[\frac{R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}}{R_{\text{padrão}}} \right] \cdot 1000 \quad (1.2)$$

O valor de delta permite avaliar as variações nas abundâncias isotópicas ocorrendo na natureza e se há algum processo de discriminação de massas de alguns dos isótopos.

Existem alguns padrões que são aceitos internacionalmente, como água do oceano (SMWO) para o H e um peixe fossilizado (*Belemnitella americana*) para o C. Embora para a maioria dos elementos não haja padrões certificados, há um conjunto de materiais enriquecidos e certificados que pode auxiliar nas análises, como padrões fornecidos pelo *National Institute of Standard and Technology* (NIST).

Um exemplo natural do processo de fracionamento devido à evaporação e o uso da notação delta é o fracionamento dos isótopos do oxigênio no vapor de água de uma nuvem e as gotas da chuva liberadas da nuvem. No processo de condensação há um enriquecimento do ^{18}O em temperaturas mais baixas, a 20°C o valor de $\delta^{18}\text{O}$ é 9‰ e a 0°C $\delta^{18}\text{O}$ é 11‰ [5].

1.1.2.3 Efeitos Cinéticos

O fracionamento isotópico devido ao efeito cinético está associado com alguns processos que não são completos, como evaporação, reações de dissociação, reações mediadas biologicamente, difusão e adsorção em resinas ou materiais geológicos.

O processo de difusão pode causar significativo fracionamento isotópico. Em geral os isótopos leves apresentam maior mobilidade e assim sendo são mais afetados pela difusão do que os isótopos pesados. Para gases, a razão dos coeficientes de difusão é equivalente a raiz quadrada de suas massas [1]. No caso dos isótopos do carbono na molécula de CO_2 , com as massas $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ e $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ com pesos moleculares 44 e 45, respectivamente, resolvendo a equação de energia cinética ($1/2mv^2$) para ambas espécies, a razão das velocidades é equivalente à razão das massas 45/44, ou seja, 1,01. Este valor mostra que, sem considerar a temperatura e no mesmo sistema, a velocidade média da molécula $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ é em torno de 1% maior do que da molécula $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$. Este efeito isotópico é facilmente calculado para gases ideais, onde colisões entre moléculas e forças intermoleculares são desprezíveis. No caso de gases reais estes fatores devem ser levados em consideração. Para líquidos e sólidos as relações são bem mais complicadas.

O fracionamento isotópico devido a efeitos cinéticos e termodinâmicos tende a diminuir com o aumento da temperatura. Em altas temperaturas, a energia vibracional de uma molécula aumenta a um nível que as diferenças devido aos isótopos é insignificante [1].

Normalmente, o termo fracionamento isotópico é usado para definir o enriquecimento isotópico devido a processos físicos ou químicos, sejam estes processos naturais ou não. Quando o fracionamento isotópico ocorre no interior do espectrômetro de massas é chamado de discriminação instrumental de massas.

Um exemplo é a discriminação provocada na ionização por elétrons do diclorometano. A energia de ionização média do diclorometano é 9,8 eV. Quando este é ionizado em condições muito próximas a sua energia de ionização, a razão entre $\text{CH}_2^{35}\text{Cl}^+/\text{CH}_2^{37}\text{Cl}^+$ nesta faixa de energia não é constante, e ocorre um enriquecimento da espécie com o cloro 35. Conforme a energia da fonte aumenta, as diferenças devido aos isótopos tornam-se insignificantes sendo os dois igualmente ionizados [6]. Existe uma série de artefatos para corrigir e eliminar problemas de discriminação de massas e avaliar o fracionamento isotópico da amostra. Estes serão discutidos mais adiante.

O grau com que um isótopo é segregado em relação a outro é geralmente expresso pelo fator de fracionamento (α), que é definido pela equação 1.3 como a razão do produto sobre a razão do reagente.

$$\alpha = \frac{R_{\text{produto}}}{R_{\text{reagentes}}} \quad (1.3)$$

1.1.3 Espectrometria de massas e a razão isotópica

O advento da espectrometria de massas está intimamente relacionado com a descoberta do isótopo. Os grandes avanços e aprimoramentos nos últimos anos tornaram a técnica umas das mais versáteis para análise elementar e determinação do padrão isotópico.

As mais variadas fontes de íons podem ser utilizadas para medidas isotópicas. O fator limitante para a escolha do modo de ionização é o tipo de amostra. A ionização por elétrons (IR-MS, isotopic ratio mass spectrometry) e a ionização térmica (TIMS) são os dois métodos de ionização mais freqüentemente utilizados. A ionização por elétrons é

muito eficiente na ionização de materiais na fase gasosa, já TIMS é capaz de ionizar quase todos os metais no modo íons positivos e alguns óxidos metálicos e não metais no modo íons negativos. A espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, ICP-MS, vem ganhando razoável reconhecimento nos últimos anos como técnica para medidas isotópicas, abrangendo quase toda a tabela periódica. Várias outras técnicas, como ionização com fonte de centelha (*spark*), ionização por descarga de calor (*glow*) e ionização secundária (SIMS) também são utilizadas para medidas isotópicas.

Devido ao enorme sucesso da espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa nos mais diferentes tipos de análise de amostras voláteis, e a grande estabilidade fornecida pela fonte de ionização por elétrons para formar os íons na fase gasosa houve um grande avanço na utilização da técnica de GC-MS para medidas precisas de razão isotópica [7, 8]. A principal aplicação desta técnica está na análise de compostos voláteis de amostras naturais monitorando as razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$.

Na medicina, isótopos estáveis vêm sendo muito utilizados em estudos como traçadores, principalmente na pediatria onde é desaconselhável o uso de radioisótopos ou métodos intrusivos. Um exemplo de aplicação é o teste do ^{13}C -uréia para a detecção da bactéria *helicobacter pylori* em neonatais. Quando esta bactéria está presente, ocorre a ação da urease que provoca a quebra da molécula ^{13}C -uréia gerando $^{13}\text{CO}_2$ que é exalado na respiração. A razão isotópica $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ pode ser analisada por GC-MS diretamente [5].

Em alguns casos é necessário separar os diferentes tipos de compostos usando o cromatógrafo e transformar a amostra em gases simples como: CO_2 , N_2 , H_2 , O_2 , SO_2 , N_2O , e SF_6 . Para este tipo de estudo, foram desenvolvidos equipamentos onde a combustão da amostra é feita *on-line* após a separação cromatográfica. Esse tipo de equipamento começou a ser comercializado no início da década de 90 e ficou conhecido como espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa para medidas de razão isotópica (GC-IRMS). Um bom exemplo da aplicação de medidas de razão isotópica usando GC-IRMS é o estudo de doping em atletas. Um dos exames que é feito é o de nível de testosterona. A testosterona que é produzida no corpo humano apresenta um padrão isotópico bastante distinto da testosterona sintetizada. Esta apresenta uma diferença no valor da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de -2 ‰ [7]. Neste caso como estamos interessados em medir a razão isotópica do carbono não é possível injetar a testosterona diretamente por GC-MS. É

necessário após a separação no cromatógrafo provocar a sua combustão gerando CO_2 . Existe uma série de modelos e diferentes tipos de reatores com diferentes catalisadores para a combustão dos compostos orgânicos gerando gases simples. Na maior parte dos equipamentos do tipo GC-IRMS o detector é um arranjo de múltiplos “copos” de Faraday alinhados de forma que todos os isótopos ou isotopômeros estudados alcancem o detector simultaneamente [7, 8].

TIMS e ICP-MS são usadas principalmente para análise de compostos organometálicos e não voláteis em geral. No entanto, nas últimas duas décadas, medidas de razões isotópicas têm sido preferencialmente resolvidas por TIMS. Estes instrumentos são equipados com detectores múltiplos, como no caso do GC-IRMS, permitindo uma alta exatidão nas medidas e precisão da ordem de 0,005 % usando períodos de aquisição de até 24hs [9]. No entanto, TIMS apresenta algumas desvantagens. Para alcançar a alta precisão nas medidas é necessário um longo tempo de aquisição de 2 a 24 h. Se a amostra tiver mais do que um composto tendo diferentes pressões de vapor e energias de ionização, a espécie mais volátil e com menor energia de ionização será formada preferencialmente e muitas vezes pode suprimir uma produção suficiente e estável do íon de interesse. Por isto a amostra deve estar suficientemente pura para ser depositada sobre o filamento, o que normalmente requer longos e trabalhosos períodos de abertura e preparação da amostra para análise.

A técnica de ICP-MS vem crescendo em importância na última década para medidas isotópicas. As vantagens do ICP-MS são: a rapidez de preparo da amostra, tempos de aquisição curtos de 1 a 5 min e análise de compostos com alta energia de ionização como Re e Os. Um instrumento quadrupolar com ionização por plasma induzido consegue medir razões isotópicas com precisão de 0,1 a 1,0 %. Equipamentos de ICP-MS com setor magnético alcança limites de precisão semelhantes ao do TIMS. Entretanto, ICP-MS apresenta desvantagens em relação a TIMS. Como ICP-MS trabalha com íons essencialmente monoatômicos, muitas vezes quando há interferência isobárica é muito difícil conseguir eliminá-la [9, 10]. Um exemplo é o caso do $^{77}\text{Se}^+$ que sofre interferência do $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ e o $^{56}\text{Fe}^+$ que sofre interferência do $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$. Outro problema é que, por trabalhar com íons monoatômicos, a relação m/z é, em geral, baixa, aumentando as chances de discriminação de massas na fonte pelo efeito carga-espaco.

O mérito de uma medição, por exemplo para datação, é conseguir medir as variações isotópicas naturais com a maior exatidão e precisão possíveis. No entanto, pode ocorrer fracionamento isotópico durante o tratamento da amostra e discriminação de massas no equipamento, o que levaria a análises a resultados errôneos. Uma das formas de eliminar este problema é utilizar os padrões certificados. Qualquer variação no valor desta razão pode ser utilizada para gerar um fator de correção para corrigir as medidas das amostras em estudo. Uma outra forma de tentar eliminar variações devido à discriminação de massas é utilizar um padrão interno ou externo, fazendo as medições ao mesmo tempo.

Padronização duplo *spike* refere-se quando o próprio elemento pode ser utilizado nas medidas. Por exemplo, o neodímio, que é aceito como estável, tem um valor de referência para $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ de 0,7219. A comparação deste valor com o valor medido para $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ gera um fator de correção, que é utilizado para corrigir todas as razões medidas: $^{142}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{145}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{148}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ e $^{150}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$. A padronização interna só é possível ser utilizada quando pelo menos dois isótopos são estáveis, isto é, não são originados por decaimento radioativo. Por exemplo, chumbo tem três isótopos (^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{208}Pb) que são produtos de decaimento radioativos e assim sendo apresentam uma variação da sua abundância na natureza. No entanto, é possível usar um elemento que apresente isótopos estáveis e tenha massa próxima à do elemento sendo estudado. Um exemplo é o uso do tálio como padrão interno para mercúrio ou chumbo. Como estes apresentam massas muito próximas, qualquer variação no equipamento terá a mesma influência para o tálio, chumbo e mercúrio. O fator de correção F_{DM} calculado para o tálio pode ser utilizado para corrigir as razões do chumbo e do mercúrio.

Na literatura existem três procedimentos que podem ser aplicados para o cálculo do fator de discriminação de massas F_{DM} . O método linear (equação 1.4), o método potencial (equação 1.5) e o método exponencial (equação 1.6). Nenhum destes métodos tem fundamento teórico e não há como prever qual deles fornecerá o melhor ajuste para descrever os dados experimentais. Assim, alguns autores preferem denominá-las como equações de fracionamento a leis de fracionamento [9-13].

$$\frac{R_{\text{verdadeiro}}}{R_{\text{medido}}} = 1 + \Delta m \cdot F_{DM} \quad (1.4)$$

$$\frac{R_{\text{verdadeiro}}}{R_{\text{medido}}} = (1 + F_{DM})^{\Delta m} \quad (1.5)$$

$$\frac{R_{\text{verdadeiro}}}{R_{\text{medido}}} = \exp(\Delta m \cdot F_{DM}) \quad (1.6)$$

onde Δm é a diferença de massas entre os isótopos utilizados. O F_{DM} determinado é multiplicado pela razão medida da amostra para a correção.

1.1.4 Parâmetros instrumentais afetando a exatidão da medida isotópica

Existem vários parâmetros instrumentais que levam à discriminação de massas nos espectrômetros de massa: a fonte de ionização, o sistema óptico de íons, o analisador de massas, o detector e a não linearidade nos circuitos de medidas são alguns deles.

Na ionização por elétrons, quando a ionização ocorre à baixa energia de ionização, pode ocorrer discriminação devido a diferenças nas energias necessárias para retirar um elétron do isótopo pesado em relação ao leve. Na ionização por TIMS uma pequena quantidade de amostra é depositada sobre um filamento de rênio ou tungstênio. A este, é aplicada uma alta tensão que gera temperaturas altas (500 a 2500 K) e ioniza a amostra sobre o filamento. O principal problema de TIMS é o fracionamento dependente do tempo. Durante o início da evaporação, partículas de massa mais leve são preferencialmente evaporadas no filamento e conforme a evaporação procede as partículas com o isótopo mais pesado são evaporadas (destilação de Rayleigh) [9].

Para medidas isotópicas, o analisador com setor magnético sozinho ou em conjunto com o eletrostático são amplamente difundidos devido a sua alta estabilidade, não provocando discriminação de massas. O uso do analisador do tipo quadrupolar para medidas isotópicas se difundiu juntamente com o uso da técnica de ICP-MS. Este tipo de analisador provoca discriminação de massas devido a instabilidade das amplitudes utilizadas para fazer a separação de massas.

A razão isotópica é sempre constante num tempo específico, mesmo que as correntes registradas relativas a cada isótopo não sejam. No entanto, se a corrente de dois isótopos sofre algum desvio e não é medida ao mesmo tempo, a razão das correntes poderá apresentar desvios. Para eliminar este problema, existem duas alternativas: ou utilizar

métodos matemáticos para eliminar *spikes* nas correntes medidas, ou utilizar detectores do tipo *Faraday cup*, sendo um copo para cada isótopo medido. Porém, este tipo de detector não pode ser utilizado diretamente com equipamentos quadrupolares. Diferentemente dos espectrômetros de massas com setor magnético que separa espacialmente os íons com diferentes razões massa/carga, o quadrupolo separa íons de uma determinada razão massa/carga de forma similar a filtros de passa-faixa alta e baixa.

No espectrômetro de massas com setor magnético quando um campo magnético é aplicado sob uma partícula carregada, esta sofrerá a ação deste campo e dependendo da sua relação massa/carga a trajetória terá um raio de curvatura, equação 1.7.

$$\frac{m}{z} = \frac{r^2 \cdot B^2}{2 \cdot V} \quad (1.7)$$

onde m = massa, z = carga, r = raio de curvatura da trajetória, B = campo magnético e V = velocidade da partícula. Desta forma, é possível separar os íons em diferentes raios de curvatura focalizando-os numa trajetória determinada para alcançar ao mesmo tempo os copos de Faraday. No caso dos analisadores quadrupolares a separação de massas ocorre devido à filtragem das espécies carregadas sobre o efeito de campos ac e dc aplicados alternadamente em quatro barras metálicas (Figura 1.2). Observando a Figura 1.2, quando o potencial ac aplicado na barra, no plano x-z, é positivo os íons positivos são focados para o centro da trajetória (flecha vermelha) e quando o potencial é negativo estes são defocados (flecha azul). Quando juntamos ao potencial ac um potencial dc positivo neste plano os íons grandes tenderão a sentir muito mais o potencial dc do que o potencial ac. Isto porque se a frequência do potencial ac é alta os íons pesados não terão "tempo" para serem influenciados, somente os íons mais leves serão influenciados por este potencial. No eixo y-z ocorre o mesmo, só que agora o potencial dc é negativo, novamente os íons pesados serão influenciados pela média do potencial aplicado. Desta forma eles serão defocados do eixo central e íons leves poderão ser centrados pelo potencial ac [15]. Assim sendo, os íons de uma determinada faixa de massa alcançam o detector.

Os detectores de contagem de íons, muito utilizados nos sistemas de ICP-MS quadrupolar têm problemas em relação ao tempo morto. Cada íon chegando no detector resulta em um pulso de saída que tem um tempo médio de 25 ns. Durante este período depois da chegada de um íon, o detector não consegue detectar a chegada de um segundo íon. Este fenômeno para isótopos com abundâncias muito distintas pode provocar uma discriminação de massas considerável. Os detectores do tipo multiplicadores de elétrons secundários geram discriminação por que o ganho destes sistemas é dependente da velocidade. Assim, íons mais leves em um feixe de igual energia cinética acabam tendo uma velocidade um pouco maior, podendo gerar mais elétrons secundários do que os íons mais pesados [9,11].

1.1.4.1 Efeito carga-espaco

O efeito carga-espaco parece ser uma das principais fontes de discriminação de massas nos espectrômetros de massas. A Figura 1.3 mostra uma representação esquemática

do processo. Os feixes de íons e elétrons saem da fonte e seguem em direção as lentes do *skimmer* (1) *skimmer* (2) e lentes focalizadoras (3). Devido ao gradiente decrescente do potencial positivo aplicado, nesta rota, os íons positivos tendem a avançar mais rapidamente do que os elétrons. Assim, os elétrons são separados dos íons positivos, provocando a formação de uma região com excesso de íons positivos. O que produz um efeito de repulsão entre as espécies. Os íons mais leves tenderão a sofrer maior influência das forças de repulsão e serão mais facilmente defletidos de que os íons pesados. Este efeito também é válido para isótopos leves e pesados [10].

1.2 Importância do estudo da razão isotópica do boro

Nos últimos anos tem sido crescente o interesse na análise de boro e sua razão isotópica. Medidas isotópicas do boro tem grande importância: (1) em materiais minerais para o entendimento de vários fenômenos geológicos, (2) em materiais biológicos pois nas plantas o boro é um elemento essencial para o crescimento. Nos animais o seu efeito ainda não é completamente conhecido, mas existem suficientes evidências de que o boro tem uma função na nutrição humana e animal [15,16]. Boro em excesso é tóxico tanto para plantas

como para animais e tende a ser acumulado nos tecidos. Além disso, boro é utilizado na Terapia de Captura de Nêutrons (BNCT) para tratamento de células cancerosas [16]. Por isso a importância de se desenvolver métodos analíticos precisos.

O boro tem dois isótopos estáveis ^{10}B e ^{11}B , com uma proporção natural $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ em torno de 0,2473. A grande diferença de massa relativa entre os dois isótopos e sua mobilidade geoquímica produz uma variação expressiva da razão entre os dois isótopos. Por exemplo, a proporção entre ($^{10}\text{B}:^{11}\text{B}$) em rochas e minerais varia de 0,2631 a 0,2380 dependendo da fonte e da natureza do material [16]. Em amostras naturais os valores de $\delta^{11}\text{B}$ variam de -30 ‰ até 60 ‰. Esses valores são normalizados em relação ao material de referência NIST SRM 951 (ácido bórico) [10, 17, 18].

Nos sistemas aquáticos as duas espécies dominantes do boro são $\text{B}(\text{OH})_3$ e $\text{B}(\text{OH})_4^-$, que estão em equilíbrio isotópico como mostra a equação 1.8.

A constante de equilíbrio calculada para esta reação foi de 0,981 a 25 °C. Isto significa que ^{10}B está preferencialmente na forma tetraédrica e ^{11}B na forma trigonal. A espécie $\text{B}(\text{OH})_4^-$ é preferencialmente adsorvida pelos minerais, causando um enriquecimento do ^{10}B na fase sólida se boro é incorporado de sistemas aquáticos por troca heterogênea. Além disto em soluções aquosas há dependência do pH no equilíbrio entre $\text{B}(\text{OH})_3$ e $\text{B}(\text{OH})_4^-$ (equação 1.9).

Em $\text{pH} > 11$ e $\text{pH} < 7$ as espécies $\text{B}(\text{OH})_4^-$ e $\text{B}(\text{OH})_3$, respectivamente, predominam. Porém, em pH entre 7 e 11 pode haver fracionamento isotópico. Desta forma, boro pode ser usado como indicador da paleoacidez do meio [19-21].

1.2.2 Determinação isotópica do boro por espectrometria de massas

A determinação isotópica do boro passa por três estágios: extração, purificação e concentração e por último a determinação. Os métodos de extração mais comuns são: a

geração do borato de metila através da adição de metanol e ácido sulfúrico concentrado; pirohidrólise pelo aquecimento da amostra 1400°C e coleta do vapor em solução aquosa; e diluição ácida da amostra com HF ou HCl [15, 16]. A purificação pode ser feita através de destilação ou utilização de resinas de troca aniônicas específicas para boro, que também são utilizadas para pré-concentração do boro. As mais utilizadas são Amberlite IRA 743, Bio-Rad AG 50WX12 e AG 1-X4 [15-18]. Medições precisas de razão isotópica do boro têm sido tradicionalmente conduzidas por espectrometria de massas com ionização térmica (TIMS) tanto no modo negativo (NTIMS) como no positivo (PTIMS) [22-25]. Nos últimos anos ICP-MS vem apontando como uma técnica alternativa a TIMS [17, 26-28].

Durante o processo de extração e análise por ácidos pode haver fracionamento isotópico. Os BF_3 e BCl_3 formados têm baixo ponto de ebulição -101,3 e +12,5 °C, respectivamente, por isso eles escapam facilmente da solução (mesmo a temperatura ambiente) provocando fracionamento isotópico. Ishikawa e colaboradores mostraram que fracionamento isotópico e volatilização do boro podem ser minimizados através da complexação do boro com o manitol [29, 30]. Os processos de destilação do borato de metila apresentam como limitação a baixa recuperação, principalmente em amostras minerais.

O processo por TIMS gera íons negativos ou positivos na fase gasosa a partir do aquecimento de uma amostra sólida. Nakamura e colaboradores desenvolveram um método para análise isotópica do boro por PTIMS [22]. Primeiramente a parte superior de um filamento de Tântalo é impregnada com grafite depois uma quantidade da amostra extraída com igual proporção de manitol e cério (Cs_2CO_3) é colocada sobre o filamento. Este então é aquecido passando uma corrente de 1,2 A durante 5 minutos. O boro é medido na forma de Cs_2BO_2^+ (m/z 308 e 309) e, devido a massa alta, não há problema de fracionamento isotópico. A composição isotópica é apresentada como um desvio em relação a um padrão certificado, NIST SRM 951 ou SRM 952, de ácido bórico.

ICP-MS para medidas isotópicas apresenta algumas vantagens em relação a TIMS: o preparo e a introdução da amostra são bem mais simples, as análises são mais rápidas e podem ser feitas em fluxo contínuo. Além disto, ICP-MS é uma técnica que tende preferencialmente a produzir íons monoatômicos, o que reduz a probabilidade de ocorrer interferência isobárica. No entanto, quando tais interferências ocorrem dificilmente podem

ser evitadas. No caso específico para o boro ocorre a interferência devido ao carbono (^{12}C) residual de matrizes orgânicas e ao argônio ($^{40}\text{Ar}^{4+}$) [4, 5]. Por exemplo, a cauda do pico do ^{12}C pode aumentar a intensidade do pico do ^{11}B [28]. Uma outra desvantagem em relação a TIMS é a precisão da medida significativamente inferior. Gregoire registrou uma precisão de 7 ‰ para medida isotópica do boro [17] a obtida por TIMS [22-25] fica em torno de 0,1 a 0,9 ‰.

1.3 Electrospray

1.3.1 Aspectos Fundamentais da ionização por electrospray

Um levantamento na literatura nas duas últimas décadas mostra que, de 1980 a 2000, o número de artigos publicados usando electrospray passou de 100 a 7800, sendo que aproximadamente 80 % destes estão relacionados com análise de biomoléculas e compostos orgânicos, 10 % são relativos à instrumentação e estudos sobre os processos fundamentais e 10 % das publicações estão associadas às espécies organometálicas e inorgânicas nas mais diferentes formas.

Embora o electrospray seja normalmente referido como uma fonte de íons, na realidade o electrospray não tende a ionizar e sim transferir os íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. É fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons da solução para a fase gasosa para análise por espectrometria de massas em tão pouco tempo, aproximadamente 20 anos, teve um impulso tão grande: é que a maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorre em solução.

O electrospray foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas por Dole em 1968. No entanto, seus experimentos não foram convincentes pois estes visavam a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não estão ionizados em solução [31]. Foi somente em 1984 que Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de electrospray como um método de ionização branda [32]. Métodos de ionização anteriores ao electrospray, no qual íons são transferidos da fase líquida para a fase gasosa, tal como bombardeamento de íons rápido (FAB) ou dessorção por plasma, provocam não só a dessolvatação dos íons, mas, muitas vezes, sua fragmentação e formação de íons a partir de moléculas neutras. Isto se deve ao fato de que nestas técnicas uma grande quantidade de energia é fornecida de forma focalizada e em um

curto período de tempo. A principal vantagem do electrospray sobre estas outras técnicas é que a dessolvatação ocorre gradualmente por energia térmica em temperaturas relativamente baixas (30 a 80 °C), de forma a não gerar fragmentos nem moléculas ionizadas. Assim, muitos dos íons gerados na fase gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução, o que é perfeito para análise de espécies não voláteis e para estudos de especiação. No entanto, isto não ocorre para todas as espécies. Muitas vezes uma espécie com carga +3 em solução está estabilizada devido à camada de solvatação. Conforme a espécie é dessolvatada ela tende a sofrer redução da carga. Além disto, espécies neutras podem ser ionizadas por processos eletrolíticos e por dissociação induzida por colisão. A preservação ou não das informações dos íons em solução na fase gasosa está intimamente ligada ao processo de ionização por electrospray [31].

1.3.2 O processo de ionização

A ionização por electrospray envolve a formação de um spray eletrostático de uma solução que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de electrospray é bastante simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas [31]. É necessária uma fonte de alta tensão (1000 a 7000 V) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou menores. No caso de fluxos menores que 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ o electrospray é chamado de nanoelectrospray.

A Figura 1.4 mostra uma representação esquemática da fonte de electrospray de um equipamento da Micromass Platform II. Toda região da fonte está a pressão atmosférica. Quando um potencial positivo, por exemplo, é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Este tipo de separação de carga é chamado de processo eletroforético. Conforme a densidade de carga aumenta na gota o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletródo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha a forma de um cone que é denominado de cone de Taylor.

Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo então a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução.

1.3.3 O electrospray como uma célula eletroquímica

Como foi relatado acima, o electrospray pode gerar espécies eletroliticamente. Isto porque este pode ser comparado a uma célula eletrolítica de dois eletrodos. O capilar metálico ou um fio metálico em contato com a solução é um dos eletrodos da célula. Em termos de eletroquímica este pode ser considerado o eletrodo de trabalho, por que neste ocorre as principais reações que podem alterar o sistema químico inicial. O segundo eletrodo é o contra-eletródo que normalmente está aterrado ou próximo ao terra. Devido ao potencial aplicado e a proximidade destes dois eletrodos, há um alto campo elétrico nesta região que provoca a formação do cone de Taylor.

O sistema de electrospray funciona como um tipo especial de célula eletrolítica. Especial porque o transporte de íons não ocorre ininterruptamente pela solução, como nas células eletrolíticas convencionais. Parte do transporte dos íons ocorre na fase gasosa. Uma reação de oxidação normal ocorre no eletrodo positivo, isto é, na interface solução/fio

metálico. Esta reação fornece íons positivos à solução, convertendo átomos do metal (M) em íons metálicos positivos e liberando elétrons (equação 1.10). Outra alternativa é remover íons negativos presentes na solução através da oxidação (equação 1.11) ou oxidação do solvente (equação 1.12). A redução das espécies (A) ocorre no contra-eletródo (equação 1.13).

Como nas células eletrolíticas, predominará a reação com menor potencial de oxidação. Isto vai depender do metal presente no eletródo, do material na solução e da natureza do solvente. Prova da ocorrência de oxidação eletroquímica no capilar metálico foi fornecida por Blades e colaboradores [33]. Estes usaram um capilar de sílica com a ponta do capilar recoberta com um depósito de zinco. Quando o potencial foi aplicado, íons Zn^{2+} foram detectados. Resultados similares foram obtidos usando capilares de aço inoxidável, quando íons Fe^{2+} foram detectados.

O processo eletródico pode ter uma influência desprezível no espectro de massas se os íons produzidos, consumidos, ou alterados não são convertidos para a fase gasosa. Por exemplo, no caso da maior parte dos estudos conduzidos por electrospray (biomoléculas como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos), as alterações eletroquímicas são desprezíveis porque normalmente outras espécies comuns no sistema – como eletrólitos, o metal do capilar e o próprio solvente – sofrem muito mais facilmente o processo redox [34-36].

1.3.4 Dessolvatação das gotas

Depois da liberação das gotas com alta densidade de carga do cone de Taylor, estas passam pela região entre a ponta do capilar e o contra eletródo e vão sofrendo dessolvatação. A massa de solvente é reduzida por evaporação. A evaporação do solvente é favorecida pela energia térmica do ambiente (temperaturas na fonte de 30 a 70 °C) e pelo

auxílio de um gás secante, normalmente nitrogênio. Conforme a gota perde solvente, a densidade de carga aumenta até um ponto em que esta vence a tensão superficial e gotículas são liberadas.

A carga máxima Q que uma gota de raio R pode manter antes de se fragmentar é fornecida pela equação 1.14.

$$Q = 8\pi \cdot (\epsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3)^{1/2} \quad (1.14)$$

onde, ϵ_0 é a permissividade no espaço e γ é a tensão superficial da gota. Esta dedução foi proposta por Lord Rayleigh em 1882 e é comumente conhecida como o limite de Rayleigh.

Este processo de dessolvatação vem sendo estudado por vários grupos. Taflin e colaboradores [36] e Tang [37] observaram que as gotas, para sofrerem ruptura, não precisam alcançar o limite de Rayleigh. A ruptura ocorre em torno de 80 % do limite e resulta na expulsão de gotas descendentes com 2 a 3 % da massa e 10 a 18 % da carga da gota ascendente. Assim, as gotas descendentes são bem menores e possuem uma razão massa/carga muito maior. A Figura 1.5 mostra uma representação esquemática do tempo de formação das gotas descendentes. N é o número de cargas elementares na gota, R é o raio

da gota em micrometros e Δt é o valor que corresponde ao tempo necessário para a gota alcançar o tamanho e densidade de carga onde ocorre a ruptura. Normalmente as gotas vibram e estas vibrações estimulam a ruptura da gota. O tempo de evolução e produção dos íons na fase gasosa está em torno de microssegundos, que é bem menor que o tempo que a gota passa na região da fonte.

1.3.5 Formação do íon na fase gasosa

Todo este processo de dessolvatação da gota até atingir o raio de $0,03\mu\text{m}$ já está muito bem entendido. No entanto, ainda não se sabe exatamente como o íon é gerado na fase gasosa. Há dúvidas se o íon é expelido da gota ou se a gota perde todo o solvente restando um único íon. Existem dois diferentes mecanismos que foram propostos para a formação dos íons na fase gasosa. O primeiro depende da formação de gotas carregadas extremamente pequenas, $R \approx 1\text{nm}$, e que contenha somente um íon. A evaporação do solvente da gota converterá esta em um íon na fase gasosa. Esse mecanismo foi proposto por Dole em 1968 e foi denominado de CRM ou modelo da carga residual [38]. O outro mecanismo proposto por Thomson e Iribarne, IEM, [39] modelo da evaporação do íon, sugere que a emissão dos íons ocorre diretamente de gotas muito pequenas e altamente carregadas. Para começar ocorrer este processo a gota precisa ter um raio de 8nm e uma quantidade de carga de aproximadamente 70. Nestas condições a gota não sofre ruptura mas pode emitir íons para fase gasosa. Assim, no mecanismo proposto por Iribarne, a gota não precisa atingir tamanhos tão pequenos como 1nm e podem existir outros solutos.

O IEM foi proposto porque, em espectros de soluções 1mmol/L de NaCl em metanol:água, o único íon detectado foi Na^+ e espécies solvatadas. Íons como $\text{Na}_n(\text{NaCl})^{n+}$, que deveriam ser formados caso o modelo CRM ocorresse, não foram observados em seu experimento. Somente espécies solvatadas, protonadas e íons livres foram detectados. No entanto, os experimentos de Wang e Cole mostraram a existência de íons como Cs^+ e $\text{Cs}(\text{CsCl})^+$ em uma solução 50:50 água:metanol. O mais provável é que ambos mecanismos estejam ocorrendo.

1.3.6 Dissociação induzida por colisão

Depois de formado, o íon alcança a região do cone de amostragem que tem um orifício bem pequeno, $1\mu\text{m}$. A partir daí o sistema passa para a região de baixa pressão. Na

interface pressão atmosférica/vácuo há um sistema de bombas e um conjunto de lentes óptica que conduzem os íons ao analisador de massas (Figura 1.6). O sistema de bombas e óptica varia conforme o produtor do espectrômetro. A região entre o cone de amostragem, *skimmer* e as lentes hexapolos é muito importante pois nesta região pode ocorrer dissociação induzida por colisão (CID). A Figura 6 é uma representação esquemática do processo de CID ocorrendo entre o *skimmer* e as lentes hexapolo antes da entrada no analisador. Nesta região chegam os íons formados no electrospray e o gás secante (nitrogênio). Como há um campo elétrico, os íons serão acelerados provocando a colisão entre estes e o gás secante. Assim, por exemplo, se um íon solvatado entrar nesta região ele pode sofrer colisão e perder moléculas do solvente. O processo de CID pode ser interessante em alguns estudos, mas pode dificultar a visualização das espécies na forma como elas se encontravam em solução. O fenômeno de CID pode ser minimizado controlando a queda de potencial sentida pelo íon na região do cone de amostragem e o *skimmer*. A equação 1.15 mostra a perda da esfera de solvatação da espécie o que desestabiliza a manutenção da carga e então pode levar a redução [31].

Este processo pode ocorrer com diferentes solventes e espécies.

Figura 1.6. Representação esquemática do processo de dissociação induzida por colisão. As esferas menores representam as moléculas neutras de gás e as maiores os íons [40]. (Figura obtida do CD de apresentação do Platform II da Micromass)

1.3.7 Intensidade do pico versus concentração

Um dos grandes problemas no electrospray é a falta de linearidade da intensidade com a concentração. Isto ocorre devido a diferentes fatores: vazão da amostra, vazão do gás nebulizante, distância da ponta do capilar ao contra eletrodo e vazão do gás secante. Todos esses parâmetros podem ser facilmente controlados para obter-se um fluxo de amostra constante. No entanto, a presença de outros eletrólitos na solução compromete a linearidade da intensidade com a concentração. A ionização por electrospray apresenta uma faixa de linearidade da intensidade com a concentração muito estreita (de 10^{-6} a 10^{-3} mol/L). No solvente utilizado sempre há impurezas. No metanol as impurezas são principalmente sais de amônio e sódio numa concentração 10^{-5} mol/L. O que na realidade é necessário, por que não há formação do electrospray se a condutividade for menor do que 10^{-7} ohm $^{-1}$ cm $^{-1}$. Por exemplo, considerando um analito A e um sal B (um eletrólito presente no solvente), quando A estiver em baixas concentrações, a impureza B predominará na gota e será transportado em maior número para a fase gasosa. Conforme a concentração do analito A aumenta, este começa a dominar e a concentração total do eletrólito começa a aumentar. Normalmente para uma concentração do analito acima de 10^{-5} mol/L, a intensidade do íon B $^{+}$ (I_B) começa a diminuir. Os íons A $^{+}$ competirão com os íons B $^{+}$ no processo de conversão para a fase gasosa. Baseando-se em tais considerações, Kebarle e Tang propuseram a equação 1.16. Esta foi elaborada para um sistema de dois eletrólitos, mas pode ser estendida para n eletrólitos:

$$I_A = f \cdot p \cdot \frac{k_A \cdot [A^{+}]}{k_A \cdot [A^{+}] + k_B \cdot [B^{+}]} \cdot I \quad (1.16)$$

onde I_A é a intensidade do íon A $^{+}$ que foi detectada no espectrômetro de massas, $[A^{+}]$ e $[B^{+}]$ são as concentrações dos eletrólitos na solução, f é fração de cargas na gota que são convertidas para a fase gasosa, p é a fração de íons detectados em relação aos íons gerados e I é a corrente total. Através desta equação, pode-se perceber que aumentando a concentração do analito A há um aumento da corrente, mas como este também está no denominador, existe um limite para este aumento. O aumento da concentração não altera a corrente devido a efeito interiônicos, que diminuem a mobilidade iônica e saturação da

espécie na gota. No geral, em concentrações acima de 1 mmol/L, a intensidade da corrente mantém-se constante e algumas vezes pode até diminuir [41, 31].

O raio das primeiras gotas formadas do electrospray deve ser da ordem de 0,5 a 1 μm para sofrerem todo o processo de dessolvatação e transferirem os íons para fase gasosa (Figura 1.5). Gotas grandes não sofrem dessolvatação eficiente para transferir os íons para fase gasosa. Diminuição do fluxo de amostra e aumento da condutividade são dois parâmetros que permitem obter gotas menores, aumentando a eficiência da dessolvatação.

1.3.8 Descarga Corona

Um dos principais problemas enfrentados para se obter uma corrente constante de íons é devido à ocorrência de descarga corona, principalmente no modo íons negativos. O efeito de descarga corona ocorre quando elétrons livres presentes no gás são acelerados com velocidades que permitam ionizar moléculas de gases presentes. Estas moléculas ionizadas acabam colidindo com outras moléculas presentes, gerando espécies indesejáveis como, por exemplo, CH_3OH_2^+ e $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$. Descarga corona diminui a intensidade dos íons do analito, e os picos correspondentes às espécies geradas pela descarga aparecem com uma intensidade muito alta. A presença de gases como o O_2 e SF_6 e hidrocarbonetos policlorados capturam elétrons inibindo a descarga corona [31].

1.3.9 Mudanças no interior da gota devido a sua dessolvatação

O electrospray teoricamente seria a técnica ideal para se fazer especiação. Pela teoria descrita acima, bastaria controlar os eletrólitos presentes na solução e facilmente poderíamos diferenciar qualquer espécie carregada na solução, uma vez que ele transfere os íons para a fase gasosa sem provocar dissociação e gerar novos íons. Todavia, quando a gota começa sofrer o processo de dessolvatação, a concentração das espécies e o pH da gota podem ser significativamente alterados. A concentração do soluto, que é menos volátil do que o solvente, aumenta porque o volume da gota diminui com a evaporação do solvente. Mudanças na concentração do soluto levam a mudanças do pH e, portanto, do espectro de massas, uma vez que o grau da ionização das espécies depende do pH.

É possível estimar a concentração final do analito conforme o solvente na gota evapora. A razão volume inicial/volume final da gota, V_i/V_f (Figura 2) pode ser avaliada

através da razão dos raios das gotas. A primeira etapa fornece a maior razão ($R_i/R_f=4$). Todos os estágios subsequentes fornecem valores menores que 4. Solutos não voláteis como o NaCl e outros eletrólitos podem aumentar a concentração na gota final em até 50 vezes.

$$\frac{C_f}{C_i} = \frac{V_i}{V_f} = 50$$

O processo de redução da carga da espécie é bastante complexo e pode ocorrer por CID, através da dessolvatação ou por influência do solvente. A redução da carga pela evaporação do solvente é mostrada nas equações 1.17 e 1.18:

Este processo é chamado de separação de cargas. É bastante provável que o íon hidrônio seja ele próprio hidratado conforme ele se separa do *cluster* principal.

A observação de íons com múltiplas cargas dependerá do solvente utilizado. O íon Co^{3+} só é observado quando usamos complexantes polidentados como o hexadentado sepultrato. Lantanídeos com carga +3 só podem ser observados com solventes como dimetilsulfóxido e dimetilformamida [31, 42, 43].

Das explicações acima é possível perceber que electrospray não é uma técnica simples e fácil de controlar. Existe uma série de parâmetros que alteram o espectro de massas.

1.3.10 Aplicações

Existem diferentes tipos de analisadores interfaceados com o modo de ionização por electrospray. O mais comum, devido à facilidade de manuseio e o menor custo, é o analisador quadrupolar simples ou MS/MS. O electrospray com filtro do tipo quadrupolo está sendo amplamente utilizado para estudos do comportamento dos íons na fase gasosa, especiação de complexos metálicos e estudos de processos fundamentais de ionização.

Esta técnica acoplada à eletroforese capilar ou à cromatografia líquida de alta eficiência permite o estudo de biomoléculas em matrizes reais como leveduras e sistemas biológicos em geral. A técnica de electrospray permite a análise de compostos com peso molecular de até 200.000 Da em equipamentos com pequeno alcance de massas (30 a 3000 u). Isto porque no electrospray, moléculas com alto peso molecular podem ter múltiplas cargas. Caso o instrumento tenha resolução suficiente, os picos dos isótopos podem ser usados para determinar se o íon tem múltiplas cargas ou não. Um íon com uma única carga terá os picos dos isótopos separados por uma unidade de massa, enquanto um íon com dupla carga terá picos separados por 1/2 u. Por exemplo, no espectro simulado da ubiquitina, Figura 1.7, é possível determinar a carga em cada pico e a partir da carga é possível determinar o peso molecular. Como a maior parte dos equipamentos não tem resolução suficiente para podermos observar separação de unidades de massa inferior a 1/2 m/z, um método alternativo foi desenvolvido. Através de m/z de dois íons adjacentes com múltiplas cargas pode-se calcular as cargas dos picos. Nas equações 1.19 e 1.20, n_j e n_k são o número de carga, m_j e m_k são as razões m/z de cada pico e x é a massa atômica ou molecular da espécie que confere a carga, como, exemplo, 1 para próton (H^+) ou 23 para Na^+ .

$$n_j = \frac{m_k - x}{m_k - m_j} \quad (1.19)$$

$$n_k = \frac{m_j - x}{m_k - m_j} \quad (1.20)$$

Escolhendo dois picos adjacentes no espectro da ubiquitina, representado na Figura 1.7, (m/z 846 e 940 por exemplo) e considerando $x=1$, chega-se à conclusão que o pico em 846 tem $n=10$ e o pico 940 tem $n=9$. Assim sendo, a massa do composto está em torno de 8460 Da.

Figura 1.7. Espectro da ubiquitina reproduzido da literatura [32] mostrando íons com n cargas. Os picos do padrão isotópico foram suprimidos do espectro para simplificação do gráfico.

Outros tipos de analisadores de massa como tempo de voo, setor magnético, íon-trap e ressonância ciclotrônica também já existem comercialmente [31].

As principais aplicações da ionização por electrospray envolvem estudos bioquímicos e orgânicos. Além destes, há um número grande de trabalhos sobre os processos fundamentais. Pesquisadores como Cole, Fenn e Kebarle vêm estudando intensamente o comportamento de íons relativamente simples como metais alcalinos e alcalinos terrosos a fim de esclarecer o processo de transferência dos íons da fase líquida para a fase gasosa. Os estudos de Kerbale e Tang e Ikomonou [33, 37, 43] para o entendimento da formação da gota carregada e produção dos íons na fase gasosa foram realizados com íons inorgânicos simples como cloretos e iodetos de sódio, potássio e cézio, contribuindo muito para o entendimento sobre o comportamento destes íons em ES-MS.

A análise elementar é geralmente resolvida por espectroscopia de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) ou espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O ES-MS tem mostrado características intermediárias entre estas técnicas. AAS permite analisar cada elemento de interesse individualmente e o tempo de análise é relativamente grande. ICP-OES permite análise de vários elementos e os limites de detecção são melhorados quando

ICP-MS é empregado, mas trabalha essencialmente com íons monoatômicos, o que torna impossível a eliminação de interferência isobárica em alguns casos. O ES-MS permite análise multielementar, com pequena quantidade de amostra e íons poliatômicos o que aumenta a possibilidade de trabalhar em regiões de m/z livres de interferência isobárica [44-48].

Além disto, electrospray pode ser uma alternativa a ICP-MS e TIMS para estudos de medidas isotópicas. Ketterer e Guzowski [49] em 1997 foram os primeiros a propor o uso da técnica para medidas de razão isotópica. No entanto, estes propuseram o uso do electrospray como uma técnica geradora de espécies monoatômicas. Usando condições drásticas de ionização, é possível gerar espécies monoatômicas, como em ICP-MS. Estes mostraram a aplicabilidade da técnica para prata, chumbo e tálio. No caso da prata e do tálio, não houve problema. No entanto, para o chumbo, foi detectada a espécie PbH^+ que foi comprovada usando solvente deuterado. Assim não é possível usar o espectro de massas para obter diretamente o padrão isotópico do chumbo. Seria necessário utilizar uma ferramenta matemática para eliminar esta interferência. Uma alternativa seria determinar o padrão isotopomérico do PbH^+ e subtrai-lo do padrão isotópico do Pb^+ .

Durante o mestrado, desenvolvemos um procedimento matemático para eliminação de interferentes isobáricos gerados pela perda de um ou mais átomos de hidrogênio em conjuntos de picos [6]. Durante estes estudos, notou-se que o método matemático se aplicava também a casos com acréscimo de hidrogênio (formação de hidretos) e que haveria a possibilidade de ampliar a técnica para casos ainda mais complexos, envolvendo a formação de óxidos e hidróxidos, por exemplo. O método desenvolvido foi utilizado no *cluster* obtido pelo Ketterer e Guzowski e o padrão isotópico do chumbo foi resolvido.

O trabalho desenvolvido por Ketterer e Guzowski foi o grande motivador do nosso trabalho. A técnica de ES-MS, assim como TIMS, permite a utilização de espécies poliatômicas, aumentando as possibilidades de se trabalhar em regiões de m/z livres de interferências isobáricas. Desta forma, tivemos a idéia de utilizar a técnica para determinações isotópicas de alguns metais de transição e do boro mas ao invés de gerar espécies monoatômicas, como proposto por Ketterer e Guzowski, utilizar espécies poliatômicas, como complexos metálicos com ligantes monoisotópicos.

1.4 Objetivos

Devido à formação de íons hidretos, cujos padrões isotopoméricos se sobrepõem ao do íon metálico, quando se obtêm o espectro de massas por ionização electrospray em modo íons positivos, surgiu a idéia de utilizar espécies poliatômicas que impeçam a formação dos hidretos. A idéia básica é que, devido à tendência à formação de espécies com carga um quando íons pequenos são gerados, a formação de hidretos MH^+ acaba sendo favorecida para metais em estado de oxidação II ou superior. Por outro lado, se existir um ligante com carga negativa, o complexo pode ser favorecido de modo a obter espécies com uma carga, positiva ou negativa. Sendo o ligante monoisotópico, o padrão isotópico do metal seria integralmente preservado, isto é, seria exatamente igual ao padrão isotopomérico do complexo e sem interferência de hidretos.

Como estudos preliminares demonstraram que várias espécies aniônicas complexas podiam ser observadas, um dos objetivos deste trabalho foi investigar sistematicamente uma ampla variedade de combinações de metais de transição e boro com halogenetos e cianeto em busca de desvendar o comportamento geral de tais complexos e seus espectros por ES-MS e identificar possíveis candidatos a aplicações em medidas isotópicas.

Num segundo momento, o caso particular da combinação boro e fluoreto, formando o tetrafluoroborato, foi selecionado e o objetivo passou a ser uma avaliação profunda sobre a aplicabilidade deste ânion na obtenção da razão isotópica $^{10}B/^{11}B$.

Como a matriz da amostra desempenha papel importante na escolha e determinação de um procedimento analítico real e pode muitas vezes inviabilizar uma nova proposta, foi considerado como objetivo final estabelecer procedimentos completos para alguns tipos de amostras, desde a abertura até o tratamento dos dados.

Capítulo 2

Aplicabilidade Analítica de Metais de Transição e Boro em ES-MS

Neste capítulo é apresentado o estudo realizado sobre metais de transição (Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Au, Hg, Tl e Pb) e boro com halogenetos e cianeto. Embora somente fluoreto e iodeto sejam monoisotópicos, cloreto e brometo foram estudados na tentativa de elucidar tendências na formação dos complexos na fase gasosa. Da mesma forma, o cianeto foi incluído neste estudo, pois se trata de uma espécie que forma complexos com o ferro e não possui características oxidantes ou redutoras significativas. Assim, seria possível investigar as variações do estado de oxidação do átomo central de forma a minimizar o efeito do ligante.

2.1 Parte Experimental

2.1.1 Fonte Electrospray

Todos os experimentos foram conduzidos em um equipamento da Micromass Platform II, com a sonda e o sistema de injeção modificados. Para evitar processos de oxi-redução no capilar de aço inoxidável utilizou-se um capilar de sílica e um novo sistema de injeção foi construído e é descrito a seguir. A vazão típica recomendada para se trabalhar com o electrospray é em torno de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sendo que, quanto menor a vazão melhor a sensibilidade e estabilidade do sinal. O equipamento de ES-MS foi adquirido da Micromass juntamente com uma bomba para HPLC do tipo LC 10AD (Shimadzu). Este tipo de bomba consegue trabalhar sem pulsação somente em fluxos altos, acima de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para fluxos menores, é necessário utilizar um divisor de fluxo. Como não havia nenhum disponível foi necessário construir um sistema de injeção que permitisse fluxos inferiores a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ e sem pulsações. Foi desenvolvido um injetor por gravidade bastante que utiliza a ação da gravidade sobre pesos de metal que empurram o êmbolo de uma seringa, injetando o líquido através de um capilar para o espectrômetro de massas. A vazão vai depender da massa dos pesos, do diâmetro interno da seringa, do atrito do êmbolo com a parede da seringa, do diâmetro interno e do comprimento do capilar e da viscosidade da solução injetada. Foi utilizada uma seringa de 1 ml descartável e êmbolo de 3,6mm. A ponta do capilar de sílica revestida com poliimida (d.i. 100 μm , d.e. 360 μm e comprimento 41,5 cm) foi introduzida no interior de uma agulha descartável 22G1 e fixada com resina epóxi. O suporte foi feito em tubo de PVC e uma peça de nylon foi fixada com parafusos na parte inferior como suporte para a seringa, as peças metálicas são de latão pesando entre 200 e 400 g.

A Figura 2.1 mostra o diagrama da sonda e do sistema de injeção.

A sonda foi manufaturada com suporte de nylon e na sua extremidade foi fixada uma agulha de aço inoxidável, o capilar de sílica passa por dentro do suporte e alcança a agulha. A ponta do capilar foi posicionada de 0,05 a 0,08 cm para fora da agulha e a 2 cm do contra-eletrodo.

A Figura 2.2 mostra uma ampliação do *vial* de amostra. A agulha da seringa, onde é aplicado o potencial, está acoplada na tampa de um recipiente de 1 ml na qual foi fixada, com resina epóxi. A amostra é bombeada através do capilar de sílica de 100 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento a um fluxo de 5 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Esse sistema permite injeções contínuas com o mínimo de pulsação. Durante o texto de discussão será usado o termo “o potencial aplicado no capilar” por uma questão de legibilidade. No entanto, entenda capilar como a agulha da seringa.

2.1.2 Parâmetros do espectrômetro de massas.

Os espectros foram obtidos ajustando os parâmetros da fonte de electrospray em condições brandas. As tensões alcançaram de 1500 a 2000 V para o capilar, de 200 a 300 V para o contra eletrodo, e de 15 a 25 V para o cone de amostragem. O *Skimmer* e o multiplicador foram ajustados a 5V e 800 V, respectivamente. Os fluxos do gás nebulizante e secante (nitrogênio) foram ajustados de 10 a 20 L/h e de 100 a 200 L/h, respectivamente. Foram obtidos espectros no modo íons positivos e negativos. No entanto, para tornar as figuras mais legíveis todos os valores de tensões serão apresentados em módulo.

2.1.3 Reagentes

Soluções estoques, de concentração 10 mmol/L, foram preparadas dissolvendo os sais dos metais (nitratos, sulfatos, cloreto e cianetos) em água deionizada. As soluções estoques foram diluídas em metanol ou acetonitrila grau-HPLC (Omnisolv, Gibbstown, New Jersey). Nas soluções estoques foram acrescentados 5 % de HNO₃ para evitar a hidrólise de alguns íons. Iodeto cuproso foi preparado por mistura de soluções de Cu(NO₃)₂ e KI, seguido de filtração, lavagem e secagem a 70 °C em estufa a vácuo. ZnI₂ foi sintetizado seguindo procedimento da literatura [50]. Os espectros foram obtidos diluindo as soluções estoques para solução contendo 100 µmol/L do metal e 1 mmol/L de NaI em água:metanol (1+99). Condições diferentes destas serão relatadas durante o texto.

2.2 Resultados e Discussões

Os estudos com complexos metálicos foram realizados usando soluções contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ do metal e 1 mmol/L do complexante. Esta relação foi suficiente para garantir a formação do complexo e não provocar supressão das espécies de interesse devido a excesso do iodeto e principalmente do nitrato. Estes dois íons são bastante favorecidos na fase gasosa. Soluções com concentrações superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ do metal, freqüentemente, apresentam supressão das espécies devido ao contra-íon. Os melhores resultados foram obtidos com uma mistura de solvente metanol:água (99+1). A pequena quantidade de água é importante para dissolver os sais. Este sistema de solvente tem baixa tensão superficial permitindo que os experimentos sejam conduzidos em condições brandas.

2.2.1 Avaliação do sistema de Injeção por Gravidade

Os experimentos para avaliar o desempenho das bombas foram realizados variando-se a vazão de injeção usando como eletrólito NaCl e como solvente água ou metanol. O sistema por gravidade foi comparado com uma bomba da Harvard Apparatus 22 que permite a propulsão mecânica através de seringas utilizando um motor de passo. A Tabela 2.1 mostra alguns resultados obtidos de vazão para o sistema proposto.

Tabela 2.1. Avaliação da vazão da bomba mudando a viscosidade do eletrólito.

	Metanol 0,547 cp *	Água 0,891 cp *
massa /gramas	vazão / $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	vazão / $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
275	7	5
669	30	24
542	19	14

* viscosidade em centipoise= $\text{kg/m s } 10^2$

As Figuras 2.3a e 2.3a' mostram o espectro e o cromatograma de íons totais (TIC) para uma solução de 1 mmol/L de NaCl água:metanol (50+50) obtidos com o sistema de injeção por gravidade a uma vazão de 17 $\mu\text{L/min}$. O cromatograma e o espectro da Figura 2.3b e 2.3b', respectivamente, foram obtidos nas mesmas condições variando somente a vazão para 7 $\mu\text{L/min}$. Observa-se que não há nenhuma alteração significativa, em ambos os casos.

A Figura 2.4 mostra os espectros e os TICs, nas mesmas condições da Figura 2.3, usando a bomba comercial da Harvard Apparatus. As Figuras 2.4a e 2.4a' foram obtidas a 17 $\mu\text{L}/\text{min}$ e as Figuras 2.4b e 2.4b' a 7 $\mu\text{L}/\text{min}$. Na figura 2.4b' há um *spike*, em aproximadamente 1 min de aquisição dos dados, este pode estar relacionado com uma parada abrupta do fluxo da amostra ou descarga corona. Analisando os espectrogramas obtidos com as duas bombas, pode-se afirmar que a eficiência e a estabilidade das duas são equivalentes.

2.2.2 Redução eletroquímica no capilar

Um problema encontrado durante as aquisições de dados foi o efeito de memória provocado por alguns metais como zinco, cobre e mercúrio. Este efeito de memória poderia ter duas interpretações: contaminação dos componentes da fonte do electrospray ou redução eletroquímica ocorrendo no capilar de aço inoxidável.

Depois de algumas tentativas para eliminar as interferências através da limpeza das lentes da fonte do electrospray, percebeu-se que a contaminação estava ocorrendo no capilar. Como a ionização é no modo íons negativos, o que deveria estar ocorrendo era a redução e deposição dos metais no capilar de aço inoxidável. Este mesmo efeito foi observado por Van Berkel [51,52].

A solução encontrada para minimizar este problema foi construir uma sonda semelhante à do fabricante, utilizando um capilar de sílica, como descrito na parte experimental. A tensão para a separação de cargas e formação do spray passou a ser aplicada à solução através de uma agulha de aço inoxidável dentro do *vial* de amostra (Figura 2.2). A eficiência de formação do spray foi exatamente a mesma da sonda comercial fornecida pela Micromass. Isto porque a eficiência de formação do spray depende da diferença de potencial entre a ponta do capilar e o contra-eletrodo. Além de minimizar o problema de efeito de memória, diminuiu as chances de ocorrer mudanças no estado de oxidação das espécies em solução, devido à redução destas no capilar.

2.2.3 Estudos comparativos do modo íons positivos e negativos

A meta do estudo era obter espécies por electrospray que pudessem ser utilizadas para medidas isotópicas. Assim, uma série de espectros foi obtida, tanto no modo íons positivos como no negativo, usando soluções de 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Zn}(\text{SO}_4)$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1), com o intuito de gerar espécies como MI_n^- , MI_n^+ ou M^+ . Estas não apresentariam interferência isobárica no padrão isotópico do metal. Os espectros foram obtidos variando uma série de parâmetros, como as tensões nas lentes da fonte do electrospray, as vazões dos gases, as concentrações das espécies envolvidas e a vazão da amostra.

A figura 2.5 mostra o espectro no modo íons positivos para a solução de nitrato de chumbo obtido com o cone de amostragem a 60 V. É possível observar na região de m/z 208

o *cluster* correspondente ao íon Pb^+ . No entanto, como relatado por Ketterer e Guzowski [49] a espécie PbH^+ também é gerada, o que impede o uso deste *cluster* para a determinação isotópica do chumbo. Para usar este cluster seria necessário um tratamento matemático para eliminar a influência do padrão isotópico da espécie PbH^+ no padrão isotópico do íon Pb^+ , o que foi proposto no mestrado [6].

Na região de m/z 334 há um *cluster* que apresenta um padrão isotópico similar ao da espécie PbI^+ , mas é muito pouco intenso para ser utilizado na determinação do padrão isotópico. Além disto, parece haver formação de outras espécies na mesma região de massa.

O espectro apresentou uma série de picos relativos a clusters do solvente-solvente – como $[(\text{CH}_3\text{OH})_n \cdot \text{CH}_3\text{OH} \cdot \text{H}]^+$ e $[(\text{CH}_3\text{OH})_n (\text{H}_2\text{O})_m \text{H}_3\text{O}]^+$ –, metal-solvente – como $[\text{MI}(\text{CH}_3\text{OH})_n]^+$ e $[\text{MI}(\text{CH}_3\text{OH})_n (\text{H}_2\text{O})_m]^+$ com n e m variando de 1 até 3 – e clusters do tipo $[\text{Na}_n(\text{NO}_3)_{n-1}]^+$, onde n varia de 1 até 7.

Figura 2.5. Espectro de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). Parâmetros da fonte do electrospray: Tensão no cone de amostragem 60 V, capilar 2000 V, contra-eletródo 280 V, *skimmer* 5 V, fluxo do gás secante 200 L/h, fluxo do gás nebulizante 20 L/h, vazão da amostra 10 $\mu\text{L/min}$.

Diminuindo a tensão aplicada no cone de amostragem, a espécie Pb^+ desaparece, pois provavelmente é formada na fase gasosa devido a dissociação dos *clusters* de PbI^+ e $\text{Pb}(\text{NO}_3)^+$ que podem ser observados no espectro na Figura 2.6 obtido com a tensão no cone de

amostragem a 25 V. Estas duas últimas espécies são provavelmente formadas na fase gasosa durante a dessolvatação das gotas.

Observou-se que as espécies geradas na fase gasosa são bastante influenciadas pelas tensões aplicadas na fonte de electrospray. O cluster de PbI^+ poderia ser utilizado para a determinação do padrão isotópico, mas é obtido com intensidade muito baixa e parece haver interferência isobárica neste cluster. Os espectros obtidos no modo íons positivos, de um modo geral, apresentam uma série de picos de difícil identificação o que torna estes espectros poluídos e aumenta a probabilidade de interferência isobárica.

Figura 2.6. Espectro de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1), obtido no modo íons positivos.

A Figura 2.7 mostra o espectro da mesma solução de chumbo no modo íons negativos. Observa-se além do cluster de PbI_3^- , aparentemente sem interferência isobárica, a presença de outros picos bastante intensos como I^- (m/z 127) e I_3^- (m/z 381). O espectro obtido no modo íons negativos é bem mais limpo e apresenta um número menor de *clusters* do tipo metal-solvente. Além disto, como os clusters formados com o iodeto apresentam em geral massa alta, devido aos três átomos de iodo, a chance de ocorrer interferência isobárica nesta região diminui muito.

Alguns metais estudados não apresentaram espécies formadas com o ligante no modo íons positivos este foi o caso para o ferro, cádmio, cobalto e prata. A Tabela 2.2 mostra os

principais *clusters* obtidos no modo íons positivos para os metais estudados. As espécies estão organizadas em ordem decrescente de intensidade. Observa-se na Tabela 2.2 – nos experimentos 1 e 2 para o ferro, experimentos 3 e 4 para o cádmio, experimento 5 para o cobalto e 12 para a prata – que não houve formação na fase gasosa de complexos do metal com o iodeto. As espécies formadas com metal, na fase gasosa, envolvem o contra-íon ou o solvente.

Para alguns metais, aumentando a tensão do cone, consegue-se provocar a dissociação destes complexos e obter o íon M^+ , este é o caso da prata e cádmio (experimentos 12 e 3, respectivamente). No caso do cádmio e chumbo, o íon M^+ é obtido com uma boa intensidade, mas é formada a espécie MH^+ .

Das espécies metálicas estudadas, somente os elementos mercúrio e zinco apresentaram a formação de espécies HgI^+ e ZnI^+ , respectivamente. Estas espécies foram geradas mesmo a baixas tensões do cone e com o aumento da tensão do cone, estas são mais favorecidas e aparentemente sem a formação do hidreto metálico.

Tabela 2.2- Experimentos selecionados no modo íons positivos

Experimento	soluto/ solvente* / tensão no cone de amostragem	Principais espécies observadas no espectro
1	$Fe(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 56 V	$Fe(NO_3)^+$, $Fe(NO_3)_2^+$, Na^+ , CH_3OHH^+
2	$Fe(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25 V	$Fe(OH)^+$, $Fe(NO_3)_2^+$, $Fe(NO_3)^+$, $Fe(CH_3OH)^+$, $Fe(CH_3OH)_2^+$,
3	$Cd(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 50 V	$Cd(NO_3)^+$, Cd^+ , $Cd(H_2O)_2^+$, CdH^+
4	$Cd(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25 V	$Cd(OH)^+$, $Cd(NO_3)^+$, $CdNO_3(CH_3OH)^+$, $Cd(NO_3)(CH_3OH)_2^+$,
5	$Co(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 50 V	$CoH(CH_3OH)^+$, CoH^+ , Na^+
5	$Co(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25 V	$CoH(CH_3OH)^+$, CoH^+ , Na^+ , CH_3OHH^+
6	$Pb(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 60V	Pb^+ , PbH^+ , PbI^+
7	$Pb(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25V	$Pb(NO_3)^+$, $Pb(CH_3O)^+$, $Pb(CH_3O)(CH_3OH)^+$, PbI^+
8	$Zn(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 60V	ZnI^+ , $ZnI(CH_3OH)^+$, $Zn(CH_3O)^+$
9	$Zn(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25V	$Zn(CH_3O)^+$, $Zn(CH_3O)(CH_3OH)^+$, ZnI^+ .
10	$Hg(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 60V	HgI^+ , $HgI(CH_3OH)^+$, $HgI(CH_3OH)_2^+$
11	$Hg(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 25V	$HgI(CH_3OH)^+$, $HgI(CH_3OH)_2^+$, HgI^+ .
12	$Ag(NO_3)_2$ 100 μ mol/L, NaI 1mmol/L, M, 60V	Ag^+

*M – metanol: água (99+1)

Figura 2.7. Espectro de uma solução 100 μmol/L de Pb(NO₃)₂ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1) obtido no modo íons negativos.

Fez-se um estudo variando-se as tensões do cone de amostragem, capilar, contra-eletrodo e *skimmer*. O principal parâmetro na fonte de electrospray que produz mudanças consideráveis no espectro de massas obtido é a tensão aplicada ao cone de amostragem. Isto porque, dependendo da tensão aplicada, pode-se favorecer a dissociação das espécies ionizadas. Espectros obtidos no modo íons positivos são mais suscetíveis às variações no cone de amostragem. Uma vez que as principais espécies formadas contendo o metal parecem ser geradas na fase gasosa durante a dessolvatação da gota ou por CID.

As Figuras 2.8 e 2.9 mostram a influência da variação da tensão aplicada no cone de amostragem para as espécies de zinco tanto no modo íons positivos como negativos, respectivamente. Nota-se que no modo íons positivos a espécie de interesse, ZnI⁺, praticamente desaparece com a diminuição da tensão do cone de amostragem, o que indica que esta espécie é gerada na fase gasosa.

No modo íons negativos, o íon de interesse, ZnI₃⁻, é formado a baixas tensões do cone de amostragem, pois este é gerado em solução e a variação da tensão do cone de amostragem praticamente não altera o *cluster* do metal-ligante (Figura 2.9).

Como os complexos metálicos apresentaram um comportamento muito mais estável e reproduzível no modo íons negativos os estudos foram aprofundados neste modo de ionização. Além disto, os espectros obtidos no modo íons negativos foram obtidos com resolução de linha base. De um modo geral as condições ideais para obter picos com resolução de linha base e com uma boa intensidade foram: o capilar deve estar entre 1000 e 2000 V, o cone de

amostragem entre 5 e 25 V, o *skimmer* a 5 V e o contra-eletrodo entre 200 a 350 V. O fluxo do gás secante entre 100 a 200 L/h, o fluxo do gás nebulizante entre 10 e 20 L/h e a vazão da amostra entre 5 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Pequenas variações na tensão aplicada ao contra-eletrodo interferem muito pouco na resolução e intensidade dos picos. No entanto, tensões elevadas causam o desaparecimento das espécies formadas.

Tensões altas, acima de 2500 V, aplicadas ao capilar aumentam a incidência de descarga corona. Além disto, observou-se uma piora da resolução dos picos em tensões acima de 3000 V. Na Figura 2.10 percebe-se que, tanto baixa tensão no capilar, 500 V (Figura 2.10a), como para alta, 3000 V (Figura 2.10f), há uma queda da intensidade do íon. Provavelmente os motivos desta queda são diferentes. Em baixas tensões do capilar a produção de todos os íons está sendo igualmente escassa. No entanto, quando uma alta tensão é aplicada no capilar, espécies estranhas devido à descarga corona surgem, diminuindo a intensidade do íon de interesse.

O cone de amostragem deve ficar entre 15 e 25 V. Tensões menores que 25 V normalmente resultam em intensidades muito baixas e tensões acima de 25 V aumentam a incidência de colisões entre as espécies e, portanto, favorece o fenômeno de CID. Tensões diferentes de 5 V no *skimmer* conduzem a uma diminuição da intensidade dos picos em todo espectro e não parece influenciar os íons devido às diferenças de massas.

Para economizar nitrogênio, procurou-se trabalhar com a menor vazão de gases de nebulização e secante que não resultasse na degradação do sinal. A vazão da amostra é extremamente importante. Vazão alta da amostra não permite a formação de um spray estável e provoca uma contaminação muito grande do equipamento. É óbvio que estas condições variam conforme a condutividade da solução e a facilidade com que os íons são transferidos para a fase gasosa. Para os nossos estudos, estas condições foram adequadas para maioria dos espectros obtidos. Condições diferentes destas serão relatadas.

Figura 2.8. Espectro de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1) obtido no modo íons positivos. Tensão no cone de amostragem: a 60V, b 45 V, c 25 V.

Figura 2.9. Cluster do íon ZnI_3^- obtido de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). Tensão no cone de amostragem: a. 20 V, b. 30 V, c. 47 V, d. 60 V, e. 70 V

Figura 2.10. Cluster do íon ZnI_3^- obtido a partir de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). Tensão no capilar: a.-500 V, b.-700 V; c. 1000 V, d. 1500 V, e. 2000 V, f. 3000 V.

2.2.4 Estudos no modo íons negativos

Vários experimentos foram conduzidos com diferentes combinações de cátions, ânions, solventes e condições na fonte do electrospray. Deste universo, um conjunto de 36 experimentos foi escolhido para fornecer uma visão geral da potencialidade do electrospray e são mostrados na Tabela 2.3. Para cada espectro, os principais picos foram representados considerando-se os valores de m/z e padrões isotópicos, sendo as espécies listadas em ordem decrescente de abundância.

Tabela 2.3. Experimentos no modo íons negativos.

Exp.	soluto/ solvente ¹ / cone de amostragem ²	Principais espécies observadas no espectro
1	Hg(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , HgI ₃ ⁻
2	Pb(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M ³	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , PbI ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻
3	Hg(NO ₃) ₂ 100μM, CH ₃ COOTl 100μM,	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , HgI ₃ ⁻ , TlI ₂ ⁻ , Na ₂ I ₃ ⁻
4	Cd(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , CdI ₃ ⁻ , [Na(NO ₃) ₂] ⁻ , NaINO ₃ ⁻ , Cd(NO ₃) ₂ ⁻ , Cd(NO ₃) ₂ I ⁻ ,
5	Zn(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , ZnI ₃ ⁻ , Na ₂ I ₃ ⁻
6	Co(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , Na ₂ I ⁻ , CoI ₃ ⁻ , Co(NO ₃) ₂ ⁻ , Co(NO ₃) ₂ I ⁻ , Co(NO ₃) ₃ ⁻
7	Cd(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 10mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , Na ₂ I ⁻ , CdI ₃ ⁻ , NaI(NO ₃) ⁻ , Na ₂ I ₃ ⁻ , Na ₃ I ₄ ⁻ , CdI ₃ (NaI) ⁻
8	Zn(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 100μM/ M	NO ₃ ⁻ , I ⁻ , Zn(NO ₃) ₂ ⁻ , ZnI ₃ ⁻ , Zn(NO ₃) ₂ I ⁻ , Zn(NO ₃) ₃ ⁻ , NaI(NO ₃) ⁻
9	Zn(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 10mM/ M	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , ZnI ₃ ⁻ , Na ₂ I ₃ ⁻ , Na ₃ I ₄ ⁻
10	Zn(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 10μM/ M	NO ₃ ⁻ , Zn(NO ₃) ₃ ⁻ , I ⁻ , Zn(NO ₃) ₂ I ⁻ , Zn(NO ₃) ₂ ⁻ , NaI(NO ₃) ⁻ , ZnI ₃ ⁻
11	Cu(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M ou W	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , CuI ₂ ⁻ , I ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , CuI ₃ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻
12	CuSO ₄ 100μM, NaI 1mM/ M ou W	I ⁻ , HSO ₄ ⁻ , CuI ₂ ⁻ , I ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , CuI ₃ ⁻
13	Cu(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ A	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , CuI ₂ ⁻ , I ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻
14	CuSO ₄ 100μM, NaI 1mM/ A	HSO ₄ ⁻ , I ⁻ , CuI ₂ ⁻ , NaI ₂ ⁻
15	CuI ⁴ , NaI 1mM/ M	I ⁻ , CuI ₂ ⁻ , (CH ₃ OH) ₂ CH ₃ O ⁻
16	Ni(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M	I ⁻ , NiI ₃ ⁻ , Ni(NO ₃) ₂ ⁻ , Ni(NO ₃) ₂ I ⁻
17	Ni(NO ₃) ₂ 100μM, NaI 1mM/ M/ 40V	I ⁻ , NiI ₃ ⁻ , NiI ₂ ⁻ , Ni(NO ₃) ₂ ⁻ , Ni(NO ₃) ₂ I ⁻
18	Zn(NO ₃) ₂ 100μM, Cu(NO ₃) ₂ 500μM, NaI	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻ , I ₃ ⁻ , CuI ₂ ⁻ , Zn(NO ₃) ₂ I ⁻ , Cu(NO ₃) ₂ I ⁻ , CuI ₃ ⁻ , ZnI ₃ ⁻ ,
19	Fe(NO ₃) ₃ 100μM, NaI 1mM/ M ou W	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , I ₃ ⁻ , FeI ₃ ⁻ , NaINO ₃ ⁻ , FeI ₄ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻ , NaI ₂ ⁻
20	FeSO ₄ 100μM, NaI 1mM/ M ou W	I ⁻ , FeI ₃ ⁻ , FeI ₄ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , HSO ₄ ⁻
21	Fe(NO ₃) ₃ 100μM, NaI 1mM/ A	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , I ₃ ⁻ , FeI ₃ ⁻ , NaINO ₃ ⁻ , FeI ₄ ⁻ , Na(NO ₃) ₂ ⁻ , NaI ₂ ⁻
22	FeSO ₄ 100μM, NaI 1mM/ A	I ⁻ , FeI ₃ ⁻ , NaI ₂ ⁻ , HSO ₄ ⁻
23	K ₄ [Fe(CN) ₆] 100μM/ M/ 10 V	[Fe(CN) ₄] ²⁻ , [Fe(CN) ₃] ⁻ , [Fe(CN) ₆] ²⁻ , [Fe(CN) ₄] ⁻
24	K ₃ [Fe(CN) ₆] 100μM/ M/ 10 V	[Fe(CN) ₄] ²⁻ , [Fe(CN) ₃] ⁻ , [Fe(CN) ₆] ²⁻ , [Fe(CN) ₄] ⁻
25	K ₄ [Fe(CN) ₆] 100μM/ M/ 50 V	[Fe(CN) ₂] ⁻ , [Fe(CN) ₃] ⁻ , [Fe(CN) ₄] ⁻
26	K ₃ [Fe(CN) ₆] 100μM/ M/ 50 V	[Fe(CN) ₂] ⁻ , [Fe(CN) ₃] ⁻ , [Fe(CN) ₄] ⁻
27	Co(NO ₃) ₂ 100μM, NaF 1mM/ M	Na ₂ F ₃ ⁻ , CoF ₃ ⁻ , Na ₂ NO ₃ F ₂ ⁻ , NaNO ₃ F ⁻ , Co(NO ₃) ₂ F ₂ ⁻
28	FeSO ₄ 100μM, NaF 1mM/ M	HSO ₄ ⁻ , FeF ₂ ⁻ , NaF ₂ CH ₃ OH ⁻ , [NO ₃ CH ₃ OH] ⁻ , FeF ₃ ⁻
29	Fe(NO ₃) ₂ 100μM, NaF 1mM/ M	NO ₃ ⁻ , FeF ₂ ⁻ , NaF ₂ CH ₃ OH ⁻ , [NO ₃ CH ₃ OH] ⁻ , FeF ₃ ⁻
30	Ni(NO ₃) ₂ 100μM, NaF 1mM/ M	Ni(NO ₃) ₂ F ⁻ , NiF ₃ ⁻ , Ni(NO ₃) ₃ ⁻ , Na(NO ₃) ₃ ⁻ , Ni(NO ₃) ₂ F ₂ ⁻ , Na ₂ F ₃ ⁻
31	CuCl ₂ 100μM/ M/ 20V	Cl ⁻ , CuCl ₃ ⁻ , CuCl ₂ ⁻
32	ZnCl ₂ 100μM, NaF 1mM/ M	Cl ⁻ , ZnCl ₃ ⁻ , ZnCl ₂ F ⁻ , ZnClF ₂ ⁻ , ZnF ₃ ⁻
33	NaAuCl ₄ 100μM/ M	Cl ⁻ , AuCl ₄ ⁻
34	CdCl ₂ 100μM, NaF 1mM/ M	Cl ⁻ , CdCl ₃ ⁻ , CdF ₂ Cl ⁻ , CdF ₃ ⁻ , F ⁻
35	CdCl ₂ 100 μM/ M	Cl ⁻ , CdCl ₃ ⁻ , 245.7°, 272.7°, Cd ₂ Cl ₅ ⁻
36	NaBF ₄ 100μM/ M	BF ₄ ⁻ , Na(BF ₄) ₂ ⁻

¹ M: metanol/água (99:1 v/v); A: acetonitrila/água (99:1 v/v); W: água.² 15V a menos que relatado.³ amostra injetada após filtração.⁴ solução saturada e filtrada de CuI em 1mmol/L NaI.^e desconhecido

2.2.4.1 Intensidade do pico versus Concentração

Comparando os experimentos 5 e 8 da tabela 2.3, pode-se perceber que aumentando a concentração de iodeto de 1 mmol/L para 10 mmol/L, as espécies formadas com iodeto são favorecidas. Como mostrado por Wang e Cole [41], há uma competição entre os íons presentes na gota para a formação do íon na fase gasosa, de forma que pode ocorrer a supressão do íon, dependendo da natureza e da concentração da espécie.

A supressão do íon devido à competição entre os ligantes pelo átomo central pode ser observada na Figura 2.11. Quando iodeto está numa concentração inferior a 100 $\mu\text{mol/L}$, a espécie favorecida é o complexo do zinco com nitrato. Com o aumento da concentração de iodeto, há um favorecimento do complexo com I^- .

Figura 2.11. Estudo sobre a supressão dos íons. Concentração de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ constante em 100 $\mu\text{mol/L}$ e a concentração de iodeto variou de 10 $\mu\text{mol/L}$ a 10 mmol/L.

Como discutido na introdução, a quantificação de zinco ou de qualquer outro metal pelo monitoramento do *cluster* de interesse é muito difícil. Para isto é necessário ter-se rigoroso controle da concentração do contra-íon e das outras espécies existentes na solução, o que não é uma tarefa muito simples.

A intensidade do íon detectado não está relacionada diretamente com a concentração do mesmo na solução. Em soluções com concentrações acima de 1 mmol/L geralmente a intensidade não aumenta, havendo saturação do sinal.

A gota formada na ponta do capilar tem a sua superfície praticamente formada por íons negativos e o interior desta contém íons negativos e alguns íons positivos. Quando a repulsão eletrostática na superfície da gota alcança o limite de Rayleigh, esta se rompe formando pequenas gotas carregadas cujo diâmetro dependerá do diâmetro interno do capilar, da viscosidade e da condutividade da solução. Desta forma, não adianta aumentar a concentração do analito na solução pois haverá um limite de íons que alcançarão a superfície da gota.

A alta concentração de um determinado íon acaba provocando mudanças na condutividade da solução e desestabilizando a formação do cone de Taylor na ponta do capilar. Por outro lado, quando sua concentração é inferior a 10^{-6} mol/L pode ocorrer supressão do analito, devido a presença de eletrólitos ou mesmo impurezas do solvente.

Na Figura 2.12 observa-se a falta de linearidade para soluções com diferentes concentrações de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). A falta de linearidade é resultante de uma série de fatores: vazão do gás secante e nebulizante, distância da ponta do capilar em relação ao contra-eletrodo, supressão das espécies de interesse devido a eletrólitos presentes no solvente e impurezas dos sais. De todos estes fatores o mais difícil de ser controlado é a concentração dos eletrólitos na solução. Além deste, no nosso sistema uma parte delicada da montagem é o controle da distância do capilar em relação ao contra-eletrodo. Como a sonda foi confeccionada no laboratório não há um ajuste fino para esta distância, ficando a cargo do operador. Percebeu-se que uma pequena

Figura-2.12. Variação da intensidade com a concentração. Solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ em diferentes concentrações: 1 $\mu\text{mol/L}$ a 1 mmol/L e 1 mmol/L de NaI em metanol. ■- CuI_2 , ●- ZnI_3 , ▲- CuI_3 .

mudança (centímetros) na distância do capilar em relação ao contra-eletrodo algumas vezes pode ocasionar diferenças grandes nas intensidades das espécies geradas. Essas diferenças nas intensidades das espécies dependendo da posição do capilar provavelmente estão relacionadas com o campo elétrico, responsável pela formação do cone de Taylor, e com o tempo que o íon tem para ser formado.

Dentre estes dois, o fator predominante é a formação do campo elétrico. Um experimento realizado demonstrou a importância da posição da ponta do capilar. Retirando-se o contra-eletrodo do sistema e posicionando a ponta do capilar a poucos centímetros do cone de amostragem, e sem o uso de qualquer auxílio de gases para a formação do spray, foi possível observar a formação do cone e os íons gerados. No entanto, um distanciamento de apenas 1 centímetro, do capilar em relação ao cone de amostragem, o cone de Taylor não se formou e nenhum íon foi observado.

Quando o contra-eletrodo é utilizado é necessário o uso do gás nebulizante e secante, pois há um longo caminho a ser percorrido pelo íon antes de alcançar o cone de amostragem.

O tempo necessário para a dessolvatação da gota é relevante quando o capilar é colocado muito próximo ao contra-eletrodo ou cone de amostragem. Após a expulsão das primeiras gotas da ponta do capilar estas precisam ser dessolvatadas a um tamanho que consigam gerar o íon na fase gasosa. Fez-se o mesmo estudo para os íons BF_4^- e Br^- , pois estes são bastante estáveis em solução e na fase gasosa. Desta forma, estes íons devem ser menos influenciáveis pelas variações ocorrendo na fonte do electrospray. Os resultados apresentaram uma maior correlação da intensidade do pico com as concentrações dos analitos na solução.

Foram obtidos espectros no modo registro de íons selecionados (SIR), varrendo apenas quatro íons, dois íons para o boro em m/z 86 e 87 e dois íons para o bromo em m/z 79 e 81. A Figura 2.13 mostra os dados obtidos para uma solução de NaBF_4 e NaBr variando de

Figura 2.13. Variação da intensidade com a concentração para os íons BF_4^- e Br^- .

10 $\mu\text{mol/L}$ a 90 $\mu\text{mol/L}$. Desconsiderando a concentração em 90 $\mu\text{mol/L}$ a correlação dos dados para o íon em m/z 86 foi de 0,9783 para um conjunto de 7 pontos. Para o íon de m/z 79, descartando as duas concentrações maiores, a correlação foi de 0,9272. Considerando-se o número de pontos, pode-se afirmar com um nível de confiança de 95 % que há correlação entre as intensidades dos picos e a concentração do analito.

Para minimizar as interferências devido às impurezas nos sais de nitrato, sintetizou-se o composto iodeto de zinco no laboratório e o resultado obtido variando a intensidade em relação a concentração (10 $\mu\text{mol/L}$ até 500 $\mu\text{mol/L}$) é mostrado na Figura 2.14. Preparou-se a solução com água deionizada, e metanol ultrapuro. Portanto, as espécies presentes são ZnI_2 , sódio, iodeto, água, metanol e as impurezas contidas no metanol, que estão na faixa 10^{-5} mol/L . O espectro foi graficado no modo logaritmo para atingir a larga faixa de concentração. O melhor coeficiente de correlação foi obtido na faixa de 40 $\mu\text{mol/L}$ a 600 $\mu\text{mol/L}$ ($0,996 \pm 0,004$). Os experimentos com Br^- , BF_4^- e ZnI_2 demonstraram que é possível obter curvas analíticas satisfatórias, desde que se tenha controle das espécies presentes na solução.

Figura 2.14. Gráfico mostrando o comportamento linear, para soluções com diferentes concentrações de ZnI_2 .

2.2.4.2 Complexos com iodeto

A Figura 2.15a mostra o espectro de Hg^{2+} na presença de excesso de iodeto. A Figura 2.15b mostra a região do íon HgI_3^- neste espectro e o padrão isotópico esperado. Abraham e colaboradores [53] demonstraram que este íon é o mais abundante em soluções metanólicas com excesso de iodeto. Portanto, este íon deve ser formado ainda em solução e transferido para a fase gasosa. A espécie HgI_4^{2-} , esperada na fase aquosa, não foi observada. Mesmo

quando espectros de uma solução de sal de mercúrio e NaI em excesso foram obtidos em meio 100 % aquoso, a espécie preferencialmente formada foi HgI_3^- . A redução da carga da espécie HgI_4^{2-} deve ocorrer durante o processo de dessolvatação levando a formação da espécie, HgI_3^- , mais estável na fase gasosa. As barras no interior dos picos da Figura 2.15b foram calculadas usando as abundâncias naturais de cada isótopo.

Figura 2.15. Espectro de uma solução de 100 µmol/L de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1) (Experimento 1).

A Figura 2.16 mostra o cluster para o íon PbI_3^- obtido de uma solução de 100 µmol/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). O modo íons negativos evita a formação de hidretos, Figuras 4 e 6, como observado por Ketterer e Guzowski [49], no modo íons positivos. Apesar de haver uma precipitação parcial da espécie PbI_2 à temperatura ambiente, o que pode conduzir a algum fracionamento isotópico, soluções diluídas, como a utilizada para obter o espectro, não causam este tipo de problema. De qualquer forma, o aquecimento da solução aumenta a solubilidade do PbI_2 .

Figura 2.16. Cluster do íon PbI_3^- . Solução de 100 µmol/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1) (Experimento 2).

Como relatado na introdução é comum o uso do tálio para eliminar problemas de discriminação de massas nas medidas das razões isotópicas de mercúrio e chumbo [12].

Embora, tálio complexa bem com iodeto, aquele está presente em solução somente nos estados de oxidação +1 e +3. Portanto, as espécies normalmente formadas em meio aquoso são TlI_2^- e TlI_4^- . O complexo TlI_3^- não é esperado ser formado em solução, mas como em electrospray espécies pouco comuns em fase aquosa são geradas, com uma certa frequência, na fase gasosa, poder-se-ia esperar sua formação por dissociação induzida por colisão a partir do TlI_4^- , por exemplo. Todavia, isto não ocorreu porque nos espectros obtidos não se observou a espécie TlI_3^- . O único cluster formado contendo tálio foi TlI_2^- (Figura 2.17) e está deslocado 127 u da região de massa do íon HgI_3^- e PbI_3^- .

Espectros de sais de nitrato de cádmio, zinco, cobalto e níquel com iodeto de sódio em metanol:água (99+1) geraram como principal íon, contendo o metal, complexos com uma única carga negativa (CdI_3^- , ZnI_3^- , CoI_3^- , e NiI_3^-). No espectro do nitrato de cádmio e iodeto de sódio na Figura 2.18 é possível perceber a formação de diferentes íons, como: $[\text{CdI}_3(\text{NaI})]^-$, $[\text{NaI}(\text{NO}_3)]^-$.

Figura 2.18. Espectro obtido de uma solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1).

A formação destas espécies ocorre devido ao processo de formação do íon na fase gasosa. Durante a evaporação do solvente na gota há um aumento na proximidade entre as espécies, permitindo que estas interajam entre si.

Relembrando a discussão apresentada na introdução sobre a formação do íon, segundo o mecanismo de Dole, chamado de método da carga residual (CRM) [38], a formação do íon na fase gasosa depende da formação de gotas extremamente pequenas pela evaporação do solvente até que a gota “seja um íon”. Thomson e Iribarne [39] propuseram um outro mecanismo, chamado mecanismo de evaporação do íon, o íon na fase gasosa surge depois que o raio da gota atinge um determinado tamanho ocorrendo emissão direta do íon da gota. Iribarne elaborou um novo mecanismo porque em seus experimentos ele não observou íons do tipo $\text{Na}_n(\text{NaCl})_m^+$, que seriam esperados no mecanismo de Dole. Em nossos experimentos observamos espécies que sugerem que ambos os processos de formação da gota estão ocorrendo.

2.2.4.2.1 Mudanças no estado de oxidação

Um das principais vantagens da ionização por electrospray, apontada por vários pesquisadores, é a possibilidade de especiação. Como a espécie é levada da fase líquida para a fase gasosa sem sofrer alteração, o electrospray seria a técnica ideal para se fazer especiação. No entanto, os estudos realizados por nós mostraram que a situação não é tão simples.

Dependendo da tensão aplicada no cone de amostragem alguns estados de oxidação pouco comuns, em fase aquosa, são observados. Os experimentos 16 e 17 da Tabela 2.3 mostram as diferentes espécies formadas a partir de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água, variando a tensão aplicada no cone de amostragem. Quando a tensão é menor que 25 V a única espécie formada contendo níquel é NiI_3^- . Conforme a tensão aumenta, uma segunda espécie é formada, NiI_2^- , com níquel(I). Acima de 40 V a espécie com níquel(I), formada por CID, passa a predominar no espectro (Figura 2.19). Estados de oxidação desconhecidos em solução foram observados para outros metais em tensões de cone altas. Em tensões acima de 60 V, por exemplo, observou-se o *cluster* com mercúrio(I), HgI_2^- , no espectro obtido da mesma solução do experimento 1 da tabela 2.3.

Assim, para se preservar o estado de oxidação dos metais é necessário trabalhar com baixas tensões no cone de amostragem. Todavia, o estado de oxidação de alguns metais não foi preservado mesmo a baixas tensões do cone. Este foi o caso para o cobre e o ferro.

Figura 2.19. Influência da tensão do cone na formação das espécies. $\square$ - NiI_3^- , $\bullet$ - NiI_2^- .

Sabe-se que cobre(II) é reduzido pelo iodeto, gerando iodeto cuproso (CuI) sólido e triiodeto I_3^- e que, na presença de excesso de iodeto, o sólido é dissolvido formando CuI_2^- e outros complexos. No entanto, para baixas concentrações (100 $\mu\text{mol/L}$ do sal de cobre e 1 mmol/L do sal de iodeto) de cobre e iodeto estas reações não são quantitativas. A Figura 2.20 mostra o *cluster* de Cu(I) e Cu(II) e o íon I_3^- do espectro obtido de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em metanol:água (99+1). O mesmo comportamento foi observado em experimentos usando água como solvente (experimento 11). Por outro lado, cobre(II) não é observado quando o solvente é acetonitrila (experimento 13 e 14). Trabalhos anteriores sobre complexos de cobre em acetonitrila têm mostrado que cobre(I) é estabilizado neste solvente [54].

As abundâncias dos complexos de Cu(I) e Cu(II) são altamente dependentes da tensão aplicada ao cone de amostragem. Quando água é o solvente, o íon CuI_3^- é o complexo mais abundante a 10V, enquanto o íon CuI_2^- prevalece com o cone a 18 V. O *cluster* de Cu(II) não é observado a 25 V. Estes resultados sugerem que CuI_2^- é formado por CID ainda a baixas tensões do cone de amostragem. Mudando-se o contra-íon para sulfato, o estado de oxidação das espécies não se altera (experimentos 12 a 14).

Figura 2.20. *Clusters* de CuI_2^- e CuI_3^- no espectro do experimento 10: 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L de NaI em água:metanol (1+99).

Para avaliar a influência do triiodeto na re-oxidação do Cu(I) a Cu(II), o sal CuI foi preparado e, após a purificação, este foi dissolvido com excesso de iodeto. A Figura 2.21, experimento 15, mostra o espectro de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de CuI_2^- em excesso de iodeto de sódio. Não se observa no espectro os *clusters* de I_3^- e CuI_3^- (Figura 2.21), o que sugere que o complexo de cobre(II), observado nas Figura 2.20, não foi gerado pelo processo de electrospray ou por CID, mas por uma redução incompleta do Cu(II) pelo iodeto na fase líquida.

A redução incompleta do Cu(II) em soluções diluídas é corroborada pelas equações de redução do Cu(II) pelo iodeto. Para cada dois moles de Cu(II) são necessários 5 moles de iodeto. Conforme a reação se processa o iodeto é consumido e iodo é formado. Aplicando as equações de equilíbrio usando um valor aproximado de iodeto e iodo, ao final de uma reação com

100 $\mu\text{mol/L}$ de Cu(II) e 1 mmol/L de iodeto, a quantidade de Cu(II) sem reagir é aproximadamente 1 $\mu\text{mol/L}$.

Nas titulações de Cu(II) e iodeto com tiosulfato a redução do Cu(II) é quantitativa, porque o tiosulfato reage com o iodo liberado da reação de redução (eq 2.1) e gera tetrationato e iodeto, e conseqüentemente, este reage com o Cu(II) restante.

Estes experimentos sugerem que a tensão no cone de amostragem é um fator determinante nas abundâncias dos *clusters* de Cu(I) e Cu(II) e podem complicar a especiação.

Figura 2.21. Espectro obtido de uma solução 100 mmol/L de CuI_2^- em metanol:água (99+1).

Um outro exemplo, que mostra a dificuldade de obter a espécie no estado de oxidação em que ela se encontra na solução é o estudo com sais de ferro. O espectro de ferro (II) com iodeto é similar ao do cobre(II), experimento 19, novamente os íons I^- e I_3^- estão presentes e os complexos com o metal no estado de oxidação II e III: FeI_3^- e FeI_4^- (Figura 2.23 a e 23 b). No entanto, o mecanismo pelo qual este complexo é formado parece ser diferente em alguma extensão. A Figura-2.22 mostra os espectros de uma solução de FeSO_4 e NaI em (a) - metanol, (b) - acetonitrila e (c).- água. Quando o solvente prótico é utilizado a espécie com Fe(III) , FeI_4^- , é formada. O que não ocorre em solventes apróticos como a acetonitrila. O mesmo experimento foi

feito utilizando-se uma solução de Fe(III) – nitrato férrico com iodeto de sódio – e pode-se perceber que para os três solventes tanto o *cluster* com Fe(II) como com Fe(III) estão presentes (Figura-2.23). Sabendo-se que o ferro(III), em soluções diluídas com iodeto, não é totalmente reduzido a ferro(II), pode-se explicar a formação dos íons FeI_4^- e FeI_3^- .

No caso de uma solução inicial de Fe(II) (Figura 2.22) sem I_3^- , o ferro(III), no experimento 20, possivelmente é gerado por outro caminho. Os experimentos 19 e 20 foram repetidos usando acetonitrila ao invés de metanol como solvente (experimentos 21 e 22), resultando em espectros semelhantes. No entanto, o experimento 22 não gerou a espécie FeI_4^- . Neste caso parece que o responsável pela oxidação do Fe(II) a Fe(III) é o metanol.

A especiação de complexos metálicos simples é dificultada devido aos diferentes parâmetros existentes na transferência das espécies para a fase gasosa. Sendo a principal causa a densidade de carga nas espécies. Muitos complexos não conseguem estabilizar a densidade de carga devido à perda da camada de solvatação, durante o processo de evaporação da gota. Este é o caso, por exemplo, do ferrocianeto e ferricianeto. Nos espectros obtidos destes sais não se observa os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Um outro exemplo é o complexo de Co-EDTA, que devido a falta de insaturações não consegue estabilizar a carga e sofre dissociação.

Figura 2.22. Espectros obtidos a partir de solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de FeSO_4 e 1 mmol/L de NaI em água:metanol (1+99) a- metanol. b-acetonitrila e c- água.

2.2.5 Complexos de cianetos

Na presença de excesso de iodeto, cobre(I) e ferro(II) são largamente favorecidos na fase aquosa. Por outro lado, oxigênio dissolvido na solução favorecem $\text{Cu}(\text{II})$ e $\text{Fe}(\text{III})$. Além disto, não há conhecimento preciso da esfera de coordenação durante o processo de electrospray. Estas incertezas conduziram a outros dois complexos como provas para tentar entender melhor estes fenômenos.

Decidiu-se usar os íons ferrocianeto e ferricianeto porque: (1) os seis sítios de coordenação estão ocupados pelo cianeto, (2) os complexos são muito estáveis e inertes, (3) o complexo com ferro(II) é facilmente mantido em solução e (4) o ligante não é oxidante nem redutor.

Um conjunto de espectros de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em água:metanol é mostrado nas Figuras 2.24 e 2.25. Surpreendentemente, os espectros são muito similares nas mesmas tensões de cone. Complexos de ferro, $[\text{Fe}(\text{CN})_x]^{n-}$, com o metal nos estados de oxidação (I), (II), (III) e (IV) foram observados independente do estado de oxidação inicial. Nota-se que o *cluster* em m/z 108, que corresponde ao complexo de ferro(I) $[\text{Fe}(\text{CN})_2]^-$, é formado somente em altas tensões de cone, provavelmente devido a CID (Figura 2.26). Complexos duplamente carregados foram observados para baixas tensões de cone.

Os espectros obtidos a 10 V mostram *clusters* a 80 e 106 u, o que corresponde a $[\text{Fe}(\text{CN})_4]^{2-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{2-}$, respectivamente. Estes complexos apresentaram o padrão isotópico esperado para o ferro, mas com separação de picos indicando íons dupla carga. Os mesmos resultados foram obtidos quando o solvente utilizado foi acetonitrila.

A primeira hipótese sobre a similaridade dos espectros foi que os sais estavam sendo interconvertidos antes da injeção no espectrômetro de massas. Todavia, as soluções foram testadas por voltametria e espectrofotometria e não indicaram significativa interconversão entre as espécies em solução. Outra hipótese seria a interconversão nas etapas finais da formação do íon na fase gasosa.

Levando em consideração a tendência do electrospray em gerar íons com baixa densidade de carga, o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ poderia perder um elétron para uma molécula de solvente nos estágios finais de dessolvatação, assim formando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Como estas espécies não são observadas no espectro de massas não é possível concluir se estas etapas estariam realmente ocorrendo antes da perda de um ou mais ligantes cianetos.

De qualquer forma, este processo poderia explicar porque os espectros de ambas as espécies são tão similares na mesma tensão do cone de amostragem. A Figura 2.27 mostra um esquema que tenta explicar as reações que podem estar ocorrendo para conduzir às espécies observadas.

Figura 2.24. Espectros de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em metanol :água:(99+1). Variando as tensões no cone de amostragem a. 50 V, b. 30 V, c. 20 V, d. 15 V, e. 10 V.

Figura 2.25. Espectros de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em metanol :água:(99+1). Variando as tensões no cone de amostragem a. 50 V, b. 30 V, c. 20 V, d. 15 V, e. 10 V.

Figura 2.26. Formação das espécies de ferricianeto variando a tensão do cone –a $\blacktriangle$ $[\text{Fe}(\text{CN})_3]^-$, $\bullet$ $[\text{Fe}(\text{CN})_2]^-$, $\blacktriangledown$ $[\text{Fe}(\text{CN})_4]^-$, $\blacksquare$ $[\text{Fe}(\text{CN})_4]^{2-}$. b – região ampliada do gráfico a.

Figura 2.27. Mecanismo proposto para a formação de alguns íons nos experimentos 22 a 25. Espécies A e A⁻ representam a forma neutra e a forma reduzida da molécula de solvente, respectivamente. A primeira etapa seria a responsável pela conversão do Fe(II) a Fe(III).

2.2.6 Complexos com fluoreto

Os experimentos 6 e 27 da Tabela 2.3 (Figura 2.28) foram obtidos em condições semelhantes usando diferentes complexantes, o iodeto e o fluoreto, respectivamente. Os principais íons formados foram: $\text{Co}(\text{NO}_3)_n\text{I}_m^-$ e $\text{Co}(\text{NO}_3)_n\text{F}_m^-$, com n e m variando de 1 até 3. O mesmo comportamento foi observado para ferro e níquel (experimentos 28 a 30). Uma desvantagem do complexo formado com fluoreto é a maior probabilidade de interferência isobárica devido à baixa massa e a baixa intensidade das espécies geradas.

Os espectros obtidos nos experimentos 28 e 29 do ferro são bastante complexos. Na região da espécie FeF_2^- , m/z 94, ocorre a formação de outras espécies como $[\text{NaF}_2\text{CH}_3\text{OH}]^-$ em m/z 93 e $[\text{NO}_3\text{CH}_3\text{OH}]^-$ em m/z 94 e na região da espécie FeI_3^- também há uma série de picos que não foram identificadas. Além disto, este *cluster* tem intensidade baixa. No caso do níquel o complexo com o fluoreto forneceu picos mais intensos, inclusive uma série de complexos de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_n\text{F}_m^-$, onde n e m variam de 1 até 3.

O aumento da concentração do fluoreto não aumenta a intensidade dos seus complexos formados. Foi possível observar que tanto o íon fluoreto como seus complexos não são tão suscetíveis a passarem para fase gasosa como os ânions nitrato, cloreto e iodeto e seus complexos. Estes ânions devem ser evitados na solução para se obter complexos de fluoreto com boa intensidade e livre de interferência isobárica.

Os experimentos 32 e 34, envolvendo uma mistura dos ligantes cloreto e fluoreto, competindo pelo metal, mostra que o zinco e o cádmio têm maior afinidade pelo cloreto. As espécies MF_3^- foram obtidas, mas com baixa intensidade e identificadas devido ao padrão isotópico do zinco e cádmio que são bem característicos.

Boro não forma complexos com iodeto nem com o nitrato, mas forma com o fluoreto. O espectro da solução de NaBF_4 apresenta essencialmente somente dois *clusters* (experimento 36), ambos com BF_4^- . Este íon tem baixa reatividade o que explica a estabilidade obtida no espectro. Os íons em m/z 86 e 87 correspondem a $^{10}\text{BF}_4^-$ e $^{11}\text{BF}_4^-$ e podem ser usados como uma alternativa para determinar a razão isotópica do boro. A obtenção de espectros extremamente estáveis e picos do íon BF_4^- com intensidades altas, mesmo com baixas concentrações do sal de boro (1 $\mu\text{mol/L}$), nos instigou a usar esta espécie e propor um método para determinação do boro usando a técnica de electrospray.

Figura 2.28. a- Espectro obtido de uma solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L NaI em metanol: água (99+1), b- solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ e 1 mmol/L NaF em metanol: água (99+1).

2.2.7 Complexos com cloreto

Os espectros obtidos com os metais complexados com cloreto mostraram a formação de espécies similares às obtidas com iodeto e fluoreto (Experimentos de 30 a 34) e as intensidades dos picos são similares àquelas dos complexos com iodeto.

Embora os complexos com cloreto sejam no geral livres de interferência isobárica e os picos com boa intensidade, os *clusters* representam a soma de picos dos vários núclídeos de cada elemento formando o íon. Assim sendo, não são diretamente aplicáveis a determinações isotópicas. Existe uma série de procedimentos matemáticos que resolve o padrão isotópico de

cada elemento num íon, como por exemplo o cloro na espécie AuCl_4^- , através da deconvolução do picos [55].

Embora o cloreto não seja redutor, o espectro da solução de cobre(II) com cloreto mostra um complexo de cobre(I), experimento 31, que poderia ser explicado por CID. Novamente complexos com uma única carga são preferencialmente formados na fase gasosa.

Considerando os experimentos de cobre com iodeto e cloreto, experimentos 11 e 31, o esquema mostrado na Fig 2.29 pode ser proposto. Tanto o cobre(I) como o cobre(II) poderiam existir na fase líquida, sendo transferidos para a fase gasosa por electrospray. Uma vez na fase gasosa somente a redução do Cu(II), perdendo um iodeto ou um cloreto por CID, poderia ocorrer.

Para o ferro o esquema é basicamente o mesmo, mas com uma possível rota do ferro(II) na fase líquida para ferro(III) na fase gasosa. Esta rota seria somente possível na presença de solventes próticos.

2.2.8 Conclusões

O sistema de injeção construído no laboratório mostrou-se tão eficiente quanto a bomba de motor de passo da Harvard Apparatus, com a vantagem de ter um custo pequeno e ser de fácil construção.

De um modo geral, os espectros obtidos no modo íon negativos são mais simples, isto é, um menor número de *clusters* com o solvente e eletrólitos são formados. Os *clusters* MI_n^- são menos influenciáveis pelas variações na fonte do que as espécies positivas, M^+ e MI_n^+ . Isto porque, no geral, as espécies MI_n^- são formadas na fase aquosa e simplesmente transferidas para a fase gasosa, já as espécies MI^+ e M^+ são formadas na fase gasosa e são mais susceptíveis as mudanças dos parâmetros da fonte de ionização.

A principal tendência observada para metais e boro complexados com halogenetos e cianeto foi a formação de íons com uma única carga. Para o cobre e ferro esta tendência é mais pronunciada, tanto que complexos de cobre(I), cobre(II) e ferro(II), ferro(III) são facilmente formados.

Para evitar a ocorrência de descarga corona, a tensão aplicada ao capilar deve ser menor que 2500 V e para evitar a dissociação induzida por colisão, a tensão aplicada no cone de amostragem deve estar entre 10 e 20 V. No geral, as espécies obtidas em baixas tensões do cone foram as espécies formadas em solução.

A especiação de complexos pequenos através de ES-MS é dificultada devido a (1) espécies diferentes do analito na solução, que podem agir como agente oxidante ou redutor, e (2) variações das tensões no cone de amostragem e do capilar, da vazão do gás nebulizante e secante, que podem favorecer a ionização de diferentes espécies.

A análise quantitativa também fica comprometida por estes fatores e principalmente devido à supressão do íon de interesse pela competição entre as várias espécies na gota. A quantificação somente é possível sobre controle rigoroso das concentrações das outras espécies.

Capítulo 3

Medidas Isotópicas

Neste capítulo é avaliada a potencialidade da espectrometria de massas com ionização por electrospray para medidas isotópicas.

São apresentados estudos sobre a estabilidade da medida da razão isotópica com o tempo de varredura e a possibilidade de se utilizar padrões internos para correção de discriminação de massas.

3.1 Parte Experimental

3.1.1 Parâmetros do espectrômetro de massas.

Os espectros foram obtidos ajustando os parâmetros da fonte de electrospray em condições brandas.

As tensões alcançaram de 1500 a 1700 V para o capilar, de 200 a 300 V para o contra eletrodo, e de 15 a 25 V para o cone de amostragem. O *Skimmer* e o fotomultiplicador foram ajustados a 5 V e 800 V, respectivamente. As vazões de nitrogênio nebulizante e secante foram ajustadas de 10 a 20 L/h e de 100 a 200 L/h, respectivamente

Para os experimentos investigativos o equipamento foi operado no modo de varredura e para medidas isotópicas no modo monitoramento de íons selecionados (SIM).

Foram realizados experimentos variando as tensões no cone de amostragem, contra-eletrodo e multiplicador, para avaliar a discriminação instrumental de massas nas medidas isotópicas de cobre e zinco. Os clusters CuI_3^- e ZnI_3^- foram monitorados usando 8 canais (442 a 448 u) durante 10 min e o tempo de residência em cada canal foi de 80 ms.

O estudo da estabilidade do sinal foi realizado com os clusters BF_4^- e CdI_3^- . Para o íon BF_4^- foram monitorados 7 íons (m/z 83 a 89) durante 30 min e o tempo de residência em cada íon foi de 80 ms. Para o íon CdI_3^- - 9 íons (m/z 482 a 500) foram monitorados durante 5 min, usando um tempo de residência de 40 ms para cada íon.

Os valores de m/z relatados são nominais. Para fins de aquisição de dados, o valor de m/z correspondente ao máximo de intensidade do cluster foi considerado e incrementos ou decrementos inteiros de m/z a partir deste.

3.1.2 Reagentes

As soluções estoques foram preparadas dissolvendo os sais dos metais (nitratos, sulfatos e cloretos) em água deionizada em concentração de 10 mmol/L.

Solução estoque de 0,1 mol/L de ácido bórico NIST -SRM 951 ou 1000 mg/L de boro foi preparada pesando-se 0,618 g de ácido bórico e completou-se o volume a 100 mL. A conversão do borato a tetrafluoroborato foi feita com uma solução de 10 mmol/L de ácido bórico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) com excesso de ácido fluorídrico 10 mol/L (Merck), em meio aquoso deixado por 24 horas, para garantir a conversão. O pH da solução foi ajustado com NH_4OH .

3.2 Resultados e Discussões

3.2.1 Estabilidade da razão medida

Uma condição fundamental para medidas isotópicas é que as intensidades relativas dos *clusters* dos picos sejam estáveis. A Figura 3.1 mostra as intensidades dos picos e as razões de $^{10}\text{BF}_4^- / ^{11}\text{BF}_4^-$ e $^{112}\text{CdI}_3^- / ^{114}\text{CdI}_3^-$ em função do tempo. As condições foram as mesmas dos experimentos 36 e 4 (capítulo 2) e a aquisição de dados foi feita no modo registro de íons selecionados, SIR. Em ambos os casos, o número de canais selecionados foi superior àquele necessário para medida das razões: sete canais para o BF_4^- (m/z 83 a 89) e 9 canais para o íon CdI_3^- (m/z 482 a 500). Este procedimento foi feito para monitorarmos a linha base e o aparecimento de novos picos (devido à descarga corona, por exemplo).

No caso do boro, uma aquisição durante um longo período mostrou algumas regiões de instabilidade na produção dos íons. Porém, a razão isotópica permaneceu constante. Pode-se observar que a intensidade do íon em m/z 86 diminui por um curto período com 27 min de aquisição, provavelmente devido à descarga corona ou um outro evento momentâneo. Desta forma torna-se necessária uma estatística robusta que elimine fenômenos como este.

Para o cádmio (Figura 3.1 d e e), os dados mostram uma tendência nas intensidades dos picos, mas sem efeito sobre a razão isotópica (Figura 3.1 f). Mesmo com a mudança abrupta com

Figura. 3.1. a e b mostram as intensidades dos íons 86 ($^{10}\text{BF}_4^-$) e 87 ($^{11}\text{BF}_4^-$), respectivamente e c a razão de ($^{10}\text{BF}_4^- / ^{11}\text{BF}_4^-$). d e e mostram as intensidades de ($^{113}\text{CdI}_3^-$) e 87 ($^{114}\text{CdI}_3^-$), respectivamente e f a razão de ($^{113}\text{CdI}_3^- / ^{114}\text{CdI}_3^-$).

4 min de aquisição a razão isotópica não se alterou. Estes experimentos com boro foram realizados com o material certificado ácido bórico NIST-SRM 951. A razão certificada de $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ é de $0,2473 \pm 0,0002$, e a razão experimental obtida para uma aquisição de 30 minutos (1632 varreduras sobre 7 canais) foi de $0,2427 \pm 0,0002$.

O histograma (Figura 3.2) da razão experimental parece apresentar uma distribuição normal, quando o *spike* em 27 min é rejeitado. No entanto, aplicando-se teste de ajustes de distribuição, estes mostram que existe uma certa assimetria nos dados gerados.

O teste do Chi-quadrado para um intervalo de confiança de 95 %, com um grau de liberdade igual a 17, fornece o valor tabelado de 27 e o valor obtido para os dados experimentais foi de 344. Este deveria ser menor para não se rejeitar a hipótese de uma distribuição normal [56].

Dois outros testes, o de Kurtosis e o de *Skewness*, também mostraram que a distribuição apresenta uma assimetria. No teste de *Skewness*, quando o valor gerado pelos dados experimentais é zero, a distribuição é normal; quando é positivo, a distribuição tende para o lado positivo da curva e quando é negativo, no sentido negativo da curva.

Já o teste de Kurtosis quando o valor gerado é 0, a distribuição é normal, quando é positivo, a distribuição apresenta uma forma mais pontiaguda e quando é negativo, uma forma mais planar[56].

Figura 3.2. Histograma da razão de ($^{10}\text{BF}_4^-$ / $^{11}\text{BF}_4^-$) descartando o *spike* em 27 min..

Aplicando estes dois testes a distribuição da figura 3.2 os valores obtidos foram, para o skewness foi de 2,337 e para o de Kurtosis o valor foi de 29,282. Os quais confirmam a forma do

histograma. Este apresenta uma característica mais pontiaguda e uma queda brusca nos dados do lado positivo da curva. (Os testes estatísticos foram feitos no software Mathcad 8.0 da Mathsoft)

A falta de um comportamento normal dos dados na espectrometria de massas não é surpreendente. Isto se deve ao fato da contagem dos íons no detector obedecer a distribuição de Poisson, que apresenta uma tendência na curva de distribuição para o lado positivo. Além disto, uma distribuição normal requer dados homoscedásticos, isto é, o desvio padrão da medida não deve variar com a intensidade. O que não é o caso, a Figura 3.3 mostra um comportamento heteroscedástico do desvio padrão com a intensidade.

Dados homoscedásticos são dados cujos erros das medidas não aumentam com a intensidade do sinal. Dados que apresentam este comportamento têm seus desvios sendo influenciados principalmente pela parte eletrônica, como a emissão termiônica no multiplicador de elétrons, entre outros fatores. Estes fatores não são proporcionais a intensidade do pico. Porém, os desvios devido à variação da corrente do filamento, a pressão na câmara de ionização, as mudanças nos potenciais dentro da fonte, a contagem dos íons na fotomultiplicadora, a variação do ganho, na medida do pico, na conversão A/D não são constantes e crescem com a intensidade sinal [57].

Figura 3.3. Comportamento heteroscedástico dos dados.

3.2.2 Tratamento de Dados e Aquisição.

As medidas foram obtidas com o instrumento ajustado com resolução de linha base entre massas adjacentes.

Embora descarga corona não seja um evento muito freqüente em electrospray ela ocorre e muda drasticamente a forma do espectro. Como resultado, este evento pode comprometer a eficiência da aquisição de dados durante períodos longos, que são usados justamente para melhorar a precisão. Esta perda de precisão ocorre porque a média aritmética é geralmente escolhida como estimativa para a tendência central dos dados.

Os resultados mostrados no item anterior mostraram que há necessidade de uma estatística robusta. A mediana pode ser uma boa ferramenta para estimar a tendência central dos dados, porque *spikes* e *outliers* têm pouco ou nenhum efeito sobre ela.

Além disso, *outliers* também distorcem o desvio padrão. Assim, a mediana dos desvios absolutos (MAD) é o melhor modo de estimar a tendência central para dados que apresentam dispersão [58].

$$MAD = \underset{j=1,\dots,N}{\text{median}} \left(x_j - \underset{i=1,\dots,N}{\text{median}}(x_i) \right) \quad (3.1)$$

onde N é o tamanho do conjunto de dados (número de varreduras neste caso). Estimativas robustas do desvio padrão (s) e desvio padrão da média (s_M) podem ser obtidas através de $1,483 \cdot MAD$ e $1,483 \cdot MAD/N^{1/2}$, respectivamente [58].

Um exemplo bastante simples mostra o poder da mediana para resolver problemas com *outliers*. Suponha que temos 5 medidas de concentração: 5,59, 5,66, 5,63, 55,7, 5,60. A média seria 15,61. A mediana, quando o número de dados é par, é o valor central, quando o número de dados é ímpar é a média de dois valores centrais. Para este conjunto de dados a mediana seria 5,63 que é um valor bem mais razoável do que o fornecido pela média.

Os dados foram tratados usando um software desenvolvido no laboratório pelo aluno de doutorado José Geraldo Alves Brito Neto [55], no qual os dados são convertidos da forma *raw* para a forma *dat* e a linha base é subtraída dos dados. A razão isotópica é calculada para cada espectro, e a mediana da razão isotópica e o MAD são calculados usando uma planilha elaborada no Mathcad 8.0, que está anexada no final da tese.

3.2.3 Padrão Interno Zinco e Cobre

Nos estudos anteriores, os espectros de uma solução metanólica de cobre com iodeto mostraram que o íon CuI_2^- é o mais abundante no espectro de massas. Todavia outro *cluster* com cobre e iodeto foi formado, CuI_3^- . Uma importante consequência deste fenômeno é a possibilidade de usar cobre como padrão interno para determinações isotópicas do zinco e vice-versa, porque os íons CuI_3^- e ZnI_3^- apresentam valores de m/z próximos sem interferência isobárica mútua.

Os experimentos para avaliar a influência dos parâmetros experimentais foram conduzidos no modo SIR. As razões isotópicas de $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$, $^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$, $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, e $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ foram obtidas dos *clusters* CuI_3^- e ZnI_3^- . Os resultados sugerem que há uma tendência da razão isotópica com a tensões aplicadas no eletrodo, multiplicador e cone de amostragem.

A Figura 3.4 mostra o espectro de uma solução 500 $\mu\text{mol/L}$ de CuCl_2 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de ZnCl_2 e 3 mmol/L de iodeto de sódio na região de massa de 100 a 500 u.

Figura 3.4. Espectro de uma solução de 500 $\mu\text{mol/L}$ de CuCl_2 , 100 $\mu\text{mol/L}$ de ZnCl_2 3 mmol/L NaI em metanol:água (99+1) mostrando os *clusters* CuI_3^- , CuI_2^- e ZnI_3^- .

Os sais de cloreto foram escolhidos porque nitrato e sulfato apresentaram interferência isobárica devido à formação das espécies $[\text{MI}_2\text{NO}_3(\text{CH}_3\text{OH})_2]^-$ e $[\text{MI}_2\text{HSO}_4\text{CH}_3\text{OH}]^-$, onde M é o metal. O metanol foi o melhor solvente porque em acetonitrila não foi observada a espécie CuI_3^- , como discutido no capítulo anterior, e água requer maiores tensões no capilar, o que pode provocar descarga corona. A proporção usada de (5:1 Cu: Zn) permite obter os *clusters* CuI_3^- e ZnI_3^- com intensidades similares.

Os resultados obtidos, Figura 3.4, sugerem que há uma dependência da razão isotópica com as tensões aplicadas ao cone de amostragem, capilar e multiplicador. As condições de trabalho ideais encontradas para as medidas foram: multiplicador acima de 800 V, tensão do capilar entre 1800 a 2000 V e cone de amostragem a 14 ou 15 V.

Abaixo de 800 V a sensibilidade do detector é mais dependente da tensão aplicada e é mais sentida pelos isótopos mais leves. Nos estudos anteriores já tínhamos observado que o íon CuI_3^- parece sofrer dissociação induzida por colisão que ocorre na região entre o *skimmer* e o cone de amostragem.

Embora, haja discriminação de massas, as razões citadas mostram correlação quando os parâmetros da fonte foram variados, o que é essencial para podermos aplicar a técnica de padrão interno.

A Figura 3.6 mostra a correlação entre os dados da Figura 3.5. Os coeficientes de correlação obtidos para 3.5a, b e c foram, respectivamente, 0,975, 0,976 e 0,945. Considerando-se o número de pontos, pode-se afirmar com um nível de confiança de 95 % que há correlação entre os resultados.

Figura 3.5. Influência dos parâmetros do electrospray na razão isotópica

Figura 3.6. Correlação entre as razões de $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ e $^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ variando os parâmetros da fonte. a- tensão do capilar, b- tensão do cone de amostragem, c- tensão de multiplicador.

Sem qualquer tipo de correção, a razão isotópica obtida para $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ foi de $2,285 \pm 0,002$ varrendo 6 canais (442 até 448 u) durante 40 min. Para o mesmo conjunto de dados, a razão isotópica obtida para $^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ foi $1,823 \pm 0,001$. Ambos os valores são maiores que os respectivos valores naturais $2,244 \pm 0,003$ e $1,74 \pm 0,02$, o que poderia ser explicado devido à discriminação instrumental de massas. Todavia, estatisticamente, não há nenhuma diferença significativa entre as razões. $(^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu})/(^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn})$, o que indica que o padrão interno pode ser usado neste caso.

3.4 Conclusões

O uso do ES-MS no modo íons negativos para medidas isotópicas pode ser uma boa alternativa a TIMS e ICP-MS.

A corrente iônica varia com tempo de aquisição longos, mas a razão isotópica permanece constante. Isto é um fator importante para medidas de razão isotópica, porque permite o uso de material isotopicamente certificado para calibração do equipamento usando amostras injetadas sequencialmente.

É claro que mais estudos são necessários para certificar-se da eficiência da técnica. Como: estudos sobre interferência isobárica, discriminação instrumental de massas e fracionamento isotópico.

Os estudos de padrão interno entre zinco e cobre mostram claramente que para cada estudo sendo realizado no electrospray haverá uma série de detalhes a serem estudados e ajustados. No caso do *cluster* de ZnI_3^- e CuI_3^- a razão atômica de (5:1 Cu:Zn) permite obter os dois *clusters* com intensidades similares.

Um grande excesso de iodeto deve ser evitado porque as espécies I^- , I_3^- e NaI_2^- são favorecidas, suprimindo os *clusters* CuI_3^- e ZnI_3^- . Metanol é o solvente mais apropriado para formar o íon CuI_3^- , porque esta espécie não é observada em acetonitrila, e água como solvente requer tensões altas no capilar, o que aumenta os riscos de ocorrer descarga corona.

A solução deve estar livre de NO_3^- e SO_4^{2-} , porque estes íons produzem interferência isobárica. Os *clusters* de cobre e zinco parecem sofrer influência das tensões aplicadas na fonte. O espectro deve ser obtido com a tensão no cone de amostragem inferior a 15 V, porque CuI_3^- sofre fragmentação por CID gerando CuI_2^- .

Os valores de razões obtidos não foram corrigidos em relação a um padrão certificado. No entanto, considerando esses valores, pode-se afirmar que é possível usar o método do padrão interno para correção de discriminação de massas na técnica de electrospray massa.

A fonte de electrospray pode provocar mudanças drásticas na forma do espectro devido à ocorrência de descarga corona. Além deste, outros fatores podem levar a produção de *spikes* e *outliers*, como interrupções abruptas no fluxo de amostra. A mediana e o MAD mostraram-se bastante adequados para minimizar efeitos de descarga corona e outras fontes de *spikes*.

Capítulo 4

Medidas Isotópicas para Boro por ES-MS

O íon tetrafluoroborato é bastante estável e facilmente transferido para a fase gasosa por electrospray. Assim sendo, é uma espécie bastante adequada para a avaliação da potencialidade da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray nos estudos da razão isotópica do boro.

Neste capítulo são apresentados estudos realizados sobre a influência dos parâmetros instrumentais sobre o espectro do íon BF_4^- , estudos sobre sua estabilidade na fase aquosa e gasosa e estudos sobre o efeito de memória.

4.1 Parte Experimental

4.1.1. Sistema de injeção e sonda da fonte de electrospray.

O sistema de injeção por gravidade, como mostrado anteriormente, funciona tão bem quanto a bomba com motor de passo da Harvard Apparatus. No entanto, há um inconveniente que é a manipulação do sistema, um pouco trabalhosa.

Um novo sistema de pressurização (Figura 4.1), mais robusto, foi desenvolvido. Na tampa de um frasco de polietileno (1mL) foi conectada uma agulha (tipo cateter d.i. 1,70 mm e comprimento de 50 mm), pela qual o capilar passa. Aproximadamente 5 mm deste frasco foi inserido dentro de um suporte cilíndrico e oco de PVC. Neste está conectado um tubo de nylon (d.e. 1/16") que perfura o frasco e pressuriza o sistema com gás hélio. A vedação do frasco foi feita preenchendo o cilindro de PVC com resina de poliéster isoftálica.

O novo sistema tem a vantagem do controle da vazão da amostra ser mais fácil. No entanto, após aproximadamente três meses começou a apresentar vazamentos na tampa. A resina utilizada não suportou a agressividade dos vapores de solvente utilizados e a pressão exercida. Além disto, o capilar fica exposto e pode ser facilmente danificado. Assim, decidiu-se por elaborar um sistema que minimizasse problemas com vazamentos e evitasse ao máximo o contato do usuário com o capilar e a sonda.

O novo sistema é mostrado na Figura 4.2. A sonda é praticamente a mesma, manufaturada totalmente em PVC. As conexões para os tubos dos gases e para o capilar foram montadas com

juntas de latão, minimizando o uso de resinas. O sistema de injeção para pressurização foi feito em acrílico.

Esse novo sistema apresenta as seguintes vantagens em relação aos anteriores: (1) o capilar fica isolado do contato com o usuário, (2) menor quantidade de amostra (o frasco é de 500 μL) e (3) melhor eficiência de pressurização, uma vez que a vedação é feita através da pressão de peças parafusadas e vedadas por anéis o'ring. A grande vantagem é que qualquer problema de vazamento é facilmente resolvido trocando-se os o'rings.

Figura 4.2. Sonda e sistema de injeção para o electrospray massa.

4.1.2 Reagentes

As soluções foram preparadas usando como solvente metanol e acetonitrila (Omnisolv, Gibbstown, New Jersey) ou água deionizada. NH_4OH da Merck e NaBr da Baker Analyzed foram usados como recebidos.

A conversão do borato a tetrafluorborato foi feita com uma solução de 10 mmol/L de ácido bórico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) com excesso de ácido fluorídrico 10 mol/L (Merck, Rio de Janeiro, R.J.), em meio aquoso deixado por 1 hora, para garantir a conversão. O pH da solução foi ajustado com NH_4OH . A solução de BF_4^- , em meio aquoso, era usada somente

no dia de preparo da solução. Em meio metanólico, a solução era armazenada no máximo por duas semanas na geladeira.

As soluções enriquecidas de boro foram preparadas a partir de compostos adquiridos da NIST e da Sigma-Aldrich. Solução estoque de 0,1 mol/L de Ácido bórico NIST SRM 951 ou 1000 mg/L de boro foi preparada pesando 0,618 g de ácido bórico e completando o volume a 100 mL. Solução estoque 0,1 mol/L de ácido bórico enriquecido para 99% em boro 10 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) foi preparada pesando 0,6104 g deste e diluída a 100 mL. Solução estoque 0,1 mol/L de ácido bórico NIST SRM 952 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) foi preparada pesando-se 0,612 g deste e diluída a 100 mL. A Tabela 4.1 mostra as abundâncias isotópicas de cada um destes compostos. O ácido bórico enriquecido da Sigma-Aldrich foi certificado usando o ácido bórico da SRM 951-NIST, o valor obtido foi de 99,07 % de ^{10}B e 0,93 % de ^{11}B e $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ de $106,4 \pm 0,8$.

Tabela 4.1. Abundâncias isotópicas do material certificado e enriquecido utilizado no trabalho.*

isótopo	ácido bórico SRM 951 – NIST.	$\text{H}_3^{10}\text{BO}_3$ (99 % átomo Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA).	ácido bórico, 95% enriquecido em ^{10}B , SRM 952 – NIST
^{10}B	$19,827 \pm 0,013$	99,43	$94,949 \pm 0,005$
^{11}B	$80,173 \pm 0,013$	0,57	$5,051 \pm 0,005$

* Abundâncias fornecidas pelos fabricantes.

4.2 Resultados e Discussões

A escolha da espécie BF_4^- para estudar o padrão isotópico do boro não foi por acaso. Foram feitos estudos com outros compostos de boro como ácido bórico e borato de metila. No entanto, o íon $\text{B}(\text{OH})_4^-$ não é facilmente formado na fase gasosa, por outro lado, uma solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 em metanol forneceu espectros onde dois *clusters* de picos, contendo o íon BF_4^- , podem ser observados (Figura 4.3). O íon BF_4^- (86 u a 87 u) e o íon $\text{Na}(\text{BF}_4)_2^-$ (196 a 198 u).

Um conjunto de espectros de uma solução de NaBF_4 foi obtido variando as tensões no cone de amostragem (10 a 50 V), no capilar (1500 a 3500 V), e no contra eletrodo (250 a 500 V) e nenhuma outra espécie foi observada.

Figura 4.3. Espectro de uma solução de 100 µmol/L tetrafluoroborato de sódio em metanol.

4.2.1 Efeito de Memória

Após a limpeza da fonte do electrospray, 86 e 87 u apresentavam sinais no nível do *background* quando metanol foi introduzido no electrospray. Todavia, um significativo efeito de memória é observado depois de alguns minutos de fluxo de solução de NaBF_4 .

Determinação isotópica do boro, seja na forma de borato ou tetrafluoroborato, por espectrometria de massas tem uma grande limitação, que é um forte efeito de memória [59, 60]. Este efeito foi notado desde os primeiros estudos com boro por espectrometria de massas, usando a espécie BF_3 , com fonte de ionização por impacto de elétrons [61]. Diferentes procedimentos para minimizar o efeito de memória do boro, em ICP-MS, foram avaliados. Alguns autores propuseram o uso de fluoreto de sódio, Triton X-100, amônia e manitol como soluções de limpeza. Estes pesquisadores mostraram que o complexo formado por exemplo, entre o íon fluoreto ou manitol com o boro diminuía o tempo de limpeza necessário para eliminar o boro residual [59, 60, 62, 63]. Um outro procedimento envolve a mudança do sistema de nebulização, Houk [64] mostrou que o uso de um nebulizador de injeção direta (DIN) leva a uma diminuição considerável do tempo de limpeza, devido ao menor volume de amostra injetado, 100µl/min. Além disto, a amostra é levada até a ponta da tocha pelo capilar evitando o contato com o suporte de quartzo, que é o principal causador do efeito de memória.

Todavia, para conseguir eliminar o boro residual eficientemente da fonte, é necessário entender os processos físicos e químicos que estão causando o efeito de memória. No caso do ES-MS o processo de formação do resíduo de boro é diferente do que ocorre em ICP-MS, por exemplo.

No processo de formação dos íons, a maior parte das gotas formadas colide com o contra eletrodo e o cone de amostragem. Após a evaporação do solvente, este processo acaba provocando a formação de uma camada de sal, principalmente no contra eletrodo. Para resolver este problema um contra-eletrodo do tipo *cross-flow* foi manufaturado (Figura 4.4b) para substituir o contra eletrodo de tipo *pepper-pot* e um procedimento de limpeza foi desenvolvido.

A vantagem do contra-eletrodo do tipo *cross-flow* é que a maior parte da deposição ocorre fora do canal de fluxo. Assim sendo, há menos deposição no cone de amostragem e a limpeza do *cross-flow* é mais eficiente. Este novo contra eletrodo minimiza o efeito de memória mas não o elimina. Assim, procedimentos de limpeza foram estudados com diferentes substâncias.

Figura 4.4. a- contra eletrodo modelo *pepper-pot*, b- contra eletrodo modelo *cross-flow*.

Foram testados compostos que poderiam formar sais não voláteis ou complexos com o boro, como manitol, amônia e Triton X-100.

O fluxo de uma solução 1 mmol/L de amônia diminuiu o tempo necessário para limpeza, mas ainda permaneceu indesejavelmente longo. Manitol e Triton X-100 mostraram melhores resultados. A Figura 4.5 mostra o sinal de $^{11}\text{BF}_4^-$ depois de um fluxo de uma solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de boro seguido por três procedimentos de limpeza: somente metanol, 1 mmol/L de manitol em metanol e 0,25 % de Triton X-100 em metanol.

Quando somente metanol é nebulizado, o sinal exibe uma rápida queda. Todavia, este período é seguido por um longo ciclo de limpeza até o sinal alcançar o nível de background. Quando manitol ou Triton X-100 são utilizados o tempo de lavagem cai para 100 segundos. Após a lavagem com Manitol ou Triton X-100, metanol pode ser introduzido novamente sem significativo aumento do nível do sinal do boro. No entanto, após alguns ciclos de medidas e limpeza, o contra eletrodo deve ser desmontado e cuidadosamente limpo com água e metanol em banho de ultra-som.

No caso de uma solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 em metanol, é possível fazer em torno de 20 a 30 minutos de aquisição sem ter que limpar o contra-eletrodo.

Figura 4.5. O sinal de m/z 87 depois do fluxo de 100- $\mu\text{mol/L}$ NaBF_4 seguido por três procedimentos de limpeza + 1-mmol/L manitol, $\circ$ 0,25 % Triton X-100 em metanol, $\blacktriangle$ metanol.

Embora alguns autores relacionem a ação supressora do manitol sobre o boro com a formação de um complexo [59,60]. No caso do electrospray, a retenção do efeito de memória de íon BF_4^- não ocorre necessariamente pela formação de um complexo, mas pela deposição de uma camada sólida do manitol sobre o resíduo de boro no contra-eletrodo.

Para certificar se que o efeito de memória é provocado por deposição de material sólido sobre o contra-eletrodo, o mesmo experimento foi conduzido usando uma solução de cloreto e sulfato. A Figura 4.6a mostra as intensidades dos íons cloreto (m/z 35) e bissulfato (m/z 97) obtidas durante a injeção de uma solução de 100- $\mu\text{mol/L}$ de cloreto e sulfato em metanol:água (50+50). A Figura 4.6b mostra o processo de limpeza da fonte usando somente metanol. A Figura 4.6c mostra as intensidades dos picos 35 e 97 quando o processo de limpeza é feito usando uma solução de 1 mmol/L de manitol em metanol:água (50+50). Finalmente observando a Figura 4.6d é possível perceber que o sinal permanece no nível da linha base quando metanol é injetado, depois do processo de limpeza com manitol. Nós utilizamos metanol no último passo porque ele facilita o processo de ionização. A água diminui ainda mais o sinal. Isto significa que se um baixo sinal é obtido com o fluxo de metanol, o nível de background foi alcançado.

O processo de limpeza parece ser eficiente tanto para o cloreto, bissulfato e tetrafluoroborato. Como o manitol não complexa com os dois primeiros ânions, uma possível causa seria a formação de uma camada de proteção sobre o contra-eletrodo impedindo a re-dissolução e re-suspensão do material depositado.

4.2.2 Parâmetros Instrumentais e razão isotópica

A influência dos parâmetros da fonte sobre a estabilidade na medida da razão isotópica foi avaliada. Uma prática comum para melhorar a precisão de medidas isotópicas é integrar o sinal

relacionado ao isótopo menos abundante por um tempo maior. Assim, o desvio padrão relativo é mantido o mesmo para ambos isótopos, o que resulta em baixo desvio padrão da razão isotópica. No entanto, esta estratégia é fundamental apenas quando um dos isótopos é muito pouco abundante.

Na Figura 4.7 o tempo de leitura no íon de m/z 87 foi mantido constante em 80 ms.

Figura 4.7. A razão isotópica como função do tempo de leitura no íon de m/z 86. A razão no íon de m/z 87 foi mantida constante em 80 ms.

Aumentando o tempo de leitura no íon de m/z 86, a precisão não foi significativamente melhorada, provavelmente devido à alta abundância dos dois isótopos do boro e o considerável grau de heteroscedasticidade dos dados. Por outro lado, baixos tempos de leitura pioram a precisão e exatidão dos resultados. Devido a heteroscedasticidade dos dados, não é possível melhorar a precisão da medida do pico, com menor intensidade, aumentando o tempo de leitura neste íon. Porque, o desvio padrão da razão isotópica não diminui. O desvio final será muito mais influenciado pelas variações ocorrendo na fonte.

Como a abundância do boro em diferentes matrizes varia de forma significativa, o que requer otimizações frequentes, decidiu-se usar um tempo de leitura igual para os dois isótopos, 80 ms.

A influência da tensão aplicada ao capilar pode ser observada na Figura 4.8. Estatisticamente, não é possível detectar uma leitura sistemática da razão isotópica quando as tensões aplicadas na fonte e os fluxos dos gases de nebulização e secante foram variados. (Tabela 4.3). Todos os experimentos foram conduzidos ao acaso para evitar a influência de fatores dependentes do tempo.

Figura 4.8. Influência da variação da tensão aplicada no capilar na razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$.

Tabela 4.3. Avaliação da influência dos parâmetros da fonte do electrospray na razão isotópica do boro.

Cone de amostragem (v)	razão $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$	skimmer (V)	razão $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$	fotomultiplicadora (V)	razão $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$
15	0,2468 ± 0,0003	4	0,2462 ± 0,0003	600	0,2472 ± 0,0004
17	0,2463 ± 0,0002	5	0,2466 ± 0,0002	650	0,2475 ± 0,0002
18	0,2462 ± 0,0002	6	0,2463 ± 0,0002	700	0,2474 ± 0,0002
20	0,2465 ± 0,0002	7	0,2464 ± 0,0005	750	0,2478 ± 0,0002
21	0,2467 ± 0,0003	8	0,2464 ± 0,0005	800	0,2481 ± 0,0002
22	0,2463 ± 0,0002			850	0,2475 ± 0,0004
23	0,2460 ± 0,0003				
24	0,2462 ± 0,0003				
25	0,2464 ± 0,0002				

contra eletrodo (V)	razão $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$	fluxo do gás secante (L/h)	razão $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$
15	0,2469 ± 0,0004	100	0,2444 ± 0,0003
20	0,2469 ± 0,0003	150	0,2447 ± 0,0002
25	0,2471 ± 0,0003	200	0,2442 ± 0,0002
30	0,2472 ± 0,0003	250	0,2442 ± 0,0002
35	0,2474 ± 0,0003	300	0,2447 ± 0,0003

4.2.3 Correção da discriminação de massas

Embora estes resultados não mostrem significativa influência dos parâmetros da fonte e do detector sobre a razão isotópica, há uma significativa variação na razão isotópica. Não foi possível

identificar a origem de tal instabilidade. Desta forma, como em outras técnicas de espectrometria de massas uma correção baseada em um material isotopicamente certificado deve ser utilizada.

Os desvios de massas em um espectrômetro podem ser determinados e corrigidos pelo fator de discriminação de massas, f_{DM} [9, 12, 13].

$$f_{DM} = \frac{R_{CM}}{R_{CT}} \quad (4.1)$$

onde R_{CM} e R_{CT} são as razões medida e esperada de um material certificado. Neste estudo uma solução contendo tetrafluoroborato, convertido de uma solução de ácido bórico NIST 951, foi usada. A razão medida para a amostra (R_{SM}) é então dividida pelo fator, resultando na razão corrigida (R_{SC}).

Este procedimento foi repetido para cada amostra. A tabela 4.4 mostra os resultados obtidos para um conjunto de medidas para a mesma solução de BF_4^- com diferentes vazões do gás nebulizante e secante e posição da sonda. Para cada condição, a amostra e solução com 100 $\mu\text{mol/L}$ de boro certificado foram sucessivamente monitoradas por 5 minutos. Embora haja alguma discordância entre os valores de R_{SM} , nenhuma significativa diferença entre os valores de R_{SC} foi observada em um nível de confiança de 95 %. Para um período de 5 minutos de aquisição a precisão foi tipicamente de 0,4 %.

Tabela 4.4 – Razões isotópicas dos compostos de boro natural e certificado e razões corrigidas.

R_{CM}	f_{DM}	R_{SM}	R_{SC}
$0,2471 \pm 0,0001^*$	$0,9985 \pm 0,0003$	$0,2466 \pm 0,0001$	$0,2472 \pm 0,0001$
$0,2454 \pm 0,0001$	$0,9919 \pm 0,0004$	$0,24534 \pm 0,00006$	$0,2473 \pm 0,0001$
$0,2454 \pm 0,0001$	$0,9918 \pm 0,0004$	$0,24534 \pm 0,00006$	$0,2474 \pm 0,0001$
$0,2454 \pm 0,0001$	$0,9919 \pm 0,0005$	$0,24536 \pm 0,00006$	$0,2474 \pm 0,0001$

* Esta margem de erro corresponde a um desvio padrão.

O mesmo procedimento foi aplicado usando duas soluções certificadas. Neste estudo duas soluções contendo tetrafluoroborato, convertido de soluções de ácido bórico NIST 951 e de ácido bórico NIST 952 foram usadas. Inicialmente utilizou-se a razão medida do NIST SRM 951 para calcular o fator de discriminação e corrigir o valor do SRM 952. Depois fez se o inverso, o valor SRM 952 foi utilizado para calcular o f_{DM} e corrigir o padrão NIST SRM 952.

A Tabela 4.5 mostra os resultados da razão isotópica experimental e corrigida. Novamente não se pode dizer que os resultados corrigidos são diferentes, dentro de um nível de confiança de 95%. Além disto, usando as amostras certificadas pode-se observar que os valores corrigidos não são estatisticamente diferentes dos valores certificados para estas soluções, mostrando que é possível eliminar o problema de discriminação instrumental de massas.

Tabela 4.5 – Razões isotópicas dos compostos de ácido bórico SRM 1 e SRM 2 medidas e corrigidas.

$R_{CM\ NIST\ SRM\ 951}$	f_{DM}	$R_{SM\ NIST\ SRM\ 952}$	$R_{SC\ NIST\ SRM\ 952}$
$0,2465 \pm 0,0001^*$	$0,9967 \pm 0,0008$	$18,76 \pm 0,03$	$18,82 \pm 0,03$
$0,2457 \pm 0,0001$	$0,9935 \pm 0,0009$	$18,68 \pm 0,04$	$18,80 \pm 0,04$
$R_{CM\ NIST\ SRM\ 952}$	f_{DM}	$R_{SM\ NIST\ SRM\ 951}$	$R_{SC\ NIST\ SRM\ 951}$
$18,76 \pm 0,03$	$0,9978 \pm 0,0008$	$0,2465 \pm 0,0001^*$	$0,2470 \pm 0,0003$
$18,68 \pm 0,04$	$0,9936 \pm 0,0009$	$0,2457 \pm 0,0001$	$0,2472 \pm 0,0003$

Um outro método utilizado para eliminar a discriminação instrumental de massas é a utilização de padrão interno, como o tálio para mercúrio e chumbo. Estudou-se a possibilidade de utilizar se o brometo (m/z 79 e 81) como padrão interno para o boro, na forma de BF_4^- (m/z 86 e 87) já que as duas espécies apresentam m/z próximas. Para obter bons resultados, é necessário que o padrão interno e o isótopo de interesse tenham o mesmo comportamento dentro do electrospray, isto é, as suas razões precisam estar correlacionadas.

A Figura 4.9, mostra a correlação entre as razões do boro e brometo variando as tensões do cone de amostragem (Figuras 4.9a e 4.9b) e do capilar (Figura 4.9). Observando as figuras é possível perceber que há uma correlação no comportamento das razões dos dois íons. Mas há uma certa dispersão dos pontos, alguns se encontram fora da reta.

A discriminação de massas provocada pelo quadrupolo deve influenciar o boro e o brometo no mesmo sentido. No entanto, as variações da fonte e o ganho do detector podem ser sentidos de forma diferente pelos íons, provocando eventuais fracionamentos isotópicos.

Tomou-se o cuidado de preparar soluções que fornecessem intensidades similares para as duas espécies para evitar desvios nas medidas, devido ao ganho do detector. As soluções foram preparadas com 300 $\mu\text{mol/L}$ de Br^- e 100 $\mu\text{mol/L}$ de BF_4^- .

Assim sendo, os pontos que estão fora das retas na Figura 4.9, devem ter sido ocasionados devido a variações na fonte do electrospray. O coeficiente de correlação obtido para a Figura 4.9a foi de 0,8456, 10b foi de 0,7222 e 10c foi de 0,5559. Considerando um nível de confiança de 95 %, pode-se dizer que estes dados estão correlacionados.

No entanto, uma série de experimentos variando as condições da fonte do electrospray mostrou que nem sempre esta correlação entre as razões dos dois elementos é obtida, variando muito a qualidade dos resultados.

Os três métodos propostos na literatura: linear, exponencial e potencial foram testados. A equação do sistema exponencial é igual a do potencial para o caso do boro, uma vez que a diferença de massas (ΔM) entre os isótopos é 1. Os resultados obtidos não foram satisfatórios. No entanto, não é possível afirmar que o método não é aplicável para medidas isotópicas usando o electrospray. Recentemente, Al-Ammar e Barnes [65] propuseram o uso de lítio como padrão interno para o boro em estudos com ICP-MS, e apesar das espécies apresentarem um ΔM de 3 u os resultados obtidos foram satisfatórios. Vale lembrar que a técnica de ICP-MS e os processos de ionização já estão bem entendidos e controlados. A construção de uma fonte mais estável e uma maior compreensão dos processos de formação das espécies na fase gasosa provavelmente melhorarão os resultados obtidos por electrospray.

4.2.4 Íons Interferentes

Excesso de carga na gota é um dos fatores responsáveis para a promoção de íons para a fase gasosa. Todavia, este excesso não é suficiente para promover todos os cátions e ânions presentes na gota para a fase gasosa, porque há uma competição entre as espécies e aqueles com condições mais favoráveis serão transferidos para fase gasosa. Para avaliar um possível efeito isotópico durante a transferência de fase, experimentos com diferentes eletrólitos foram conduzidos. Primeiramente, avaliou-se a possibilidade de interferência isobárica de algumas espécies. Soluções contendo K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} e Cl^- foram introduzidas no electrospray.

A Figura 4.10 mostra o espectro obtido para uma solução contendo todos estes íons em metanol:água (50+50). Por este espectro, é possível concluir que estas espécies não geram íons na região de m/z de interesse. É óbvio que, dependendo do tipo de matriz da amostra, será necessário avaliar outros possíveis interferentes.

Figura 4.10. Espectro obtido de uma solução metanol:água (50+50) com 100 $\mu\text{mol/L}$ de Na_2SO_4 , $NaCl$, KCl , $MgSO_4$, e $CaCl_2$.

Um segundo problema, é o efeito de supressão de íons, um isótopo leve pode ser suprimido com eficiência diferente em relação a um isótopo pesado. Brometo, cloreto e nitrato foram escolhidos para o estudo do efeito de supressão, porque são facilmente levados à fase gasosa.

Os efeitos destas espécies na razão isotópica do boro são mostrados na Figura 4.11. Para estes experimentos, soluções de 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 foram preparadas com diferentes quantidades de brometo, cloreto e nitrato (de 0 a 800 $\mu\text{mol/L}$).

Embora, o íon BF_4^- seja suprimido em alguma extensão e as razões isotópicas do boro apresentem significantes discordâncias, não é possível afirmar que a discriminação de massas esteja ocorrendo devido a estes eletrólitos. Esta discriminação poderia ser explicada pelo longo tempo de aquisição, cada experimento foi adquirido durante 5 minutos e a sequência de aquisição dos experimentos foi ao acaso.

Figura 4.11. Efeito do brometo, cloreto e nitrato, como sal de potássio, na razão isotópica do boro.

4.2.5 Diluição Isotópica aplicada à espectrometria de massas

Como a resposta do analito no espectro não é proporcional a sua concentração, o alcance de linearidade no electrospray é limitado (10^{-3} a 10^{-6} mol/L). Em altas concentrações do analito pode ocorrer saturação e em baixas concentrações pode ocorrer supressão do analito de interesse

por outras espécies formadas. Este problema pode ser resolvido utilizando-se a técnica de diluição isotópica (IDMS) [9].

A análise por diluição isotópica permite a determinação quantitativa da concentração de um determinado elemento através da medida da razão isotópica. A idéia é adicionar uma quantidade do mesmo elemento químico sendo estudado com a razão isotópica alterada. Por exemplo, a razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ natural é 0,2473. Assim, pode-se utilizar um composto enriquecido em ^{10}B . Após a mistura e o equilíbrio do material enriquecido com a amostra com a razão natural, o valor final da razão estará alterado e o espectro de massas é obtido. Através da medida da razão isotópica alterada e conhecendo-se o número de moles do elemento enriquecido e sua razão isotópica, é possível calcular a concentração do elemento no material sendo estudado [66-70].

Para esta análise, uma série de soluções em metanol contendo misturas de tetrafluoroborato de sódio e ácido bórico enriquecido em 99,07 % em ^{10}B foi preparada a fim de se obter uma faixa de razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ de 0,2473 a 113,04. A quantidade de boro em cada solução preparada foi aproximadamente de 1 mmol/L de boro. A razão isotópica calculada e a medida estão graficadas na Figura 4.12. A regressão linear destes dados forneceu um coeficiente angular de $1,0022 \pm 0,0052$, um coeficiente linear de $-0,00596 \pm 0,00717$ e um coeficiente de correlação de 0,999, o que mostra que é possível usar a técnica de IDMS para análise quantitativa.

Figura 4.12. Razão do $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ calculada versus a razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ medida.

4.2.6 Estabilidade do íon tetrafluoroborato

Já está bem estabelecido que soluções de ácido bórico acima de 25 mmol/L podem formar íons poliboratos, como $B_3O_3(OH)_4^-$ e $B_3O_3(OH)_5^{2-}$ [71, 72]. Para avaliar se espécies de borato são observadas por ES-MS, um conjunto de experimentos usando 1 mmol/L de ácido bórico em metanol variando o pH de 7,0 até 11,0 foi realizado. Os espectros obtidos em diferentes condições da fonte de ionização não mostraram espécies monoméricas ou poliméricas quando o solvente utilizado foi metanol (Figura 4.13) ou acetonitrila. Íons borato foram observados somente quando o solvente era predominantemente água (acima de 90 %), pH alto (9,0) e somente em baixas tensões do cone de amostragem (10 a 15 V), Figura 4.14.

Figura 4.13. Avaliação da formação de espécies monoméricas e poliméricas de boro, partindo-se de uma solução 1 mmol/L de ácido bórico em metanol:água (99+1), variando o pH: a. pH 7,5; b. pH 9,5; c. pH 10,0; d pH 11,0.

Figura 4.14. Solução de ácido bórico 1 mmol/L - a- solvente água, tensão no cone de amostragem 10 V., b- solvente água , tensão no cone de amostragem 15 V. c- solvente água, tensão no cone de amostragem 25 V, d- solvente metanol, tensão no cone de amostragem 10 V, e- solvente metanol, tensão no cone de amostragem 15 V., f- solvente metanol, tensão no cone de amostragem 25 V.

Para estudar se há hidrólise do íon tetrafluoroborato e formação de outras espécies que poderiam interferir no espectro ou provocar fracionamento isotópico, uma série de soluções de 100 $\mu\text{mol/L}$ tetrafluoroborato foi preparada em metanol com diferentes pHs. Os pHs foram ajustados usando soluções 0,1 mol/L de NaOH ou 1 mol/L de HF. A Figura 4.15 mostra um conjunto de espectros obtidos de soluções de 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 em metanol variando o pH de 3,0 a 11,0. Nenhuma outra espécie de borato foi observada em diferentes condições da fonte de electrospray e a razão isotópica foi constante.

Figura 4.15. Avaliação da variação do pH na formação de outras espécies de boro a partir de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de tetrafluoroborato de sódio em metanol. Tensão no cone de amostragem 15 V, tensão no capilar 1500 V. a-pH 3,0; b-pH 5,0; c-pH 7,0; e-pH 9,5; d- pH 11,5.

No entanto, usando soluções de NaBF_4 em meio predominantemente aquoso, observou-se a hidrólise do BF_4^- . A Figura 4.16 mostra o espectro de soluções recentemente preparadas, um dia e três meses após serem preparadas e meio 90 % aquoso e pH 5,0. Foi possível observar os produtos da hidrólise: $\text{BF}_3(\text{OH})^-$, $\text{BF}_2(\text{OH})_2^-$, $\text{BF}(\text{OH})_3^-$, e $\text{B}(\text{OH})_4^-$. Todavia, devido às diferentes eficiências na formação dos íons na fase gasosa, no caso dos íons $\text{B}(\text{OH})_4^-$ e BF_4^- , não foi possível relacionar as intensidades dos picos com as abundâncias relativas das espécies formadas.

Uma série de soluções foi preparada em meio aquoso ou metanólico variando o pH entre 5,0 e 7,0 e as concentrações de NaBF_4 de 100 $\mu\text{mol/L}$ até 10 mmol/L. A análise imediata destas soluções não mostrou a formação de hidrolisados. Para soluções aquosas neste pH, observou-se um início de hidrólise após 24 horas e para solução metanólicas, após 2 semanas. Em soluções metanólicas, recém preparadas e acidificadas com ácido sulfúrico (pH 3,0), não se observou hidrólise do BF_4^- . Baseando-se nestes resultados, pode-se considerar que o uso de soluções alcalinas em metanol:água é o melhor meio para o desenvolvimento de métodos para análise isotópica do boro.

Embora a hidrólise do BF_4^- em pH neutro não seja significativa, um longo período de armazenamento da solução deve ser evitado. Estes experimentos resultaram numa interessante proposta para limpeza da fonte do efeito de memória do boro.

Figura 4.16. Hidrólise do íon BF_4^- : a- espectro obtido com uma solução recentemente preparada, - espectro obtido após 24 horas, c- espectro obtido após três meses.

4.2.7 Efeito de Memória e a hidrólise do íon BF_4^-

Como foi descrita, a principal fonte de contaminação é a adsorção do boro ou seus compostos no sistema de injeção e lentes de focalização dos íons. Isto ocorre majoritariamente no contra-eletródo e no cone de amostragem. Uma alternativa mais eficaz para eliminar o íon BF_4^- é provocar sua hidrólise ácida, formando as seguintes espécies: BF_3OH , $\text{BF}_2(\text{OH})_2^-$, $\text{BF}(\text{OH})_3^-$, e $\text{B}(\text{OH})_4^-$, na região de m/z 78 a 87 (Figura 4.17c).

Diferentemente do íon BF_4^- , cujos átomos de flúor não estão disponíveis, nas espécies de hidroxifluoroboratos, estes são rapidamente e quantitativamente substituídos por hidróxidos [72-74].

Os espectros de uma solução de NaBF_4 em ácido sulfúrico aquoso (pH 3,0) mostraram a presença de todas as espécies hidrolisadas e uma diminuição da intensidade do íon BF_4^- . Na sequência uma solução metanólica com pH 6,0 foi usada para eliminar as espécies hidrolisadas (Figura 4.17d).

O espectro de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 gera íons em m/z 86 e 87 ($^{10}\text{BF}_4^-/^{11}\text{BF}_4^-$) com uma intensidade de 10^6 e a linha base de 10^3 (Figura 4.17 a). Quando uma solução aquosa de 1 mmol/L ácido sulfúrico é injetada no electrospray, as intensidades dos íons em m/z 86 e 87 atingem a linha base em menos de 1 min e os íons hidroxifluoroboratos são gerados com baixa intensidade (Figura 4.17 b e c). Na sequência, uma solução de metanol foi injetada durante 5 minutos e os íons em m/z 86 e 87 permaneceram com as intensidades no nível da linha base e as espécies de hidroxifluoroboratos desapareceram (Figura 4.17d).

Figura 4.17. a- Solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 em metanol:água (99+1) $\blacksquare$ $^{11}\text{BF}_4^-$, $\blacksquare$ $^{10}\text{BF}_4^-$, b- Solução de ácido sulfúrico 1mmol/L após a solução de BF_4^- . $\blacktriangle$ $^{11}\text{BF}(\text{OH})_3^-$, $\blacktriangle$ $^{11}\text{BF}_2(\text{OH})_2^-$, $\blacksquare$ $^{11}\text{BF}_4^-$, $\blacksquare$ $^{10}\text{BF}_4^-$, c- espectro obtido passando a solução de ácido sulfúrico no equipamento. d – solução de metanol após limpeza com a solução de ácido sulfúrico $\blacksquare$ $^{10}\text{BF}_4^-$, $\blacksquare$ $^{10}\text{BF}_4^-$.

Para certificar-se que as espécies formadas na região de m/z 78 a 85 eram realmente íons hidroxifluoroboratos, o mesmo experimento foi realizado usando uma solução de ácido bórico enriquecido em ^{10}B 99,07 %, convertido a BF_4^- , Figura 4.18.

Na Figura 4.18c observa-se a presença de uma única espécie resultante da hidrólise: $[\text{BF}_3(\text{OH})]^-$. Neste caso a hidrólise foi incompleta. Imaginou-se que isto poderia estar ocorrendo devido ao excesso de fluoreto usado para a conversão do ácido bórico a tetrafluoroborato. Quando partiu-se de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 e 10 mmol/L de NaF em meio 100 % aquoso, com ácido sulfúrico (pH 3,0), o produto da hidrólise também foi incompleto (Figura 4.19). Confirmando assim que o excesso de fluoreto minimiza a hidrólise do BF_4^- e que as espécies formadas são produtos da hidrólise.

Assim sendo, um simples e rápido procedimento para eliminar o efeito do BF_4^- depositado no contra-eletrodo é através de sua hidrólise ácida na ausência de fluoreto.

Figura 4.18. a- Solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de BF_4^- (enriquecida em 99% ^{10}B) em metanol:água (99+1) ■- $^{10}\text{BF}_4^-$, ■- $^{10}\text{BF}_4^-$, b- Solução de ácido sulfúrico 1mmol/L após a solução de BF_4^- . ▲ - $^{10}\text{BF}_3(\text{OH})^-$, ▲ $^{11}\text{BF}_3(\text{OH})^-$, ■- $^{10}\text{BF}_4^-$, ■ $^{10}\text{BF}_4^-$, c- espectro obtido passando a solução de ácido sulfúrico no equipamento. d - solução de metanol após limpeza com a solução de ácido sulfúrico ▲ - $^{10}\text{BF}_3(\text{OH})^-$, ▲ $^{11}\text{BF}_3(\text{OH})^-$, ■- $^{10}\text{BF}_4^-$, ■ $^{10}\text{BF}_4^-$.

Figura 4.19. Hidrólise do íon BF_4^- na presença de excesso da NaF.

4.2.8 Formação do tetrafluoroborato

Hill e Lash [75] mostraram que soluções de ácido bórico com concentrações maiores do que 10 mmol/L são rapidamente e quantitativamente convertidas a tetrafluoroborato na presença de excesso de HF [76]. Por outro lado, Ishikawa e Nakamura [29] descrevem esta conversão usando uma solução contendo usando 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de ácido bórico. Assim, decidiu-se avaliar, usando a técnica de diluição isotópica, a conversão do íon borato a tetrafluoroborato [66-69].

Soluções 100 $\mu\text{mol/L}$ e 10 mmol/L de ácido bórico, enriquecido em ^{10}B (99,07 %), reagiram com 10 mol/L HF (20 % do volume total da solução) à temperatura controlada (20 $^{\circ}\text{C}$) durante 60 minutos. A cada 5 ou 10 minutos, uma alíquota foi retirada, pesada, e 5 % de NH_4OH concentrado foi adicionado para interromper a reação. O pH foi medido e uma quantidade conhecida do *spike* (NaBF_4 com boro natural) foi adicionada. A razão esperada foi calculada através da equação 4.6.

$$R = \frac{N_x \cdot B_x + N_s \cdot B_s}{N_x \cdot A_x + N_s \cdot A_s} \quad (4.6)$$

Onde R é a razão isotópica calculada da mistura, N_x e N_s são os números de moles de boro, A_x e A_s são as abundâncias do isótopo mais leve e B_x e B_s as abundâncias do isótopo mais pesado, sendo que x e s representam a amostra e o *spike*, respectivamente.

Para a solução mais concentrada, a razão esperada era de 1,489 após o *spike* com NaBF_4 . Analisando a Figura 4.20, pode-se concluir que a conversão foi quantitativa após aproximadamente 15 minutos.

Figura 4.20. Estudo da conversão do íon borato a tetrafluorborato. Solução 1 mmol/L de ácido bórico enriquecido 99,07 % em boro ^{10}B (convertido a tetrafluorborato) e 10 mmol/L de tetrafluorborato em metanol. Após 30 minutos de reação a conversão foi quantitativa.

Para a solução de 100 $\mu\text{mol/L}$ de B, a conversão se torna inviável, pois em 60 minutos de reação, somente 78% do íon borato foi convertido à tetrafluorborato (Figura 4.21). Apesar da conversão não ser quantitativa, não foram observados os hidroxifluorboratos. Este resultado pode parecer contrastante com o estudo anterior sobre a hidrólise do BF_4^- , porém deve-se considerar que há um excesso de fluoreto livre na solução. Assim, como no caso do estudo sobre hidrólise, os intermediários não são observados. Este comportamento provavelmente está relacionado com as cinéticas das várias etapas de interconversão do borato em tetrafluorborato.

Figura 4.21. Estudo da conversão usando uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ de ácido bórico enriquecido 99,07 % de ^{10}B e 100 $\mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 . Somente 78 % do íon borato foi convertido.

4.3 Conclusões

As modificações realizadas para introdução de amostra e formação do electrospray foram bem sucedidas. Isto se deve a simplicidade e robustez da fonte aliadas ao fato de se trabalhar à pressão atmosférica.

A utilização do íon BF_4^- em soluções metanólicas mostrou-se adequada para a determinação da razão isotópica. O tetrafluoroborato é uma espécie que é facilmente transferida para a fase gasosa e rende espectros bastante simples e convenientes para medidas isotópicas. A conversão borato/tetrafluoroborato é possível a concentrações moderadas de boro e o íon gerado é estável em uma ampla gama de condições.

Estatisticamente, não é possível detectar uma tendência sistemática da razão isotópica quando as tensões aplicadas na fonte e os fluxos dos gases de nebulização e secante foram variados, mas existe discriminação instrumental de massas que pode ser corrigida através do fator de discriminação de massas.

O contra eletrodo usando o modelo cross-flow mostrou-se eficiente, diminuindo os problemas com efeito de memória. Além das mudanças na instrumentação, este efeito pôde ser controlado por etapas de limpeza que atuam de duas maneiras: (1) deposição de camada sólida sobre os resíduos que permanecem no contra-eletrodo e (2) decomposição do tetrafluoroborato residual por hidrólise ácida. Esta segunda estratégia se mostrou mais eficiente e conveniente.

O uso do brometo como padrão interno para correção da discriminação instrumental de massas não se mostrou tão eficiente, provavelmente devido à baixa massa das espécies. Os estudos sobre medidas isotópicas demonstraram que é possível a utilização de diluição isotópica.

Capítulo 5

Aplicações do Método Desenvolvido para $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$

Quando se trata de matrizes reais, em geral, um dos principais problemas do desenvolvimento do método analítico é o tratamento da amostra para a análise do elemento de interesse.

Para a avaliação do método, três tipos de amostras reais foram analisadas. Foram medidas a razão isotópica do boro e sua concentração em amostras de sabão em pó, solo e plantas.

5.1 Parte Experimental

5.1.1 Instrumentação e Reagente

A instrumentação e os reagentes utilizados nos trabalhos descritos neste capítulo são os mesmos que o do capítulo 4.

5.1.2 Colunas de troca iônica

Duas seringas de 1 mL foram cortadas e coladas por fusão em bico de Bunsen, Figura 5.1, e em cada extremidade foi colocado dois filtros com membrana de teflon de 0,2 μm (Millipore).

A seringa foi preenchida com 1,50 g de resina Amberlite- IRA-743 (úmida) [77]. Uma bomba peristáltica (Ismatec, Suíça) com o fluxo ajustado para 1 mL/min conduz a amostra, as soluções de lavagem e de eluição pela coluna. Após a passagem da amostra uma solução de 3 mL de NH_4OH 0,3 mol/L é eluída para retirar cátions presentes na amostra, seguidos por 5 mL de água deionizada. Depois, a coluna é novamente lavada com 2 mL de água, 3 mL de NH_4OH 0,3 mol/L e 5 mL de água. Finalmente, o boro é eluído com 15 mL de NaOH , 1 mol/L, em alíquotas de 5 mL cada. A cada uma destas alíquotas é adicionada 1 mL de HF 10 mol/L, para a conversão do borato a tetrafluoroborato. Após a conversão o pH da amostra é ajustado, pH 10, com 400mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$. A solução é filtrada para eliminar o CaF_2 e em seguida é adicionado EDTA , 0,02 mol/L, que elimina o excesso de cálcio da solução. Este procedimento evita o entupimento do capilar de sílica.

A resina catiônica Ion Exchanger 1 (Merck, Darmstadt) foi montada em uma coluna de PVC (10 cm de altura e 0,3 cm de diâmetro externo) e condicionada com HCl 1 mol/L.

5.1.3 Amostras

Para a avaliação do método, três tipos de amostras reais foram analisadas. Foram medidas a razão isotópica do boro e sua concentração em: sabão em pó para máquina de lavar roupas OMO Cores (Gessy Lever), Minerva (Gessy Lever) e Ariel (Procter and Gamble), sabão para máquina de lavar louças SUN (Gessy Lever), amostras de solo obtidas em canteiro próximo ao Instituto de Química da USP e amostras de folha de algodoeiro alimentadas com soluções nutritivas contendo boro (CENA-USP). Além destas, foram analisadas as concentrações de boro em dois padrões certificados pelo NIST- folhas de macieira e folhas de pessegueiro. No anexo 1 foram inseridos os cálculos efetuados para obtenção da razão isotópica e o procedimento utilizado para a técnica de diluição isotópica para cada uma das amostras.

5.2 Resultados e Discussões

5.2.1 Estudo da formação do complexo do manitol com o íon borato e tetrafluoroborato.

O electrospray apresenta uma grande limitação, que é a necessidade de uma quantidade mínima de analito, aproximadamente $1\mu\text{mol/L}$, para a espécie ser detectada. Analitos em concentrações menores acabam não sendo detectados devido à supressão causada por eletrólitos presentes na solução. Assim, na maior parte das amostras reais o boro precisará ser separado da matriz e pré-concentrado. Além disto, no nosso caso como o boro é encontrado na natureza na forma de borato é necessário convertê-lo a tetrafluoroborato. O que pode ser feito usando soluções de ácido fluorídrico.

No entanto, boro na presença de ácido fluorídrico ou clorídrico gera espécies como BF_3 e BCl_3 , que têm ponto de ebulição -101 e $+12,5$ °C, respectivamente, de forma que estas espécies são facilmente volatilizadas, o que pode causar fracionamento isotópico, mesmo a temperatura ambiente.

Um procedimento muito comum para minimizar a perda de boro por volatilização é complexá-lo com compostos contendo hidroxilas como álcoois e fenóis. O complexo formado é bastante favorecido, principalmente se as hidroxilas forem vicinais como no caso do manitol [19, 79, 80]. No entanto, o uso do manitol pode ser uma limitação caso forme

complexo com o íon BF_4^- , pois não seria possível medir a razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ como BF_4^- . Segundo Ishikawa e Nakamura [29] o íon BF_4^- pode formar complexos com manitol, com um ligante BL^- ou com dois ligantes LBL^- (Figura 5.2).

Figura 5.2. Equilíbrio proposto por Ishikawa e Nakamura para o complexo entre BF_4^- e manitol

Assim, foram realizados dois conjuntos de experimentos, o primeiro para avaliar se há fracionamento isotópico do boro devido à sua volatilização durante a conversão e um segundo para avaliar a complexação do íon BF_4^- pelo manitol.

Para avaliar se há perda do boro por volatilização ensaios usando diferentes soluções de ácido bórico enriquecidas em ^{10}B (99,07 %) foram realizados. Aliquotas de 1 mL de soluções contendo $1,63 \cdot 10^{-3}$ moles de ^{10}B foram transferidas para frascos de 10 mL de polietileno e pesadas. Os frascos foram divididos em dois grupos. A um destes adicionou-se 10 mmol/L manitol e no outro não foi adicionado manitol. Em seguida foram acrescentados 2 mL de 10 mol/L de HF. Depois de 1 hora adicionou-se 1 mL de uma solução contendo $25 \cdot 10^{-4}$ moles de BF_4^- com a abundância isotópica natural do boro.

O rendimento da recuperação do boro durante a conversão foi calculado usando diluição isotópica. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados são mostrados na Tabela 5.1. Pode-se observar que não há uma diferença significativa entre os valores das razões obtidas, indicando que não houve discriminação de massas entre os isótopos. Além

disto, o rendimento foi em torno de 99,1 % o que mostra que para soluções concentradas acima de 1 mmol/L de boro não há perda de boro durante a conversão.

Tabela 5.1. Estudo sobre a influência do manitol na minimização da volatilização do boro durante a conversão do borato a tetrafluoroborato.

solução de ácido bórico 99,07 % em ^{10}B ($1,63 \cdot 10^{-3}$ moles/L) com manitol	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ calculada	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ medida	Número de moles recuperado	Recuperação %
	0,956	$0,967 \pm 0,002$ $0,965 \pm 0,002$ $0,968 \pm 0,002$	$1,61 \cdot 10^{-3}$ moles $1,61 \cdot 10^{-3}$ moles $1,60 \cdot 10^{-3}$ moles	98,7 98,7 98,2
sem manitol				
	0,956	$0,963 \pm 0,002$ $0,966 \pm 0,002$ $0,967 \pm 0,002$	$1,62 \cdot 10^{-3}$ moles $1,63 \cdot 10^{-3}$ moles $1,62 \cdot 10^{-3}$ moles	99,4 100 99,4

Para avaliar se há formação do complexo $\text{BF}_4^-/\text{manitol}$ foram preparadas soluções com 100 $\mu\text{mol/L}$ de tetrafluoroborato com diferentes concentrações de manitol (100 $\mu\text{mol/L}$ a 10 mmol/L), em pHs de 6 a 11 (Figura 5.3). Os espectros na Figura 5.3 foram obtidos com uma razão boro:manitol 1:10, o excesso de manitol deveria garantir a formação do complexo BL_2^- , nos diferentes pHs. No entanto, nota-se que os picos relativos ao complexo boro-manitol com um ligante, m/z 229 (LBF_2^-), e dois ligantes, m/z 371 (LBL^-) não aparecem no espectro. A Tabela 5.2 mostra os principais íons formados no espectro obtido de uma solução 100 $\mu\text{mol/L}$ NaBF_4^- , 1 mmol/L de manitol em metanol:água (1:1) pH 7,6. O íon gerado em m/z 269 é uma espécie contendo manitol e o íon BF_4^- . Porém, nesta espécie o boro está solvatado pelo manitol. Surpreendentemente, o íon de m/z 181 correspondente ao manitol ionizado apareceu no espectro. Este não deve estar ionizado em solução uma vez que seu pK_a é 13,50. Assim sendo, este íon deve estar sendo gerado durante o processo do electrospray.

Poderia ocorrer a suspeita que talvez os complexos LBF_2^- e LBL^- estivessem sendo formados e não fossem levados à fase gasosa. Para esclarecer este problema o mesmo experimento foi realizado usando ácido bórico. Neste caso o complexo de boro com dois ligantes, LBL^- , foi observado (m/z 371).

Figura 5.3. Espectros obtidos de uma solução $100 \mu\text{mol/L}$ de NaBF_4 e 1 mmol/L de manitol. Em diferentes pHs. a-pH 5,0, b-pH 7,6, c-pH 11,0

Tabela-5.2. Íons formados a partir de uma solução de $100 \mu\text{mol/L}$ NaBF_4 e 1 mmol/L de manitol em metanol:água (1:1) pH 7,6.

m/z	íons Formados
87	BF_4^-
181	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_6^-$
197	$[\text{Na}(\text{BF}_4)_2]^-$
269	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6\text{BF}_4]^-$
363	$\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_{12}^-$
381	$[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_{12}\text{H}_2\text{O}]^-$
395	$[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_{12}\text{CH}_3\text{OH}]^-$

Todavia, o complexo de boro com 1 ligante, BL^- (m/z 225), não apareceu no espectro, mesmo quando a concentração de manitol era pequena. Observou-se que a formação do

complexo é mais favorecida em pH entre 7,0 e 9,0 (Figura 5.4). Em pH acima de 9,0 começa ocorrer competição entre a hidroxila e o borato pelo manitol e em pH acima de 11,0, o íon BL_2^- não é mais formado. Em pH abaixo de 6,0, o complexo é formado, mas com uma intensidade inferior àquela obtida em pH maiores. A Tabela 5.3 relaciona os principais íons observados no espectro do íon borato com o manitol, em uma solução com o pH 8,0. O mesmo comportamento foi observado por Penn e colaboradores [81] em espectros de soluções de boro com manitol obtidos por MALDI.

Tabela 5.3. Principais íons formados de uma solução de borato de sódio 100 $\mu\text{mol/L}$ e manitol 1 mmol/L , pH 8,0 (metanol:água (90:10)) por ES-MS.

m/z	Íon
181	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_6^-$
221	?
371	BL_2^-
389	$[\text{BL}_2]^- \text{H}_2\text{O}$
403	$[\text{BL}_2]^- \text{CH}_3\text{OH}$
435	$[\text{BL}_2]^- [\text{CH}_3\text{OH}]_2$
553	$[\text{BL}_2]^- \text{L}$

Como relatado anteriormente, nossos resultados mostram que a conversão do borato a tetrafluoroborato não é quantitativa a não ser em soluções concentradas de boro.

Ishikawa e Nakamura [29] usaram 500 μL de uma solução 10^{-7} mol/L de boro e 2 mL de de ácido fluorídrico, 3 mol/L , para a conversão. Reproduzindo estas concentrações não se observou a formação do íon BF_4^- e ao adicionar o manitol o cluster do LBL^- foi observado. Assim, pode-se concluir que Ishikawa e Nakamura [29], na realidade, não observaram a formação do complexo do manitol com o íon BF_4^- e sim com o borato. O fracionamento isotópico não foi observado porque a composição isotópica do boro foi determinada por TIMS como Cs_2BO_2^+ . Provavelmente, se estes tivessem analisado o boro como BF_4^- talvez observassem algum fracionamento isotópico devido à conversão incompleta.

5.2.2 Comparação de Resultados Interlaboratoriais

Para avaliar a concordância do método proposto com outros já estabelecidos, foram realizadas algumas medidas usando o mesmo ácido bórico que outros laboratórios.

A Tabela 5.4 mostra os resultados obtidos da razão isotópica do boro usando TIMS e electrospray, para uma solução de ácido bórico de um mesmo lote, (*Synth-Diadema*, São Paulo). Estatisticamente, não se pode afirmar que os resultados fornecidos por ES-MS e TIMS são discordantes. A precisão obtida por TIMS está bem abaixo daquela normalmente encontrada na literatura. Isto se deve ao pequeno período de monitoramento dos sinais.

Tabela 5.4. Razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ de uma amostra de ácido bórico da *Synth*.

Soluções	TIMS (IPEN) (experimental) $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$	Electrospray (USP) (experimental). $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$
Natural (H_3BO_3) <i>Synth</i>	$0,2488 \pm 0,0007$	$0,2492 \pm 0,0002$

Um segundo conjunto de dados foi comparado (Tabela 5.5). Uma série de soluções com diferentes proporções de boro 10 e 11 foram preparadas no Instituto de Energia Nuclear no Rio de Janeiro e analisadas por ICP-MS no CENA-USP. As medidas por ICP-MS foram obtidas com um tempo de aquisição de 25 s varrendo dois canais, m/z 10 e 11. Estas mesmas soluções foram convertidas a tetrafluoroborato e analisadas por electrospray. Esses resultados são mostrados dividindo a razão do $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$ ao invés de $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ pois os valores obtidos do CENA-USP foram calculados desta forma.

As medidas por ES-MS foram obtidas varrendo 4 íons com m/z de 84 a 89 durante cinco minutos, todos com o mesmo tempo de residência (80 ms). Os resultados obtidos são bastante promissores.

Esses resultados mostram que ES-MS é uma técnica que pode ser utilizada ao lado de técnicas já bastante confiáveis, como TIMS e ICP-MS, para medidas isotópicas. ES-MS ainda é uma técnica nova para este tipo de medida e que pode ser melhorada para obter resultados mais precisos. Há uma certa discriminação de massas, mas como mostrado pode ser minimizada através do uso de um padrão certificado.

Tabela 5.5. Dados interlaboratorias obtidos por ICP-MS e ES-MS de uma série de soluções de ácido bórico com diferentes proporções dos isótopos de boro.

Soluções	ICP-MS (CENA-USP) experimental	Electrospray (IQ-USP) (experimental)	Resultado esperado
Natural	$3,903 \pm 0,06$	$4,0511 \pm 0,0005$	$4,00 \pm 0,02$
30%	$2,378 \pm 0,03$	$2,3255 \pm 0,0005$	$2,333 \pm 0,011$
50%	$0,970 \pm 0,02$	$1,0182 \pm 0,0007$	$1,000 \pm 0,005$
70%	$0,428 \pm 0,005$	$0,4365 \pm 0,0003$	$0,429 \pm 0,002$
95%	$0,090 \pm 0,001$	$0,1014 \pm 0,0003$	$0,099 \pm 0,0001$

5.2.3 Pré-concentração do boro usando a resina Amberlite IRA-743

A resina Amberlite IRA-743 vem sendo usada desde o final da década de 60 para pré-concentração e separação do boro de matrizes reais. Esta resina é formada de uma matriz de poliestireno no qual grupos funcionais de N-metilglucamina são ligados como mostra a Figura 5.5 [77]. Vários trabalhos [77, 82, 83, 84] mostram que o boro é retido na resina na forma de íon borato através de um quelato com as hidroxilas, como mostra a equação 5.2.

O átomo de nitrogênio do grupo funcional é protonado. Este tem um papel tamponante, que é a causa da larga faixa ótima de pH para adsorção do boro na resina.

Um dos principais problemas de se utilizar coluna para pré-concentração é a possibilidade de ocorrência de fracionamento isotópico. Sonoda e colaboradores [85] estudaram a possibilidade de ocorrer fracionamento isotópico do boro na resina devido à variação do pH.

O fracionamento isotópico pode ocorrer porque o boro é adsorvido pela coluna na forma tetraédrica e pelo equilíbrio de troca entre os isótopos do boro, cujo K_a é 0,981, equação 5.3, é possível perceber que há uma preferência do ^{10}B pela forma tetraédrica. [19,

86]. Assim em soluções saturadas de boro, o ^{10}B pode ser preferencialmente adsorvido pela coluna. Este fracionamento foi observado por Sonoda e colaboradores e é mais pronunciado em pH 7,0, em pH maior que 11 não há fracionamento pois todo boro está na forma de borato, o mesmo acontece em pH menor que 6, onde todo o boro está na forma de ácido bórico. Estas conclusões concordam com o diagrama de espécies, Figura 5.6, nas soluções com o pH entre 7,0 e 10,0, as duas espécies do boro estarão presentes no meio, podendo ocorrer o fracionamento isotópico. Somente em pH abaixo de 6,0 e maior que 11,0 o fracionamento isotópico seria eliminado. No entanto, o fracionamento isotópico só é significativo quando se trabalha em condições de saturação da resina. Em condições de não saturação, o ^{10}B poderá ser mais facilmente adsorvido pela resina mas como há sítios suficientes para todo o boro em solução não há fracionamento isotópico. Isto explica porque a maioria dos autores, que trabalha com a resina IRA-743, não relata a observação de fracionamento isotópico [19, 23, 25, 86].

Figura 5.6. Fração das espécies de boro em função do pH.

Os nossos estudos em relação ao pH concordam com os do Sonoda [85] e colaboradores. A maior retenção do boro ocorre na faixa de pH de 5,0 a 10,0. Acima de pH 11, o borato compete com a hidroxila pela resina e abaixo de pH 4,0, o borato está todo na forma de ácido bórico e compete com o próton (equação 5.1).

A recuperação do boro na coluna para amostras variando de 100 a 1 $\mu\text{mol/L}$ de boro, foi em torno de 95 %. O rendimento foi calculado usando a técnica de diluição isotópica

Para avaliar a capacidade de remoção do boro pelo NaOH, foi feito um estudo sobre a capacidade de eluição do boro da coluna com diferentes concentrações da base (0,01 a 1 mol/L). O boro foi eluído quantitativamente usando soluções de NaOH com concentrações de 0,05 a 1 mol/L. Usando Soluções de NaOH abaixo de 0,05 mol/L nenhum boro foi encontrado no eluato. Partindo de uma solução 1 mol/L de NaOH, o boro foi eluído quantitativamente com 10 mL desta solução. Soluções de NaOH mais diluídas requerem um maior volume, 25 a 30 mL, o que provoca uma diluição maior do analito e prejudica a análise. Por isto, optou-se por trabalhar com concentrações maiores de NaOH.

Foram tiradas alíquotas de 5mL da coluna, às quais foram adicionadas alíquotas de 1 mL de HF 10 mol/L e deixadas em repouso por 1 hora. Após a conversão, 2 mL de metanol foram adicionados à solução e, na seqüência, o pH é ajustado. Antes da injeção da alíquota no espectrômetro, esta foi filtrada usando filtros da Millipore 0,2 μm com membrana de teflon. O boro é todo eluído nas duas primeiras alíquotas.

A Tabela 5.6 mostra um conjunto de resultados para amostras com diferentes concentrações de boro. É possível observar que não parece haver fracionamento isotópico na coluna; as razões medidas nas duas alíquotas não são significativamente discordantes.

Tabela 5.6. Razão Medida nas alíquotas eluindo da coluna de resina Amberlite IRA 743.

Solução Conc. de boro $\mu\text{mol/L}$	Razão	
	Alíquota 1	Alíquota 2
0,1	$0,2484 \pm 0,0005$	$0,2475 \pm 0,0005$
1,0	$0,2473 \pm 0,0006$	$0,2475 \pm 0,0006$
10,0	$0,2452 \pm 0,0003$	$0,2450 \pm 0,0003$

5.2.4 Competição entre a resina e o manitol pelo íon borato.

Como já foi relatado, o manitol é muito utilizado para minimizar o fracionamento isotópico, por volatilização, durante os processos de abertura de amostra, mas não há nenhuma informação na literatura sobre a competição entre o manitol e a resina IRA-743. Ambos apresentam grupos funcionais, hidroxilas, que complexam fortemente o boro.

Assim, alguns ensaios foram conduzidos para avaliar se o manitol interfere na pré-concentração do boro pela resina.

Soluções contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de ácido bórico e de 10 $\mu\text{mol/L}$ a 500 $\mu\text{mol/L}$ de manitol foram preparadas e eluídas pela coluna contendo a resina. Para acompanhar a eluição do boro durante todas as etapas foram retiradas alíquotas desde a passagem da amostra até a eluição final com hidróxido de sódio. As alíquotas foram recolhidas, em torno de 2 mL, em frascos de 10 mL contendo 1 mL de 10 mol/L de ácido fluorídrico, deixou-se por 1 hora e adicionaram-se 400 mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O volume foi completado com 3 mL de água e 5 mL de metanol. Antes da injeção no espectrômetro de massas a solução é filtrada com microfiltros de 0,22 μm .

Nas soluções com concentrações de manitol acima de 200 $\mu\text{mol/L}$ o boro não foi retido pela coluna. As alíquotas eluídas com NaOH 0,1 mol/L não apresentaram nenhum pico referente do boro. Em soluções onde a razão boro:manitol é 1:1 ou menor, observou-se o pico do boro tanto nas alíquotas iniciais como nas alíquotas eluídas com NaOH 1 mol/L.

Pelos resultados obtidos, o uso do manitol deve ser evitado quando se pretende pré-concentrar com a resina IRA-743. Poderia-se questionar se o boro eluído nas primeiras alíquotas se deve a saturação da coluna. Este não é o caso pois, quando foram utilizados 25 mL de solução contendo 7 mg de boro, não se observou boro nas primeiras alíquotas; somente nas alíquotas eluídas com NaOH-1mol/L.

5.2.6 Amostra de solo

O limite de detecção foi calculado usando a equação da diluição isotópica. A razão mínima da mistura, *spike* + amostra, foi obtida através da razão do *spike* subtraída de 3σ do desvio padrão da razão do *spike*. A razão obtida foi usada na equação de diluição isotópica para calcular a concentração do limite de detecção. O valor obtido foi de 2,67 ng/g. Este limite de detecção pode ser considerado alto quando comparado com outras técnicas, como ICP-MS e TIMS. No entanto, para uma série de estudos, como os apresentados neste trabalho, este limite é mais do que suficiente para quantificar o boro com razoável precisão. Além disto utilizando procedimentos de pré-concentração é possível atingir concentrações 10 vezes menores do que esta.

5.2.6.1 Abertura das amostras de solo

Amostras de solo foram obtidas no canteiro próximo ao Instituto de Química da USP. O procedimento de dissolução da amostra baseou-se num procedimento já descrito na literatura [87] que usa meio ácido e peróxido de hidrogênio. No entanto, ao invés de usar um meio ácido optou-se por um meio básico. O uso do meio básico minimiza a perda de boro por volatilização, facilita o ajuste do pH para passagem da solução pela coluna contendo a resina IRA-743 e provoca a hidrólise do boro ligado a complexos como poliálcoois e açúcares [88].

Para abertura da amostra, pesou-se em torno de 10,0 gramas de solo, adicionou-se 90 mL de água e 10 mL de NaOH, 1 mol/L. A mistura foi aquecida por 30 minutos a 80 °C. A solução foi filtrada a quente. Após resfriar, 10 mL de peróxido de hidrogênio foram adicionados e a solução foi aquecida por mais trinta minutos a 80 °C. A solução foi filtrada e o pH, ajustado, com ácido acético, em torno de 6,0. A amostra foi eluída pela coluna com a resina IRA-743. Três alíquotas de 5 mL foram eluídas, a cada uma destas foi adicionado 1 mL de ácido fluorídrico 10 mol/L e deixou-se a solução reagindo por 1 hora. O pH foi ajustado com 400 mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, obtendo-se um pH final próximo a pH 6,0. A solução foi filtrada e analisada por espectrometria de massas.

A Figura 5.7 mostra os espectros de varreduras obtidos para a amostra de solo sem adição de *spike* e com adição de *spike*. Pode-se perceber que não há a formação de íons interferentes na região de m/z de interesse.

Figura 5.7. Espectro da amostra de terra. a- sem adição de *spike*. b- com adição de *spike*.

5.2.6.2 Quantificação e medida da razão isotópica

As amostras com adição de *spike* e sem adição de *spike* foram monitoradas durante 5 minutos varrendo quatro canais (m/z 84 a 89) usando o modo SIR. O tempo de residência em cada canal foi de 80 ms. A Tabela 5.7 mostra as concentrações obtidas (por diluição isotópica) e as razões isotópicas.

Tabela 5.7. Concentrações obtidas usando a técnica de diluição isotópica e a razão isotópica (sem adição de *spike*) para amostras de solo.

Amostra Terra	Concentração obtida por IDMS ($\mu\text{g/g}$)	Razão isotópica, $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$	Fator de correção	Razão isotópica corrigida, $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$
1	$0,79 \pm 0,01$	$0,2421 \pm 0,0002$	$0,983 \pm 0,001$	$0,2462 \pm 0,0003$
2	$1,12 \pm 0,02$	$0,2435 \pm 0,0003$	$0,986 \pm 0,001$	$0,2469 \pm 0,0003$
3	$1,007 \pm 0,001$	$0,2428 \pm 0,0005$	$0,984 \pm 0,001$	$0,2467 \pm 0,0003$

5.2.7 Amostras de plantas

Amostras de plantas de algodão foram obtidas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP) com o grupo da Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Giné.

Para as medidas de razão isotópica e concentração foram utilizadas amostras de algodoeiro que cresceram em solução nutritiva completa durante 60 dias. Analisou-se dois tipos de amostras: folhas tratadas com solução de ácido bórico com abundância natural (FA) e a amostras de folhas de 30, 45 e 60 dias que foram tratadas com soluções enriquecidas em boro (FB). Segundo informações fornecidas, a solução nutritiva continha: $\text{NO}_3^- = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{NH}_4^+ = 0,5 \text{ mmol/L}$, $\text{H}_2\text{PO}_4^- = 1 \text{ mmol/L}$, $\text{K}^+ = 1 \text{ mmol/L}$, $\text{Ca}^{2+} = 2 \text{ mmol/L}$, $\text{Mg}^{2+} = 1 \text{ mmol/L}$, $\text{SO}_4^{2-} = 1 \text{ mmol/L}$, B $20 \mu\text{mol/L}$, Cu $0,4 \mu\text{mol/L}$, Fe-EDTA $32 \mu\text{mol/L}$, Mn $16 \mu\text{mol/L}$, Mo $0,4 \mu\text{mol/L}$, Zn $16 \mu\text{mol/L}$.

5.2.7.1 O procedimento de abertura da amostra

Pesaram-se em torno de 350 mg de material vegetal, em triplicata, e transferiu-se para cadinhos de platina ao qual foi adicionado 1mL de hidróxido de sódio 1 mol/L. Para garantir que houvesse uma boa mistura entre a base e a amostra, esta foi deixada em repouso por 10 minutos a 100 °C. O uso do meio básico na abertura das plantas tem a mesma explicação que na abertura do solo. Neste caso é ainda mais importante porque há uma grande quantidade de poliólcoois e açúcares na planta que podem complexar com o boro. O trabalho de Power e Woods [88] mostra que o boro nas plantas está todo na forma de borato livre ou em complexos em ligações do tipo -O-B-O- que são facilmente hidrolisadas em meio básico, liberando o boro. Após este tempo a amostra foi levada a uma mufla a 550 °C por 4 horas. O cadinho foi resfriado à temperatura ambiente. Depois da abertura, o resíduo foi dissolvido em ácido acético 2 mol/L e aquecido a 80 °C por 20 minutos. O pH final da solução era próximo a 6,0. Após a dissolução, a solução foi filtrada e o boro, pré-concentrado na resina IRA-743. Antes da injeção da alíquota no espectrômetro, esta foi filtrada usando filtros da Millipore 0,2 µm com membrana de teflon. O boro é todo eluído nas duas primeiras alíquotas.

O ácido acético foi escolhido por dois importantes fatores: (1) não forma complexos voláteis com o boro como HCl e HF e (2) o uso do ácido acético elimina a etapa de ajuste do pH antes de passar a solução pela coluna.

5.2.7.2 Quantificação e medida da razão isotópica de boro

O primeiro problema encontrado foi o aparecimento de picos na massa 85 u e 86 u, que são favorecidos a baixas tensões do cone, isto é, menor que 10 V, e em 87 u favorecido a tensões mais altas, acima de 15V. Estes interferem nas massas de interesse 86 e 87 u. Não se conseguiu identificar quais espécies seriam responsáveis pela interferência.

Para eliminar estes interferentes optou-se por utilizar uma coluna catiônica forte, que apresentou excelentes resultados. A amostra foi eluída da coluna aniônica diretamente para a coluna catiônica.

A Figura 5.8 mostra os espectros obtidos para uma amostra de planta alimentada com a solução nutritiva durante os primeiros trinta dias, 30LPB, na qual foi adicionado um *spike* de $1,0 \mu\text{mol/L}$ de uma solução 99,07 % em boro 10.

As figuras 5.8a e b mostram espectros obtidos da amostra sem passar pela coluna catiônica, em diferentes tensões do cone de amostragem a 6 V e 21 V. Observa-se nestes espectros a presença de interferentes nas massas 85 a 87 u. As figuras 5.8 c e d mostram os espectros, da mesma amostra, depois de eluída pela coluna catiônica. Pode-se perceber que aparentemente os picos interferentes foram eliminados. Esses mesmos espectros foram obtidos, com a tensão do cone de amostragem a 21 V, no modo SIR e a razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ foi medida. Para a solução sem passar pela coluna catiônica, a razão medida foi de $2,745 \pm 0,003$ e para a alíquota após ser eluída da coluna catiônica foi de $3,574 \pm 0,002$, indicando a interferência devido ao pico 87.

Figura 5.8 . a e b espectros da amostra de planta após a abertura e pré-concentração na coluna com a resina IRA-743. c e d espectros da mesma amostra que a e b após a abertura e pré-concentração na coluna com a resina IRA-743 e eliminação de interferentes pela coluna catiônica.

As amostras de folha de algodoeiro foram divididas em três porções e analisadas usando o mesmo procedimento. Diferentes amostras não mostraram reprodutibilidade nos resultados para concentração. A concentração de boro obtida variou de 10 a $40 \mu\text{g/g}$ dependendo da amostra analisada. Mas obteve-se reprodutibilidade para uma mesma

amostra. Esta falta de reprodutibilidade pode ser causada por diferentes fatores: (1) diferente capacidade de absorção e retenção do boro pelas várias estruturas das plantas e os diferentes procedimentos de nutrição a que estas foram submetidas, (2) problemas com a granulometria da amostra (3) interferência isobárica nos picos 86 e 87 u (4) supressão da formação de espécies do boro na fase gasosa por outros íons e (5) perda por volatilização durante o processo de abertura. Como os problemas 3, 4 e 5 foram avaliados e resolvidos a principal causa desta variação deve ser a capacidade de absorção das plantas do solo e a granulometria da amostra.

Algumas variações foram experimentadas no processo de abertura. Foram utilizados diferentes ácidos para dissolução da amostra digerida: HCl, HNO₃, H₂SO₄ e ácido acético. Destes, o que forneceu os melhores resultados foi o ácido acético; os outros três ácidos geraram uma série de espécies como: NO₃⁻, Cl⁻, HSO₄⁻ que provocam uma certa supressão na formação do íon BF₄⁻ na fase gasosa.

A tabela 5.8 mostra os resultados de concentração para três diferentes tipos de amostras de folha de algodoeiro, estas foram feitas em triplicata.

Tabela 5.8. Concentração de boro µg/g em amostras de folhas de algodoeiros alimentadas com soluções nutritivas com boro com abundância natural nos primeiros trinta dias, com ^{10}B de 30 a 45 e dos padrões certificados de folhas de pessegueiro e macieira do NIST

Folha	Concentração de B em µg/g
30 HC EI	31,62 ± 0,21*
45 LP EI	42,32 ± 0,25*
30 LP EI	25,22 ± 0,21*
RBI	11,54 ± 0,18*
folhas de pessegueiro	28,02 ± 0,25
NIST SRM 1547 (29 ± 2 µg/g)**	29,12 ± 0,17
folhas de macieira	28,51 ± 0,17
NIST SRM 1515 (27 ± 2 µg/g)**	

* resultado é a média de três medidas triplicata

** valor certificado pelo NIST

A Tabela 5.9 mostra as razões isotópicas de B nas folhas de algodoeiro. Não é possível dizer se estas razões são realmente as esperadas. No entanto, pode-se afirmar que

houve absorção do B enriquecido pelas plantas. Os valores não foram corrigidos com o padrão NIST.

Tabela 5.9. Razões isotópicas de amostras de folhas de algodoeiros alimentadas com soluções nutritivas contendo boro.

Folha	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$
1-A 30 dias	$0,2514 \pm 0,0007$
1-B 45 dias	$1,091 \pm 0,003$
3-B 45 dias	$1,541 \pm 0,003$
1-B 60 dias	$0,4637 \pm 0,001$
2-B 60 dias	$0,4139 \pm 0,001$

* As plantas foram alimentadas com boro com abundância natural nos primeiros trinta dias, com ^{10}B de 30 a 60 dias.

5.2.8 Amostras de sabão

Algumas marcas de sabão em pó adicionam grandes quantidades de boro, na forma de perborato de sódio, que age como branqueador. Foram analisados quatro tipos de sabão em pó, todos em triplicatas. As composições divulgadas pelos fabricantes são apresentadas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Composições dos sabões divulgadas pelos fabricantes

Marca	Composição
SUN	Dissilicato de sódio, tripolifosfato de sódio, perborato de sódio, carbonato de sódio, silicato, EDTA, copolímero etoxipropoxilado e perfume.
OMO Cores	Alquil-benzeno-sulfonato de sódio, tripolifosfato de sódio, perborato de sódio, carbonato de sódio, silicato, pigmento azul 15, perfume, água.
Ariel	Alquil benzeno sulfonato de sódio, alquil éter sulfato de sódio, cloreto de alquil-dimetil-hidroxietyl-amônio, tripolifosfato de sódio, carboximetil-celulose, polímero (sic), EDTA, sulfato de magnésio, sulfato de sódio, perborato de sódio, carbonato de sódio, silicato de sódio, enzimas, ftalocianinas sulfonada de zinco, silicones, zeólitos, pigmento azul e fragrância.
Minerva	Alquil-benzeno-sulfonato de sódio, tripolifosfato de sódio, carbonato de sódio, silicato de sódio, carboximetilcelulose de sódio, ácido 4,4'-diamino estilbeno 2,2'-dissulfônico, bentonila, pigmento azul 15, perfume, água.

5.2.8.1 Abertura da amostra

Uma massa de 100 mg de sabão em pó foi dissolvida em 10 mL de água, agitada durante 1 hora, filtrada e aquecida por 2 horas a uma temperatura próxima à da ebulição. O volume final nesta etapa é de aproximadamente de 3 mL ao qual acrescentou-se 1 mL de 10 mol/L de HF e deixou-se em repouso por 30 minutos. Depois deste período, adicionamos-se 7 mL de água, 400 mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e o volume foi completado com metanol a 20 mL. A solução foi filtrada com filtro micropore 0,22 μm com membrana de Teflon e injetada no espectrômetro de massas.

5.2.8.3 Medidas para amostras de sabão

No caso do sabão não houve a formação de interferentes nos picos próximos ao m/z 86 e 87 e como a concentração de boro é alta, não foi necessário o uso da coluna aniônica nem catiônica.

A quantificação foi feita usando o ácido bórico SRM 952 NIST como *spike*. A Figura 5.9 mostra o branco para abertura da amostra de sabão.

No caso do sabão em pó Minerva, o espectro da amostra, sem adição de *spike*, não apresentou nenhum pico na região de m/z 85 a 88 (Figura 5.10), o que concorda com a composição alegada pelo fabricante. Como não havia boro, utilizou-se como *spike* uma solução de ácido bórico NIST SRM-951 para verificar se a matriz deste sabão não estaria suprimindo os sinais referentes ao boro. As razões obtidas para três amostras com adição de *spike* são apresentadas na tabela 5.11, o que demonstra que a matriz não causa interferência.

Tabela 5.11. Razões isotópicas $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ na amostra de sabão minerva com adição de *spike*.

$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ medida Minerva + adição de <i>spike</i>	NIST medido SRM 951	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ corrigido	Fator de discriminação de massas
$0,2555 \pm 0,0003$	$0,2568 \pm 0,0003$	$0,2480 \pm 0,025$	$1,03 \pm 0,07$
$0,2540 \pm 0,0003$	$0,2542 \pm 0,0003$	$0,2476 \pm 0,025$	$1,03 \pm 0,07$
$0,2535 \pm 0,0003$	$0,2538 \pm 0,0003$	$0,2471 \pm 0,025$	$1,03 \pm 0,07$

A tabela 5.12 mostra as concentrações de boro obtidas para as amostras de sabão analisadas e a Tabela 5.13 mostra os valores de razão isotópica.

Tabela 5.12. Concentrações de B (mg/g) em três diferentes tipos de sabão em pó e o valor da concentração de boro fornecido pelo fabricante.

Amostra Sabão	Concentração (mg/g)
SUN	$59,393 \pm 0,254$
OMO cores	$41,567 \pm 0,254$
Ariel	$69,453 \pm 0,285$
Minerva	$< 3 \text{ ng/g}$

Tabela 5.13. Razões isotópicas $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ no sabão medidas e corrigidas usando uma solução de referência NIST SRM 951 ou SRM 952.

Amostra Sabão	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ medida	NIST medido SRM 951	$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ corrigido	Fator de discriminação de massas	Discriminação de massas em %
SUN	$0,2465 \pm 0,0004$	$0,2466 \pm 0,0003$	$0,2477 \pm 0,0003$	$0,997 \pm 0,003$	0,2
SUN	$0,2469 \pm 0,0004$	$0,2468 \pm 0,0002$	$0,2474 \pm 0,0003$	$0,998 \pm 0,003$	0,2
OMO Cores	$0,2455 \pm 0,0002$	$0,2461 \pm 0,0002$	$0,2467 \pm 0,0002$	$0,995 \pm 0,003$	0,5
NIST SRM 952					
SUN	$0,2461 \pm 0,0002$	$18,75 \pm 0,02$	$0,2468 \pm 0,0003$	$0,997 \pm 0,003$	0,3
SUN	$0,2464 \pm 0,0002$	$18,75 \pm 0,02$	$0,2471 \pm 0,0003$	$0,997 \pm 0,003$	0,3

Figura 5.9. Solução do branco para análise do sabão seguindo o mesmo procedimento para o tratamento da amostra de sabão.

A análise por electrospray de boro em sabão mostrou-se bastante adequada, principalmente devido a não ocorrência de interferências isobáricas na região de m/z de interesse. A importância de se determinar a razão isotópica de boro no sabão está relacionada com a necessidade de traçar a origem de boro na natureza. Este tipo de estudo permite, através da razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$, saber se o boro, por exemplo em águas naturais, é de origem natural ou de origem antropogênica.

Figura 5.10. Espectro da amostra de sabão em pó minerva sem adição de *spike* de boro.

5.3 Conclusões

A principal limitação da técnica de ES-MS para quantificação é a necessidade de haver um mínimo de condutividade na solução para a haver formação do electrospray. O que pode comprometer a ionização do analito de interesse. Para haver um pico com intensidade razoável, em geral, o analito deve estar em concentrações igual ou superior a $1\mu\text{mol/L}$. Assim, devido ao baixo teor de boro em várias matrizes, um procedimento de pré-concentração se faz necessário.

A resina IRA-743 mostrou-se eficiente para pré-concentrar o boro. O rendimento de recuperação do boro na coluna foi na média de 95 %. Para amostras de plantas foi necessário o uso de uma coluna de resina catiônica para eliminar ions interferentes. A

remoção do excesso de fluoreto gerado durante a etapa de conversão foi conseguida com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que também eleva o pH da solução.

Embora Ishikawa e Nakamura [29] afirmem que o BF_4^- forme complexo com manitol, nossos estudos demonstraram o contrário. Aparentemente, os autores se equivocaram com seus resultados porque acreditaram que, mesmo trabalhando com soluções extremamente diluídas, haveria a conversão de borato para tetrafluoroborato.

Desta forma o manitol pode ser utilizado em etapas prévias de tratamento da amostra para evitar a perda de boro por volatilização. No entanto, este não deve estar presente no momento da pré-concentração na resina IRA-743, pois há uma competição, o que reduz drasticamente o rendimento desta etapa.

Este mesmo comportamento é esperado para uma série de outros compostos com características semelhantes de complexação do boro – como por exemplo, açúcares. Assim, antes da pré-concentração em resina, faz-se necessária uma etapa de oxidação da matéria orgânica. Para evitar a perda por volatilização em sistemas abertos, foi utilizada a oxidação com peróxido de hidrogênio em meio básico. Neste meio, o boro está predominantemente na forma de borato, o que previne sua volatilização.

No caso dos sabões, notou-se que não havia necessidade de qualquer procedimento de oxidação. No caso das plantas, a oxidação era obtida já na etapa inicial de calcinação – também em meio alcalino, porém sem a necessidade de H_2O_2 . Este foi utilizado somente na análise de boro em solo para destruição de possíveis complexantes naturais.

De todos os resultados, deve-se destacar aqueles obtidos para folhas de macieira e pessegueiro, cujos valores são compatíveis com aqueles fornecidos pelo NIST. Este fato, aliado às observações experimentais de ausência de interferências isobáricas, mostra que o método é confiável.

Capítulo 6

Conclusões Gerais e Perspectivas

Os equipamentos de ES-MS vêm se tornando cada vez mais populares. Existe um grande número de fabricantes e é possível obter diferentes conformações do equipamento adequando-o para um determinado tipo de estudo, como medidas isotópicas.

As modificações realizadas para introdução de amostra e formação do electrospray foram bem sucedidas. Isto se deve a simplicidade e robustez da fonte aliadas ao fato de se trabalhar à pressão atmosférica. Desta forma, pode-se esperar que o desenvolvimento de fontes mais apropriadas para medições isotópicas, que é uma aplicação nova, seja relativamente simples.

Os principais problemas observados com relação à fonte do electrospray foram a instabilidade e o efeito de memória. No entanto, acreditamos que os dois possam ser melhorados com modificações na fonte. Uma proposta seria retirar o contra-eletrodo e formar o electrospray

direto no cone de amostragem, sem o auxílio de gases. Somente a diferença de campo elétrico entre a ponta do capilar e o cone de amostragem seria suficiente para formar o cone. Já foram feitos alguns testes preliminares que resultaram em diminuição do efeito de memória.

Com a remoção do contra-eletrodo, seria necessário se trabalhar com vazões de amostra bem menores – da ordem de nanolitros por minuto –, o que diminuiria a contaminação do equipamento e é ideal para se trabalhar com pequenas quantidades de amostras.

Uma proposta de otimização desta parte é trabalhar com microestruturas. O que está sendo desenvolvido no laboratório pelo colaborador de pós-doutorado José Alberto Fracassi da Silva para eletroforese capilar e que poderá vir a ser aplicado também para electrospray.

Os resultados dos estudos com complexos metálicos apontaram para algumas importantes características:

1. Há uma tendência de formação de espécies com carga +1 ou -1. Os íons originalmente presentes na fase líquida podem perder ou ganhar ligantes e alterar o estado de oxidação de modo a atingir esta situação.

2. O solvente pode estar envolvido nas etapas de alteração do estado de oxidação do metal.

3. Condições brandas da fonte levam a espectros simples e apropriados para os fins de medidas isotópicas. Condições drásticas levam à formação de espécies "exóticas", mas que mantém a tendência de gerar espécies com carga unitária.

4. A supressão iônica pode comprometer a tentativa de quantificação direta.

Alguns autores têm constatado a possibilidade de especiação de pares como Fe(II)/Fe(III) e Cu(I)/Cu(II). No entanto, nestes estudos

foram utilizados complexantes volumosos e com múltiplas insaturações, o que deve ajudar a acomodar cargas maiores. No entanto, para ligantes pequenos ou monoatômicos como os utilizados em nossos estudos, a especiação não é possível.

Nossos estudos demonstraram também que a idéia geral da utilização de complexos com ligantes monoisotópicos – principalmente no modo íons negativos – é uma maneira bastante interessante para evitar a interferência de íons hidretos e elevar a massa dos íons analisados.

Os estudos sobre medidas isotópicas demonstraram que é possível a utilização de padrão interno e diluição isotópica. O uso da mediana ao invés da média ajuda a minimizar os efeitos de eventuais descargas corona.

O tetrafluoroborato é uma espécie que é facilmente transferida para a fase gasosa e rende espectros bastante simples e convenientes para medidas isotópicas. A conversão borato/tetrafluoroborato é possível a concentrações moderadas de boro e o íon gerado é estável em uma ampla gama de condições.

O efeito de memória é um dos principais obstáculos à implementação da técnica de ES-MS para medições isotópicas de boro. Além das modificações realizadas na fonte – e outras que podem ser feitas –, este efeito pôde ser controlado por etapas de limpeza que atuam de duas maneiras: (1) deposição de camada sólida sobre os resíduos que permanecem no contra-eletrodo e (2) decomposição do tetrafluoroborato residual por hidrólise ácida. Esta segunda estratégia se mostrou mais eficiente e conveniente.

Os exemplos de aplicação do método para determinação da razão isotópica do boro demonstram que a idéia é válida e que alguns cuidados devem ser tomados: (1) evitar a perda de boro por volatilização, (2) evitar a presença de matéria orgânica durante a etapa de pré-concentração, (3)

remover algumas espécies catiônicas interferentes em alguns casos, (4) remover o excesso de fluoreto após a conversão para evitar a corrosão da coluna de sílica e causar seu entupimento.

Fica demonstrado, assim, que a técnica de electrospray – que apresenta uma enorme versatilidade e vem sendo aplicada nos mais variados estudos – é apropriada para medidas isotópicas. ES-MS apresenta vantagens em relação ao ICP-MS devido à possibilidade de trabalhar com espécies poliatômicas e baixa vazão de amostra. Com relação a TIMS, ES-MS apresenta como vantagem a simplicidade de introdução de amostras. No entanto, acreditamos que ESMS não seja uma técnica que suplante as outras em definitivo, sendo necessário avaliar caso a caso qual a mais apropriada.

Bibliografia

- [1] J. Hoefs "Stable Isotopes Geochemistry" ed. 4^o, Springer-Verlog-Germany (1997).
- [2] J.S. Becker, H.J. Dietze, Frsenius J. Anal. Chem. 368 (2000) 23-30.
- [3] B. Koletzo, H. Demmelmair, W. Hartl, ^a kindeman, S. Koletzo, T. Suerwarld, P. Szitanyi, Early Human Develop. 53 (1998) 577-597.
- [4] I.N. Levine, "Physical Chemistry".Ed 3^o, Ed.MacGraw-Hill, Singapura (1988) - capítulos 22 e 23.
- [5] S.M. Libes, "An Introduction to marine Biogeochemistry" Ed John Wiley & Sons (1992) capítulo 29.
- [6] M.C.B. Moraes, J.G.A. Brito Neto, V.F. Juliano, C.L. do Lago, Int. J. Mass Spectrom. 178 (1998) 129–141.
- [7] W.A. Brand, J. of Mass Spectrom. 31 (1996) 225-235
- [8] W.M.Augenstein, J. Chromatogr. A 842 (1999) 351-371.
- [9] I.T. Platzner, K. Habasft, A.J. Walder, A. Goetz, "Modern Isotope Ratio Mass Spectrometry" – Chemical Analysis, vol. 145, Ed 1 , John Wiley & Sons (1997).
- [10] K.G. Heumann, S.M. Gallus, G. Rädlinger, J. Vogl, J. Anal. At. Spectrom.,13 (1998) 1001-1008.
- [11] S.J.G.Galer, Chem. Geol. 157 (1999) 255-274.
- [12] H.P. Longerich, B.J. Fryer, D.F. Strong, Spectrochim. Acta 42B, (1987) 39-48.

-
- [13] I.S. Begley, B.L. Sharp, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 395-402.
- [14] P.E. Miller, M.B. Denton, *J. of Chem. Educ.* 63 (1986) 617-622
- [15] J.K. Aggarwal, M.R. Palmer, *Analyst* 120 (1995) 1301-1307.
- [16] R.N. sah, P.H. Brown, *Microchem. J.*, 56 (1997) 285-304.
- [17] D.C. Gregoire, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2479-2484.
- [18] M. Shima *J. Geophy. Res.* 76 (1962) 4521-4523.
- [19] S. Eisenhut, K.G. Heumann, A. Vengosh, *Fres.J. Anal. Chem.* 354 (1996) 903-909
- [20] A. Sanyal, N.G. Hemming, G.N. Hanson, W. S. Broecker, *Nature* 373 (1995) 234-236.
- [21] T. Ishikawa, E. Nakamura, *Nature* 370 (1994) 205-208.
- [22] E. Nakamura, T. Ishikawa, J.L. Birck, C.J. Allègre, *Chem. Geol.* 94 (1992) 193-204.
- [23] N.G. Hemming, G.N. Hanson, *Chem. Geol.* 114 (1994) 147-156.
- [24] S. Barth, *Chem. Geol.* 143 (1997) 255-261.
- [25] S. Tonarini, M. Pennisi, W. P. Leeman, *Chem. Geol.* 142 (1997) 129-137.
- [26] H.E. Gäbler, A. Barh, *Chem. Geol.* 156 (1999) 323-330.
- [27] T. Wilke, H. Woldner, G. Wunsch, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1083-1086.
- [28] F. Chartier, M. Tabarant, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1187-1193.

-
- [29] T. Ishikawa, E. Nakamura, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2612-2616.
- [30] A. Makishima, E. Nakamura, T. Nakano, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3754-3759.
- [31] R.B. Cole, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons, USA, (1997).
- [32] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4671-4675.
- [33] A.T. Blades, M.G. Ikonomou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2109-2114.
- [34] A.M. Bond, R. Colton, A. D'Agostino, A.J. Downard, J.C. Traeger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1691-1695.
- [35] J. F. De la Mora, G. J. Van Berkel, C.G. Enke, R.B. Cole, M.M. Sanchez, J.B. Fenn, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 939-952.
- [36] D.C. Taflin, T.L. Ward, E.J. Davis, *Langmuir* 5 (1975) 376-384.
- [37] A. Gómez, K. Tang, *Phys. Fluids* 6 (1994) 404-408.
- [38] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Fergunson, M.B.J. Alice, *Chem. Phys.* 49 (1968) 2240-2249.
- [39] B.A. Thomson, J.V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4451-4463.
- [40] Cd-rom da Micromass sobre o platform II
- [41] G. Wang, R. B. Cole, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3702-3708.
- [42] A. T. Blades, P. Jayaweera, M.G. Ikonomou, P. Kerbale *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 101 (1990) 325-336.
- [43] A. T. Blades, P. Jayaweera, M.G. Ikonomou, P. Kerbale *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 102 (1990) 251-267.

-
- [44] G.R. Agnes, G.Horlick, Appl. Spectrosc. 46 (1992) 401-406.
- [45] G.R. Agnes, G.Horlick, Appl. Spectrosc. 48 (1994) 649-654.
- [46] G.R. Agnes, G.Horlick, Appl. Spectrosc. 48 (1994) 655-661.
- [47] I.I. Stewart, G. Horlick, Anal. Chem. 66 (1994) 3983-3993.
- [48] G.R. Agnes, G. Horlick, Appl. Spectrosc. 49 (1995) 324-334.
- [49] M.E. Ketterer and J.P. Guzowski, Anal. Chem. 68 (1996) 883-887.
- [50] A. Zuberbuhler, Helv. Chim. Acta. 53 (1970) 173-174.
- [51] G. J. Van Berkel, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 773-783.
- [52] V. Kertesz, G.J. Van Berkel, J. Mass Spectrom. 36 (2001) 204-210.
- [53] M.H. Abraham, G.F. Johnston, T.R. Spalding, J. Inorg. Nucl. Chem. 30 (1968) 2167-2171.
- [54] A.R.S. Ross, M.G. Ikonomou, J.A. Jeffrey, K.J.Orians., Anal. Chem. 70 (1998) 2225-2235.
- [55] J. G. A. Brito Neto and C. L. do Lago, Determination of Atomic Isotope Patterns from Mass Spectra of Molecular Ions Containing Multiple Polyisotopic Elements, J. of Mass Spectrom. (submetido)
- [56] E. Kreyszig, "Introductory mathematical Statistics - Principals and Methods" Ed. John Wiley and Sons, Singapore.
- [57] M.C.B. Moraes, C.L. do Lago, "Eliminação de Interferência de Íons M-nH para Análise de Padrões Isotópicos de Espectros de Massas de Baixa Resolução", Dissertação de Mestrado- IQ-USP (1997)

-
- [58] P.J Rousseeuw, J. Chemom. 5 (1991) 1–20.
- [59] C.E. Melton, L.º Gilpatrick, R.Baldock, R.M.Healy, Anal.Chem. 28 (1956) 1049-1051.
- [60] A. Al-Ammar, R.K. Gupta, R.M. Barnes, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 1077–1084.
- [61] A.S. Al-Ammar, R.K. Gupta, R.M. Barnes, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 629–635.
- [62] S. Evans, U.J. Krahenbuhl,, J. Anal. At. Spectrom. 9 (1994) 1249-1253..
- [63] T. Probst, P. Lemmem. B. Larson, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 1115-1121.
- [64] F. Smith, D. Wiederin, C. Egan, R. Surfass, R.S. Houk, Anal. Chim. Acta 248 (1991) 229.
- [65] A. Al-Ammar, E. Reitznerová, R. M. Barnes, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 1861-1867.
- [66] K.G. Heumann Fresenius Z. Anal. Chem. 325 (1986) 661-666.
- [67] H. Klinkenberg, W.V. Borm, F.Souren, Spectrochim. Acta Part B 51 (1996) 139-153.
- [68] A.A. Van Heuzen, T. Hoekstra, B. Van Wingerden, J. Anal At. spectrum. 4 (1989) 483-489.
- [69] J. D. Fasset, P.J. Paulsen, Anal. Chem. 61 (1989) 643A.
- [70] T. Catterick, B. Fairman, C. Harrington, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 1009-1013.

-
- [71] I N. Ingri, G. Lagerstrom, M. Frydman, L.G. Sillén, *Acta. Chem, Scand.* 11 (1957) 1034–1057.
- [72] C. A. Wanser *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 1209-1215.
- [73] L. Maya, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 39 (1977) 225-231.
- [74] S.L. Grassino, D.N. Hume, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 33 (1971) 421-428.
- [75] C.J. Hill, R.P. Lash, *Anal.Chem.* 52 (1980) 24-27.
- [76] R.M. Carlson, J.L.Paul, *Anal.Chem.* 40 (1968) 1292-1295.
- [77] M.O. Simonnot, C Castel, M. Nicolai, C. Rosin, M Sardin,H. Jauffret, *Wat. Res.* 34 (2000) 109-116.[60]
- [78] Rhom and Hasas Amberlite IRA-743. Product Data Sheet PDS 0576A (1997).
- [79] C. Feldman, *Anal.Chem.* 33 (1961) 1916-1920.
- [80] Y.K. Xiao, R.D. Vocke jr., G.H. Swihart, Y. Xiao, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5203-5207.
- [81] S.G. Penn, H. Hu, P.H. Brown, C.B. Lebrilla, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2471-2477.
- [82] j. Deson, R. Rosset; *Bull. Société Chim. France* 8, (1968) 4307-4310.
- [83] F. Pinon, J. Deson,R. Rosset, *Bull. Société Chim. France* 8, (1968) 3454-3461.
- [84] K. Yoshimura, Y. Miyazaki, F Ota, S. Matsuoka, H. Sakashita, *J. Chem. Soc. Trans.* 94 (1998) 683-689.

-
- [85] A. Sonoda, Y. Makita, K. Ooi, N. Takagi, T. Hirotsu, Bull. Chem. Soc. Jpn. 73 (2000) 1131-1133.
- [86] E. Kiss, Anal. Chim. Acta 211 (1988) 243-256.
- [87] R.N. Sah, P.H. Brown, Plant and Soil 193 (1997) 15-33.
- [88] P.P. Power, W.G. woods, Plant and Soil 193 (1997) 1-13.

Anexos

Planilhas de cálculos

Mediana da razão isotópica e seu desvio padrão
Fator de correção do boro e seu desvio padrão
Abundâncias isotópicas e seu desvio padrão

Diluição Isotópica
Aplicações da diluição isotópica
plantas
solo
sabões

Cálculo da mediana e do Desvio Absoluto da Mediana (MAD)

Arquivo de dados da amostra

Boro :=

C:\V290404cr.dat

Arquivo de dados da amostra certificada

NIST :=

C:\V290422cr.dat

Valor ¹⁰B/¹¹B certificado: NISTcert := 0.2473

Desvio padrão da medida: dpmst := 0.0002

Cálculos

Cálculo da razão e das medianas

$i := 0..rows(Boro) - 1$ $j := 0..rows(NIST) - 1$

Razão medida da amostra: $r_{Boro_i} := \frac{Boro_{i,2}}{Boro_{i,3}}$

Razão medida da amostra certificada: $r_{NIST_j} := \frac{NIST_{j,2}}{NIST_{j,3}}$

Cálculo da mediana	MedianaNIST := median(rNist)	MedianaNIST = 0.24725
	MedianaBoro := median(rBoro)	MedianaBoro = 0.24692

Cálculo da razão e das medianas

➤ Cálculo do MAD

Cálculo dos desvios absolutos da mediana da amostra

$$MADBoro := \frac{1.483 \cdot \text{median} \left(\begin{array}{l} \text{temp}_0 \leftarrow 0 \\ \text{for } i \in 0.. \text{rows}(\text{Boro}) - 1 \\ \text{temp}_i \leftarrow \left| r_{Boro,i} - \text{MedianaBoro} \right| \end{array} \right)}{\sqrt{\text{rows}(\text{Boro})}}$$

Cálculo dos desvios absolutos da mediana da amostra certificada

$$MADNIST := \frac{1.483 \cdot \text{median} \left(\begin{array}{l} \text{temp}_0 \leftarrow 0 \\ \text{for } j \in 0.. \text{rows}(\text{NIST}) - 1 \\ \text{temp}_j \leftarrow \left| r_{NIST,j} - \text{MedianaNIST} \right| \end{array} \right)}{\sqrt{\text{rows}(\text{NIST})}}$$

➤ Cálculo do MAD

➤ Cál. do fator do B corrigido

$$\text{Fator de Discriminação } F_d: \quad F(\text{MedianaNIST}, \text{NISTcert}) := \frac{\text{MedianaNIST}}{\text{NISTcert}}$$

$$F_d := F(\text{MedianaNIST}, \text{NISTcert})$$

$${}^{10}B/{}^{11}B \text{ corrigido:} \quad \text{Borocorr}(F_d, \text{MedianaBoro}) := \frac{\text{MedianaBoro}}{F(\text{MedianaNIST}, \text{NISTcert})}$$

$$Boroc := \text{Borocorr}(F_d, \text{MedianaBoro})$$

➤ Cál. do fator do B corrigido

➤ erro do fator de discriminação

$$\text{Fator de discriminação} \quad F_d = 0.9998 \quad Boroc = 0.24697$$

$$\sigma F(\text{NISTcert}, d_{\text{pnist}}, \text{MedianaNIST}, \text{MADNIST}) := \sqrt{d_{\text{pnist}}^2 \left(\frac{d}{d_{\text{NISTcert}}} F(\text{MedianaNIST}, \text{NISTcert}) \right)^2 + (\text{MADNIST})^2 \left(\frac{d}{d_{\text{MedianaNIST}}} F(\text{MedianaNIST}, \text{NISTcert}) \right)^2}$$

$$\sigma F := \sigma F(\text{NISTcert}, d_{\text{pnist}}, \text{MedianaNIST}, \text{MADNIST})$$

erro do fator de discriminação

Cálculo das Abundâncias e desvio

Cálculo da Abundância do ^{10}B
e ^{11}B e dos desvios da abundância

Abundância dos isótopos

$$B_{a10}_i := \text{BorO}_{i,2}$$

$$B_{a11}_i := \text{BorO}_{i,3}$$

$$A_{a10B}_i := \frac{(B_{a10}_i) \cdot 100}{(B_{a10}_i) + (B_{a11}_i)}$$

$$A_{a11B}_i := \frac{(B_{a11}_i) \cdot 100}{(B_{a10}_i) + (B_{a11}_i)}$$

$$\text{median}(A_{a10B}) = 19.80254$$

$$\text{MedianaA10B} := \text{median}(A_{a10B})$$

$$\text{median}(A_{a11B}) = 80.19746$$

$$\text{MedianaA11B} := \text{median}(A_{a11B})$$

$$B_{s10}_j := \text{NIST}_{j,2}$$

$$B_{s11}_j := \text{NIST}_{j,3}$$

$$A_{s10B}_j := \frac{(B_{s10}_j) \cdot 100}{(B_{s10}_j) + (B_{s11}_j)}$$

$$A_{s11B}_j := \frac{(B_{s11}_j) \cdot 100}{(B_{s10}_j) + (B_{s11}_j)}$$

$$\text{median}(A_{s10B}) = 19.82369$$

$$\text{MedianAS10B} := \text{median}(A_{s10B})$$

$$\text{median}(A_{s11B}) = 80.17631$$

$$\text{MedianAS11B} := \text{median}(A_{s11B})$$

Cálculo dos desvios das Abundâncias

Cálculo dos desvios absolutos da Abundância da amostra

$$1.483 \cdot \text{median} \left[\begin{array}{l} \text{temp}_i \leftarrow 0 \\ \text{for } i \in 0.. \text{rows}(\text{Boro}) - 1 \\ \text{temp}_i \leftarrow |(A_{s10B})_i - \text{MedianaA10B}| \end{array} \right] \cdot \text{temp} \\ \text{MADA10B} := \frac{\quad}{\sqrt{\text{rows}(\text{Boro})}}$$

$$\text{MADA11B} := \text{MADA10B}$$

Cálculo dos desvios absolutos da Abundância da amostra certificada

$$1.483 \cdot \text{median} \left[\begin{array}{l} \text{temp}_j \leftarrow 0 \\ \text{for } j \in 0.. \text{rows}(\text{NIST}) - 1 \\ \text{temp}_j \leftarrow |(A_{s10B})_j - \text{MedianaA10B}| \end{array} \right] \cdot \text{temp} \\ \text{MADS10B} := \frac{\quad}{\sqrt{\text{rows}(\text{NIST})}}$$

▢ Cálculo das Abundâncias e desvio

▢ Cálculo do erro do B corrigido

Cálculo do erro do Boro corrigido

Fator de discriminação

$$Fd = 0.9998$$

Erro do Fator de discriminação: $\sigma F = 0.00157$

$^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ corrigido:

$$\text{Boroc} = 0.24697$$

$$\sigma_{\text{Boroc}}(Fd, \sigma F, \text{MedianaBoro}, \text{MADBoro}) := \sqrt{\left[\sigma F^2 \cdot \left(\frac{d}{dF \cdot d} \text{Borocorr}(Fd, \text{MedianaBoro}) \right)^2 \right] \dots + \text{MADBoro}^2 \cdot \left(\frac{d}{d\text{MedianaBoro}} \text{Borocorr}(Fd, \text{MedianaBoro}) \right)^2}$$

$$\sigma_{\text{Boroc}} := \sigma_{\text{Boroc}}(Fd, \sigma F, \text{MedianaBoro}, \text{MADBoro})$$

➤ Cálculo do erro do B corrigido

➤ Cálculo do erro do B corrigido

Mediana e o MAD da amostra:

MedianaBoro = 0.24692

MADBoro = 0.0003

Mediana e o MAD da amostra
certificada:

MedianaNIST = 0.24725

MADNIST = 0.00033

Fator de discriminação:

Fd = 0.9998

Erro do fator de discriminação:

$\sigma_F = 0.00157$

$^{10}B/^{11}B$ corrigida:

Boroc = 0.24697

Erro da $^{10}B/^{11}B$ corrigida:

$\sigma_{Boro} = 0.0003$

Abundância do

^{10}B e o desvio:

MedianaA ^{10}B = 19.80254

MADA ^{10}B = 0.01927

^{11}B e o desvio:

MedianaA ^{11}B = 80.19746

MADA ^{11}B = 0.01927

Abundância do
certificado

^{10}B e o desvio:

MedianaS ^{10}B = 19.82369

MADS ^{10}B = 0.02146

^{11}B e o desvio:

MedianaS ^{11}B = 80.17631

MADS ^{10}B = 0.02146

Diluição Isotópica

➤ Implementação dos Cálculos

➤ Cálculo da razão

$$r(l_{86}, l_{87}) := \frac{l_{86}}{l_{87}} \quad \sigma_r(l_{86}, \sigma_{86}, l_{87}, \sigma_{87}) := \sqrt{\sigma_{86}^2 \cdot \left(\frac{d}{dl_{86}} r(l_{86}, l_{87}) \right)^2 + \sigma_{87}^2 \cdot \left(\frac{d}{dl_{87}} r(l_{86}, l_{87}) \right)^2}$$

➤ Cálculo da razão

➤ Cálculo do número de moles

$$n(m_{ab}, M_{ab}, V, v) := \frac{m_{ab}}{M_{ab} \cdot V} \cdot v$$

$$\sigma_n(m_{ab}, \sigma_{mab}, M_{ab}, \sigma_{Mab}, V, \sigma_v, v, \sigma_v) :=$$

$$\sqrt{\sigma_{mab}^2 \cdot \left(\frac{d}{dm_{ab}} n(m_{ab}, M_{ab}, V, v) \right)^2 \dots + \sigma_{Mab}^2 \cdot \left(\frac{d}{dM_{ab}} n(m_{ab}, M_{ab}, V, v) \right)^2 \dots + \sigma_v^2 \cdot \left(\frac{d}{dv} n(m_{ab}, M_{ab}, V, v) \right)^2 \dots + \sigma_v^2 \cdot \left(\frac{d}{dv} n(m_{ab}, M_{ab}, V, v) \right)^2}$$

➤ Cálculo do número de moles

▼ Cálculo da Concentração

$$C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) := \frac{\eta_e \cdot S_{10} - r_e \cdot S_{11}}{m_e \cdot A_{11} \cdot r_e - A_{10}}$$

$$\sigma_C(\eta_e, \sigma_{\eta_e}, m_e, \sigma_{m_e}, r_e, \sigma_{r_e}, A_{10}, \sigma_{A_{10}}, A_{11}, \sigma_{A_{11}}, S_{10}, \sigma_{S_{10}}, S_{11}, \sigma_{S_{11}}) :=$$

$a \leftarrow \sigma_{\eta_e}^2 \cdot \left(\frac{d}{d\eta_e} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$	$a \leftarrow a + \sigma_{m_e}^2 \cdot \left(\frac{d}{dm_e} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$
$a \leftarrow a + \sigma_{r_e}^2 \cdot \left(\frac{d}{dr_e} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$	$a \leftarrow a + \sigma_{A_{10}}^2 \cdot \left(\frac{d}{dA_{10}} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$
$a \leftarrow a + \sigma_{A_{11}}^2 \cdot \left(\frac{d}{dA_{11}} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$	$a \leftarrow a + \sigma_{S_{10}}^2 \cdot \left(\frac{d}{dS_{10}} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$
$a \leftarrow a + \sigma_{S_{11}}^2 \cdot \left(\frac{d}{dS_{11}} C(\eta_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11}) \right)^2$	$\sqrt{a}$

▼ Cálculo da Concentração

▼ Tratamento da Planilha

$$N := D_{0,0}$$

$$i := 0..N - 1$$

$$G := \text{submatrix}(D, 1, \text{rows}(D) - 1, 1, N) \qquad G := G^T$$

$$m_{ab} := G^{(0)} \qquad \sigma_{mab} := G^{(1)}$$

$$M_{ab} := G^{(2)} \qquad \sigma_{Mab} := G^{(3)}$$

$$Y := G^{(4)} \qquad \sigma_Y := G^{(5)}$$

$$v := G^{(6)} \qquad \sigma_v := G^{(7)}$$

$$m_e := G^{(8)} \qquad \sigma_{me} := G^{(9)}$$

$$r_e := G^{(10)} \qquad \sigma_{re} := G^{(11)}$$

$$A_{10} := G^{(12)} \qquad \sigma_{A10} := G^{(13)}$$

$$A_{11} := G^{(14)} \qquad \sigma_{A11} := G^{(15)}$$

$$S_{10} := G^{(16)} \qquad \sigma_{S10} := G^{(17)}$$

$$S_{11} := G^{(18)} \qquad \sigma_{S11} := G^{(19)}$$

$$n_e := \overrightarrow{n(m_{ab}, M_{ab}, v, v)}$$

$$\sigma_{ne} := \overrightarrow{\sigma n(m_{ab}, \sigma_{mab}, M_{ab}, \sigma_{Mab}, v, \sigma_v, v, \sigma_v)}$$

$$C_B := \overrightarrow{C(n_e, m_e, r_e, A_{10}, A_{11}, S_{10}, S_{11})}$$

$$\sigma_{CB} := \overrightarrow{\sigma C(n_e, \sigma_{ne}, m_e, \sigma_{me}, r_e, \sigma_{re}, A_{10}, \sigma_{A10}, A_{11}, \sigma_{A11}, S_{10}, \sigma_{S10}, S_{11}, \sigma_{S11})}$$

Diluição Isotópica

► Implementação dos Cálculos

D :=

	1	2	3	4		
massa H ₃ BO ₃	0.0604	0.0604	0.0604	0.0604		
desvio	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		
peso molecular H ₃ BO ₃	61.04	61.04	61.04	61.04		
desvio	0.01	0.01	0.01	0.01		
massa da solução	10.2372	10.2372	10.2372	10.2372		
desvio	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005		
massa da alíquota	0.0968	0.0991	0.0968	0.0965		
desvio	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		
massa da amostra	0.3524	0.3248	0.3244	0.3325		
desvio	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		
razão 10/11	10.99	10.77	10.95	10.92		
desvio	0.08	0.05	0.03	0.02		
A10	19.91	19.91	19.91	19.91		
desvio	0.04	0.04	0.04	0.04		
A11	80.09	80.09	80.09	80.09		
desvio	0.04	0.04	0.04	0.04		
S10	99.059	99.059	99.059	99.059		
desvio	0.003	0.003	0.003	0.003		
S11	0.941	0.941	0.941	0.941		
desvio	0.003	0.003	0.003	0.003		

► Tratamento da Planilha

Resultados para amostras de folhas de algodoeiro
30HC EI

Em mol/g:

$CB_1 =$
$2.73811 \cdot 10^{-6}$
$3.1122 \cdot 10^{-6}$
$2.98682 \cdot 10^{-6}$
$2.91413 \cdot 10^{-6}$

$\sigma CB_1 =$
$2.34184 \cdot 10^{-8}$
$1.76527 \cdot 10^{-8}$
$1.12065 \cdot 10^{-8}$
$8.58917 \cdot 10^{-9}$

Em ppm:

$CB_1 \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$
29.57154
33.61179
32.25771
31.47255

$\sigma CB_1 \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$
0.25292
0.19065
0.12103
0.09276

Diluição Isotópica

► Implementação dos Cálculos

D :=

	3	1	2	3		
massa H ₃ BO ₃	0.0604	0.0604	0.0604			
desvio	0.0001	0.0001	0.0001			
peso molecular H ₃ BO ₃	61.04	61.04	61.04			
desvio	0.01	0.01	0.01			
massa da solução	10.2372	10.2372	10.2372			
desvio	0.0005	0.0005	0.0005			
massa da alíquota	0.0975	0.0991	0.0932			
desvio	0.0001	0.0001	0.0001			
massa da amostra	0.3908	0.3748	0.3698			
desvio	0.0001	0.0001	0.0001			
razão 10/11	10.59	10.77	10.52			
desvio	0.08	0.05	0.03			
A10	19.91	19.91	19.91			
desvio	0.04	0.04	0.04			
A11	80.09	80.09	80.09			
desvio	0.04	0.04	0.04			
S10	99.059	99.059	99.059			
desvio	0.003	0.003	0.003			
S11	0.941	0.941	0.941			
desvio	0.003	0.003	0.003			

► Tratamento da Planilha

Resultados para amostras de folhas de pessegueiro e macieira
padrões do NIST

Em mol/g:

$CB_1 =$
$2.59407 \cdot 10^{-6}$
$2.69702 \cdot 10^{-6}$
$2.64028 \cdot 10^{-6}$

$\sigma CB_1 =$
$2.28971 \cdot 10^{-8}$
$1.52921 \cdot 10^{-8}$
$1.01799 \cdot 10^{-8}$

Em ppm:

pessegueiro

macieira

$CB_1 \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$
28.01591
29.12783
28.51506

$\sigma CB_1 \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$
0.24729
0.16515
0.10994

Diluição Isotópica

► Implementação dos Cálculos

D :=

	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
massa H3BO3		0.615	0.615	0.615	0.615	0.615	0.615	0.615	0.615	0.615
desvio		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
peso molecular H3BO3		61.04	61.04	61.04	61.04	61.04	61.04	61.04	61.04	61.04
desvio		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
massa da solução		100.01	100.01	100.01	100.01	100.01	100.01	100.01	100.01	100.01
desvio		0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
massa da alíquota		1.0051	1.0152	1.2501	1.1631	1.1742	1.2741	1.1461	1.1832	1.1353
desvio		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
massa da amostra		0.1058	0.0991	0.1059	0.0993	0.0997	0.1003	0.1001	0.1044	0.1025
desvio		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
razão 10/11		0.4626	0.6051	0.6193	0.6172	0.6184	0.5024	0.4635	0.4695	0.4592
desvio		0.0006	0.0006	0.0005	0.0005	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
A10		19.91	19.91	19.91	19.91	19.91	19.91	19.91	19.91	19.91
desvio		0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
A11		80.09	80.09	80.09	80.09	80.09	80.09	80.09	80.09	80.09
desvio		0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
S10		99.059	99.059	99.059	99.059	99.059	99.059	99.059	99.059	99.059
desvio		0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
S11		0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941
desvio		0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003

► Tratamento da Planilha

Resultados para amostras de sabão

Em mol/g:

$CB_i =$
0.00551
0.00356
0.00394
0.00394
0.00395
0.00621
0.00661
0.00636
0.00652

Em ppm:

$CB_i \cdot 10^8 \cdot 10^{-3} =$
59.47634
38.44729
42.60051
42.51183
42.60615
67.03196
71.38102
68.73344
70.46553

Sun

OMO

Ariel

$\sigma CB_i \cdot 10^8 \cdot 10^{-3} =$
0.25291
0.11684
0.11986
0.12087
0.1158
0.22252
0.2644
0.24906
0.26427

Diluição Isotópica Amostras de solo

Implementação dos Cálculos

D :=

	1	2	3	4
massa H ₃ BO ₃	0.01632	0.01632	0.01632	0.01632
desvio	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
peso molecular H ₃ BO ₃	61.04	61.04	61.04	61.04
desvio	0.01	0.01	0.01	0.01
massa da solução	11.989	11.989	11.989	11.989
desvio	0.001	0.001	0.001	0.001
massa da alíquota	0.0956	0.0961	0.09321	0.09256
desvio	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
massa da amostra	10.6165	10.6134	10.4834	14.6172
desvio	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
razão 10/11	3.57	2.61	2.58	1.826
desvio	0.03	0.04	0.03	0.006
A10	19.31	19.31	19.31	19.31
desvio	0.04	0.04	0.04	0.04
A11	80.69	80.69	80.69	80.69
desvio	0.04	0.04	0.04	0.04
S10	99.071	99.071	99.071	99.071
desvio	0.003	0.003	0.003	0.003
S11	0.934	0.934	0.934	0.934
desvio	0.003	0.003	0.003	0.003

Tratamento da Planilha

Resultados

Em mol/g:

C_{B_i}	σ_{CB_i}
$7.40248 \cdot 10^{-8}$	$6.74133 \cdot 10^{-10}$
$1.04576 \cdot 10^{-7}$	$1.77018 \cdot 10^{-9}$
$1.04005 \cdot 10^{-7}$	$1.34071 \cdot 10^{-9}$
$9.33305 \cdot 10^{-8}$	$1.261 \cdot 10^{-10}$

Em ppm:

$C_{B_i} \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$	$\sigma_{CB_i} \cdot 10.8 \cdot 10^6 =$
0.79947	0.00728
1.12942	0.01912
1.12326	0.01448
1.00797	0.00136