



**Universidade de
Aveiro**
2010

Departamento de Química

**Paulino Vicente
Muteto**

**Desenvolvimento de um Sensor de Massa para
quantificar o ião Fluoreto**



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

2010

**Paulino Vicente
Muteto**

Desenvolvimento de um Senso de Massa para quantificar o íon Fluoreto

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra Dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha mãe Regina e ao meu falecido pai, pela educação cuidada, paciente e encorajadora, aos meus irmãos pelo afecto e carinho por eles demonstrados durante todo o meu percurso estudantil.

o júri

Presidente

Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas e instituições, que de uma ou doutra forma, directa ou indirectamente, com o seu contributo, tornaram possível a concretização deste trabalho.

À minha orientadora, Doutora Maria Teresa Seabra Dos Reis Gomes, que foi determinante para a concretização do trabalho, pela sua direcção eficaz, sua pré-disposição permanente para a discussão dos resultados e por todo o inestimável apoio prestado nas sucessivas etapas do trabalho.

Ao Doutor João António Baptista Pereira De Oliveira pela ajuda que sempre me concedeu ao longo do trabalho.

A todos os docentes, funcionários, colegas do Departamento de Química quero deixar expresso o meu reconhecimento e gratidão.

palavras-chave

Sensores químicos, sensores acústicos, calixpirróis, cristais piezoelétricos de quartzo, fluoreto.

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um sensor químico de massa, para a determinação de iões fluoreto, baseado na utilização de um cristal piezoelétrico de quartzo.

Como a sensibilidade e selectividade dependem do revestimento aplicado no cristal piezoelétrico de quartzo, a sua selecção é de extrema importância. Dos compostos testados em trabalhos anteriores tinha sido seleccionado, de entre vários calixpirróis, o octametilcalix[4]pirrol-naftoquinona por ter apresentado maior estabilidade e sensibilidade ao ião fluoreto.

Um cristal com uma quantidade de revestimento que produziu um decréscimo de frequência de 22kHz, permitiu obter uma calibração linear entre 4 e 80ppm. A sensibilidade do sensor nesta gama de concentração foi de 0,45Hz/ppm. É possível detectar o ião fluoreto em concentrações a partir de 3,66ppm.

Utilizando a metodologia do "Interferente Fixo", recomendada pela IUPAC para estudo de interferentes, foram estudados e determinados neste trabalho os coeficientes de selectividade do sensor para o ião fluoreto relativamente a diversos iões interferentes, aqui colocados em ordem crescente dos seus valores experimentais: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{Ac}^- < \text{F}_3\text{P}^- < \text{NO}_3^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{I}^- < \text{F}^-$.

Utilizando o sensor baseado num cristal revestido com o octametilcalix[4]pirrol-naftoquinona foi desenvolvida uma metodologia que permitiu analisar o ião fluoreto em comprimidos usados na profilaxia da cárie dentária: "Zymafluor®".

Usando a técnica de injeção em fluxo, conseguiu-se um tempo de resposta e de recuperação, de aproximadamente 25s após cada injeção, e um tempo de vida da calibração do sensor de 8 semanas.

O valor experimental para o teor em fluoreto por comprimido foi de $0,44 \pm 0,02\text{mg}$, e estando o valor indicado pelo fabricante de 0,45mg compreendido no intervalo de confiança (95%).

Keywords

Chemical sensors, acoustic wave sensors, calixpyrroles, quartz piezoelectrics crystals, fluoride.

Abstract

The aim of the work was to develop a chemical sensor based on a piezoelectric quartz crystal for the determination of fluoride ions.

Because sensitivity and selectivity depend on the coating applied onto the piezoelectric quartz crystal, its selection is of utmost importance. Previous works have shown that among the calixpyrrol compounds tested, the sensor with octamethylcalix[4] pyrrole-naftoquinone was the one with which it was obtained the best stability and the highest sensitivity to fluoride ion.

A crystal with a coating amount that produced a frequency decrease of 22kHz, showed a linear calibration range between 4 and 80ppm. The sensitivity of the sensor was 0.45Hz/ppm fluoride ion in concentrations as low as 3,66ppm could be detected.

Using the methodology of fixed interference, recommended by IUPAC, the selectivity coefficients have been found to follow the ascending order: format <chloride <bromide <acetate <phosphate <nitrate <sulphate <iodide <fluoride.

Using the sensor based on a crystal coated with octamethylcalix[4]pyrrole-naftoquinone a quantitative methodology was developed to analyse fluoride ion in the tablets used for dental caries prophylaxy: Zymafluor[®].

The flow injection analysis allowed to obtain a fast response and recovery time of approximately 25s after each injection. The lifetime of the sensor calibration was 8 weeks.

The fluoride concentration experimentally found for a Zymafluor[®] tablet was 0.44 ± 0.02 mg. The reference value obtained from the manufacture was 0.45mg, which in within the confidence interval of analysis (95%).

Índice geral

Índice geral.....	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. IÃO FLUORETO: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS DE ANÁLISE	5
2.1. Ião Fluoreto e sua importância	7
2.2. Métodos de análise do ião Fluoreto.....	8
2.2.1 Cromatografia Iônica.....	8
2.2.2 Métodos potenciométricos	9
2.2.3 Métodos colorimétricos	11
3. SENSORES QUÍMICOS DE MASSA	13
3.1. Piezoelectricidade.....	16
3.2. Cristais piezoelétricos de quartzo	18
3.3. Microbalança de Cristais de Quartzo (QCM).....	20
3.4. Microbalança de Cristais de Quartzo em Líquidos	21
3.5. Vantagens e desvantagens das QCM.....	22
3.6. Aplicações das microbalanças de cristais de quartzo.....	23
3.7. Revestimento do cristal de quartzo.....	23

3.7.1. Critérios para a escolha do revestimento	23
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Reagentes.....	29
4.2. Materiais	29
4.3. Procedimento experimental para Análise por Injecção em Fluxo	30
4.4. Procedimento da aplicação do revestimento.....	31
4.5. Estudo dos aniões interferentes.....	32
4.6. Solubilização e digestão da Amostra	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Reversibilidade do sensor baseado num cristal piezoeléctrico revestido com OMCP-naftoquinona.....	37
5.2. Zona de calibração linear e sensibilidade	38
5.3. Estudo dos interferentes.....	40
5.4. Análise da sensibilidade do sensor	41
5.5. Determinação do ião fluoreto nos comprimidos Zymafluor®	43
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Representação da onda que se propaga através do material, perpendicularmente às faces do cristal piezoeléctrico de quartzo.....	17
Figura 2: Cristal piezoeléctrico de quartzo com eléctrodos.....	18
Figura 3: Estrutura cristalina de quartzo com representação de eixos coordenados, orientações de cortes AT e BT de cristais de quartzo, pertencentes aos cortes da família Y [20].	19
Figura 4: Estruturas do a) octametilcalix[4]pirrol (OMCP), b) Octametilcalix[4]pirrol–naftoquinona (OMCP-naftoquinona) e c) Octametilcalix[4]pirrol–indenodiona	24
Figura 5: Octametilcalix[4]pirrol e as interconversões entre as conformações alternada-1,3 e a conformação em cone.	25
Figura 6: Mecanismo da ligação anião-hidrogénio resultante da transferência parcial de carga do pirrol rico em electrões para o “braço” pobre em electrões.....	25
Figura 7: Desenho esquemático do arranjo experimental para a técnica FIA com detecção por QCM.	30
Figura 8: Spin coater Delta 10TT, usado para aplicar o composto de revestimento no cristal.....	32
Figura 9: Frequência do cristal piezoeléctrico antes e depois da injeção de 0,5mL de uma solução de ião fluoreto de 34,83ppm.	37
Figura 10: Curva de calibração do ião fluoreto.	38
Figura 11: Recta de calibração para o ião fluoreto na zona linear.	39
Figura 12: Coeficientes de selectividade do OMCP-naftoquinona para os aniões estudados.	40

Figura 13: Curvas de calibração para o ião fluoreto obtidas com um intervalo de 9 semanas de utilização.	42
Figura 14: Frequência do cristal piezoelétrico antes e depois da injeção de 0,5mL da solução amostra.....	43
Figura 15: Rectas de calibração usadas para a determinação do ião fluoreto na amostra.	44
Figura 16: Rectas de calibração usadas para a determinação do ião fluoreto no branco ..	45

Índice de Tabelas

Tabela 1: Variações das frequências observadas para diferentes concentrações do ião fluoreto.....	38
Tabela 2: Respostas do sensor a soluções de ião fluoreto com diferentes concentrações.	41
Tabela 3: Variações de frequência observadas para diferentes padrões do ião fluoreto, a usar para a determinação da sua concentração nas amostras.....	44
Tabela 4: Variações de frequência observadas com diferentes padrões do ião fluoreto, a usar para a determinação da sua concentração nos brancos.....	45
Tabela 5: Dados experimentais referentes à amostra dos 4 comprimidos, ao volume em que foram dissolvidos e a média das variações das frequências obtidas em 5 injeções da amostra.	46
Tabela 6: Variações de frequências médias na análise do branco (5 injeções de cada branco)	46
Tabela 7: Concentrações corrigidas dos iões fluoreto na solução amostra e no branco	47

1. INTRODUÇÃO

Os aniões desempenham um papel fundamental e importante em processos químicos, biológicos, médicos e ambientais. Dai que a concepção e desenvolvimento de sensores altamente selectivos para aniões sejam alvo de uma grande atenção. Reveste-se de particular interesse o desenvolvimento de sensores altamente selectivos para o ião fluoreto, devido ao papel central que este ião desempenha na prevenção da cárie dentária. Os níveis de flúor no abastecimento de água potável e nos produtos de higiene dental precisam de ser rigorosamente controlados.

Estão disponíveis comercialmente membranas poliméricas altamente selectivas que permitiram o desenvolvimento de uma grande variedade de eléctrodos selectivos para catiões. Em contraste, sensores similares com alta selectividade para aniões são poucos devido à falta de ionóforos lipofílicos que possam interagir selectivamente com aniões. Os ionóforos (moléculas hospedeiras) são os componentes chave dos eléctrodos de membrana polimérica e são responsáveis pela sua sensibilidade e selectividade iónica [1,2].

A maioria dos eléctrodos selectivos de aniões descritos na literatura é baseada nas trocas aniónicas lipofílicas, como no exemplo dos sais de amónio quaternário. Os coeficientes de selectividade desses eléctrodos de membrana estão relacionados com a capacidade de partição do anião da fase aquosa para a fase orgânica. Esses eléctrodos trocadores de aniões são conhecidos por apresentarem um padrão de selectividade de acordo com a série de Hofmeister:



Sendo o ião fluoreto o anião mais hidrofílico, será detectado com a menor sensibilidade, uma vez que tem a energia livre de hidratação de Gibbs mais negativa ($\Delta G_{\text{hyd}}^{298}(\text{F}^-) = -104,3 \pm 0,7 \text{ kcal/mol}$), o que não favorece a sua partição para a fase orgânica do sensor [1,2].

Por isso o desenvolvimento de sensores com compostos que possam interagir selectivamente com aniões hidrofílicos, como o ião fluoreto, proporciona uma alternativa

atraente aos eléctrodos do ião selectivo baseados no clássico cristal de LaF_3 com um pouco de fluoreto de európio (EuF_2).

A grande desvantagem deste eléctrodo de fluoreto é a do potencial medido ser proporcional ao logaritmo da actividade do ião fluoreto na solução. Para trabalhar como a concentração é necessário ajustar a força iónica. O pH do meio e as espécies complexantes interferem nas determinações potenciométricas.

No presente trabalho pretendeu-se testar um calixpirrol para detectar o ião fluoreto. Preferiu-se desenvolver um sensor químico baseado no cristal piezoeléctrico de quartzo em vez de um sensor potenciométrico, pela alta sensibilidade, resposta linear com a concentração, facilidade de adquirir a instrumentação a baixo custo, facilidade de manipulação e versatilidade.

2. IÃO FLUORETO: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS DE ANÁLISE

2.1. Ião Fluoreto e sua importância

O flúor tem o símbolo químico F, 9 de número atômico, 18,9984g/mol de massa atômica e pertence ao grupo dos halogéneos na tabela periódica. É o elemento não-metal mais reactivo e mais electronegativo, por isso difícil de ser encontrado na natureza no seu estado elementar, combina-se com quase todos os elementos, excepto com o oxigénio e os gases nobres, para formar fluoretos. O fluoreto de sódio, um dos fluoretos mais comuns, apresenta-se na forma de um pó branco ou de cristais incolores, é inodoro e apresenta uma solubilidade em água de 4% a 15°C. As soluções saturadas têm um pH de 7,4 [3].

Os fluoretos encontram-se no corpo humano em pequenas concentrações, essencialmente nos dentes e ossos. Os fluoretos fortalecem e favorecem a reparação (remineralização) do esmalte e da dentina, não só porque reduzem a solubilidade destes compostos em meio ácido, mas também porque reduzem a capacidade bacteriana de produzir ácidos [3, 4, 5].

O flúor tem sido classificado pela Academia das Ciências dos Estados Unidos como um nutriente essencial. Os seus benefícios, bem como os seus efeitos tóxicos, em seres humanos têm importantes implicações na saúde pública. Embora a ingestão diária de 1-3mg de flúor previna a cárie dentária, uma exposição longa em maiores quantidades pode ter efeitos deletérios sobre o esmalte dos dentes e ossos. Doses únicas diárias de 5-10mg/kg de massa corporal causam efeitos tóxicos agudos [3, 4].

De acordo com os relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) as cáries dentárias constituem um importante problema de saúde pública nos países mais desenvolvidos, onde afectam cerca de 60-90% das crianças em idade escolar. Para combater este problema, e uma vez que os fluoretos são eficazes na prevenção da cárie dentária, a OMS recomenda que este elemento seja adicionado à água, ao leite ou ao sal [3, 4].

2.2. Métodos de análise do ião Fluoreto

Esta secção apresenta um resumo dos principais métodos analíticos utilizados para a determinação do ião fluoreto em soluções, com maior destaque para os métodos potenciométricos, colorimétricos e cromatográficos.

2.2.1 Cromatografia Iónica

Cromatografia é o nome utilizado para designar um conjunto de técnicas separativas onde se utilizam duas fases, uma estacionária e outra móvel, através das quais se vão distribuindo os vários componentes da solução [6]. O modo como a fase estacionária se encontra define o tipo de cromatografia: quando se encontra fixa num tubo através do qual a fase móvel é obrigada a passar designa-se por cromatografia em coluna, podendo ainda ser líquida, gasosa ou com fluído supercrítico, de acordo com a fase móvel usada [6]. Dentro da cromatografia líquida de alta eficiência encontra-se a cromatografia iónica ou de permuta iónica que permite separar os iões de uma amostra fazendo-a passar por uma coluna preenchida de resinas ou zeólitos. Uma vez separados, os iões são identificados, detectados e quantificados [6,7].

O sistema é formado por um líquido eluente, uma bomba de alta pressão, um injector de amostras, uma coluna analítica e um detector de condutividade (Haddad, 1997). Para suprimir a elevada condutividade do eluente em algumas situações, introduz-se uma coluna supressora imediatamente após a coluna de permuta iónica e antes da célula detectora. Esta converte os iões do solvente numa espécie molecular pouco ionizada. O supressor reduz a condutividade do eluente a baixos valores, convertendo-o maioritariamente em água. O eluente utilizado para separar aniões neste caso pode ser soluções de carbonato/hidrogenocarbonato de sódio [7].

No processo é gerado automaticamente um cromatograma formado por picos separados no tempo. O tempo de retenção é usado para qualitativamente identificar e analisar cada pico ou ião. A altura do pico, ou a sua área, são proporcionais à concentração do ião e são usados para os quantificar [8].

Antes de correr a amostra o sistema é calibrado recorrendo a soluções padrão. A comparação entre os picos gerados por elas e os da amostra permite a sua identificação e quantificação com rigor [7].

A cromatografia iónica, apesar de poder analisar vários aniões simultaneamente com boa selectividade, é uma técnica que acarreta custos de equipamento e manutenção. A presença de quantidades elevadas de sais causa interferências (diminuição dos tempos de retenção) exigindo uma separação prévia dos componentes da amostra ou filtração, para além dos problemas causados pela co-eluição cromatográfica [4, 5, 9, 10].

2.2.2 Métodos potenciométricos

Os métodos potenciométricos são baseados na medição directa de um potencial de eléctrodo, a partir da qual se pode calcular a actividade (ou concentração) de um ião activo [11]. Em potenciometria directa mede-se a diferença de potencial entre um eléctrodo indicador e um eléctrodo de referência, ambos mergulhados na solução a analisar. O eléctrodo de referência é uma semi-pilha cujo potencial é independente da solução a analisar. O eléctrodo indicador pode ser um eléctrodo de membrana selectiva para um dado ião.

O eléctrodo de fluoreto é um sensor potenciométrico selectivo para este ião. O elemento chave para o eléctrodo de fluoreto é o cristal de fluoreto de lantânio (LaF_3). O eléctrodo selectivo de fluoreto é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, selectividade, portabilidade, tempo de análise curto, quando aplicado à determinação de flúor em matrizes não complexas [6, 9, 12].

No eléctrodo de fluoreto, a porção activa da membrana (membrana condutora de iões) é constituída por um único cristal LaF_3 , adicionado de um pouco de európio (II) que baixa a sua resistência eléctrica e facilita o transporte da carga iónica. O cristal de LaF_3 , fica em

contacto com uma solução interna de NaF 0,1M e de NaCl 0,1M e outra externa. A actividade do ião fluoreto controla o potencial da superfície interna do LaF₃, e a do ião cloreto fixa o potencial do eléctrodo interno de referência, de Ag/AgCl [4, 11].

A célula electroquímica que incorpora o eléctrodo de membrana de LaF₃, pode ser representada por:

Ag | AgCl, Cl⁻(0,1M), F⁻(0,1M) | cristal de LaF₃ | Solução em análise | Eléctrodo de referência

O potencial obedece à equação de Nernst:

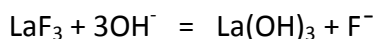
$$E = \text{Constante} + RT/F \ln (a_{F^- \text{ interno}} / a_{F^- \text{ externo}}) \quad (1)$$

Calibrando-se a o eléctrodo indicador (que responde à actividade dos iões fluoreto), para várias soluções padrão do ião fluoreto, e um tampão de ajuste da força iónica, obtém-se uma curva de calibração com comportamento Nernstiano até concentrações do ião fluoreto de 10⁻⁶M (0,02ppm), abaixo da qual a solubilidade do LaF₃ contribui para a concentração dos iões fluoreto na solução do analito [6, 11, 12].

A grande desvantagem deste eléctrodo de fluoreto é a do potencial medido ser proporcional ao logaritmo da actividade do ião fluoreto na solução. Para trabalhar com a concentração é necessário ajustar a força iónica. O pH do meio e as espécies complexantes interferem nas determinações potenciométricas. Os iões Al³⁺ e Fe³⁺ diminuem a quantidade de iões fluoreto livres na solução, porque o complexam sendo necessário adicionar agentes complexantes, como citrato ou EDTA, capazes de formar complexos mais estáveis.

A pH < 5 os iões H⁺ interferem na determinação dos iões fluoreto ao formarem fluoreto de hidrogénio não dissociado, impedindo a resposta do sensor.

O ião OH⁻ interfere directamente nas medidas do ião fluoreto a pH > 8, ao formar La(OH)₃ sólido provocando o aumento da concentração dos iões fluoreto na solução segundo a equação:



Este tipo de interferência resolve-se usando um tampão acetato ou citrato a pH entre 5,5 a 6,5 [6, 11, 12].

2.2.3 Métodos colorimétricos

Existem dois métodos principais para a determinação do íon fluoreto, o método colorimétrico SPADNS ((2-parasulfofenilazo)-1,8-dihidroxi-3,6-naftaleno dissulfonato de sódio) e o método complexométrico alizarina.

O método colorimétrico SPADNS é baseado na reacção entre o fluoreto e o corante zircónio. O fluoreto com o corante forma um complexo aniónico sem cor (ZrF_6^{2-}). A quantidade de fluoreto é inversamente proporcional à cor produzida, ou seja, a cor torna-se progressivamente mais clara quando a concentração de fluoreto aumenta. Em geral a gama linear de quantificação do íon fluoreto por este método é de 0,1 a 1,4mg/L [4].

No método complexométrico alizarina os iões fluoreto presentes na amostra destilada reagem com o complexo lantânio-alizarina formando o complexo fluoro-lantânio-alizarina. A absorvência do complexo ternário azul resultante é medida a 620nm. A reacção é realizada a um pH igual a 4,5 e em acetona a 16% v/v para estabilizar a cor e aumentar a sensibilidade. Em geral a gama de quantificação do flúor por este método é linear de 0,1 a 1,5mg/L. [4, 13].

Ambos métodos colorimétricos são simples, mas apresentam uma grande desvantagem relacionada com a sua baixa selectividade. A presença de iões tais como o ferro, alumínio, silício, sulfato e fosfato interferem na análise. Por ser uma mediada realizada

espectrofotometricamente a turbidez na amostra precisa de ser removida, havendo para isso a necessidade de destilar a amostra antes da determinação, o que torna o ensaio demorado [4].

O método SPADNS tem vantagens sobre o método visual da alizarina porque a solução SPADNS é estável por um ano, se protegida da luz solar directa, e a reacção é quase instantânea, enquanto que a da alizarina demora cerca de uma hora para ocorrer.

No tratamento da amostra para eliminar o cloro no método SPADNS usa-se a solução de arseniato de sódio (NaAsO_2) que é potencialmente tóxico [4].

3. SENSORES QUÍMICOS DE MASSA

Sensores químicos

Um sensor químico é um dispositivo que responde a uma substância específica de forma selectiva por meio de uma reacção química e pode ser usado para a determinação qualitativa e quantitativa do analito [14, 15]. Uma das unidades básicas do sensor é o transdutor que responde a um sinal analítico e traduz a magnitude do sinal numa medida da quantidade do analito. Os sensores químicos podem ser classificados de acordo com o princípio de funcionamento do transdutor:

Electroquímicos: Estes sensores incluem sensores potenciométrico (como o eléctrodo de ião-selectivo), voltamétrico/amperométrico [14, 15].

Ópticos: Em sensores ópticos são feitas medições espectroscópicas associadas com a reacção química. A absorvência, a reflectância e a luminescência são as medições usados em diferentes tipos de sensores ópticos [14, 15].

Sensíveis ao calor: Estes são frequentemente chamados de sensores calorimétricos em que o calor de uma reacção química envolvendo o analito é medido com um transdutor como um termistor ou um termómetro de platina [14, 15].

Por fim temos o **sensor químico de massa** proposto para esta dissertação. Um sensor de massa é basicamente constituído por um filme do composto hospedeiro onde ocorre a interacção com o analito e por um transdutor que transforma uma variação de massa numa variação de propriedade eléctrica, neste caso, numa variação de frequência. Usualmente o conceito sensor de massa vem associado aos cristais piezoeléctricos de quartzo.

Quando uma reacção química ocorre numa superfície, não envolve apenas variação de calor, mas também uma variação de massa. A variação da massa é causada pela acumulação do analito na superfície. Essa mudança de massa é, evidentemente, muito pequena, mas se for usada uma microbalança sensível, essa massa pode ser detectada e relacionada com a quantidade do analito que reagiu com a superfície [14].

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é um exemplo de um detector de massa extremamente sensível às mudanças de massa e com princípio baseado no efeito piezoelétrico [14].

3.1. Piezoelectricidade

A palavra “piezo”, que deriva da língua grega, significa pressionar sendo a piezoelectricidade definida como a capacidade que certos materiais têm de desenvolver entre as superfícies deformadas uma diferença de potencial proporcional à pressão mecânica externa aplicada [14, 16, 17].

A designação de piezoelectricidade, sugerida por W. Henkel em 1881 [18, 19], foi descoberta pelos irmãos Jacques e Pierre Curie em 1880 [14, 17, 20], durante um estudo realizado sobre os efeitos da pressão mecânica no aparecimento de cargas elétricas em cristais, tais como o quartzo, a turmalina e o sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio- $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) [17, 18].

Este efeito piezoelétrico apenas é encontrado em materiais sem centro de simetria (IUPAC, 2004). Quando a polaridade da perturbação mecânica varia, varia também a polaridade do campo elétrico gerado. Este fenómeno em que a obtenção do campo elétrico é devido à aplicação de uma tensão externa é denominado efeito piezoelétrico directo e os cristais que exibem este efeito são chamados cristais piezoelétricos. Também é possível aplicar um tensão mecânica eléctrica sobre o material piezoelétrico provocando uma deformação mecânica, e estas variações mecânicas no cristal podem seguir as variações de direcção da mesma maneira que a perturbação eléctrica. Neste caso, observa-se a ocorrência do efeito piezoelétrico inverso [16, 17].

Em situações práticas do sensor piezoelétrico, a aplicação de uma diferença de potencial alternada no cristal causa oscilações mecânicas no cristal na frequência natural de ressonância [14]. Quando a perturbação eléctrica tem as características adequadas (amplitude e frequência) as quais são determinadas pela geometria e propriedades do

crystal, este oscilará mecanicamente em modo ressonante. Estas condições significam que um cristal piezoeléctrico pode oscilar em seu modo de cisalhamento, propagação da onda perpendicularmente ao campo eléctrico [20]. A figura 1, mostra a direcção de propagação da onda acústica e de vibração no modo de cisalhamento. Um cristal que vibra no modo de cisalhamento deve apresentar os dois fios condutores o mais afastados possível do centro do cristal, de modo a evitar interferências na vibração [16, 17].

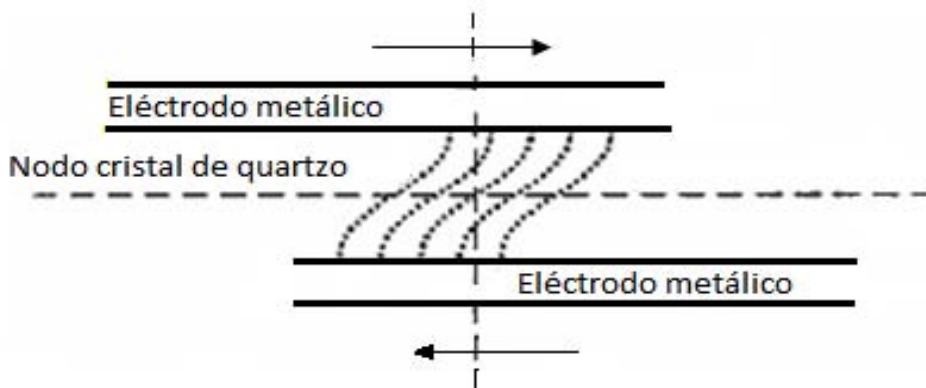


Figura 1: Representação da onda que se propaga através do material, perpendicularmente às faces do cristal piezoeléctrico de quartzo.

A frequência de ressonância é dependente das dimensões físicas do cristal e irá alterar, se um material for depositado sobre a superfície. As placas usadas em sensores piezoeléctricos são normalmente discos de diâmetro entre 10 a 15mm e com uma espessura de 0,2mm (0,1 a 0,7mm) [16]. Eléctrodos de metal (por exemplo de ouro) com terminais conectados são depositados na superfície do disco, como é mostrado na figura 2. Um cristal de quartzo com estas características oscila numa frequência de cerca de 9MHz. A frequência é medida com um frequencímetro e um circuito electrónico apropriado [14].

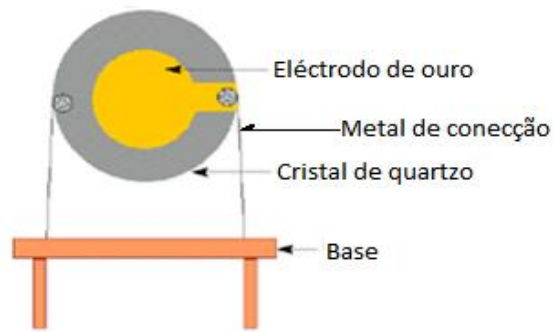


Figura 2: Cristal piezoelétrico de quartzo com eléctrodos.

3.2. Cristais piezoelétricos de quartzo

A piezoelectricidade ocorre em cristais que não possuem centro de simetria, dos quais se contam 21 classes, sendo 20 piezoelétricos [16].

O quartzo alfa (α -SiO₂) é o cristal piezoelétrico mais utilizado devido às suas características: ao facto de ser inerte, insolúvel em água, a sua resistência térmica até 579°C de temperatura sem perdas das suas propriedades piezoelétricas [21]. Além disso, ele apresenta um excelente factor de qualidade (Q), que representa a razão entre as energias armazenada e a perda, por ciclo durante a oscilação, e garante a estabilidade da frequência [16, 19, 20].

O cristal pode ser descrito por um sistema de coordenadas, como se mostra na figura 3a, no qual o eixo principal do crescimento do cristal é denominado eixo dos Z [16]. A escolha do eixo e do ângulo de corte determina as propriedades físicas e eléctricas do quartzo como oscilador [20].

A temperatura tem efeitos diferentes sobre os diferentes tipos de cortes. O cristal em corte X possui um coeficiente de temperatura negativo: quer dizer, quando a temperatura aumenta a frequência diminui. O cristal em corte Y tem coeficiente de temperatura positivo ou seja quando a temperatura aumenta, a frequência aumenta. Ambos os efeitos são indesejáveis, e por conseguinte estes dois tipos de cortes foram substituídos por outros.

Geralmente são utilizados dois ângulos específicos que apresentam coeficientes de temperatura praticamente nulos, nomeadamente o corte AT e o corte BT, em relação ao eixo dos Z. [16, 20, 21].

Neste trabalho são utilizados os cristais de corte AT feitos aproximadamente a 35° em relação ao eixo Z, figura 3b, que têm um coeficiente de temperatura praticamente zero para temperatura igual a 25°C , isto é, a sua frequência muda muito pouco com as diferenças de temperatura, o que permite trabalhar com frequências muito estáveis á temperatura ambiente, conferindo assim maior sensibilidade a massa.

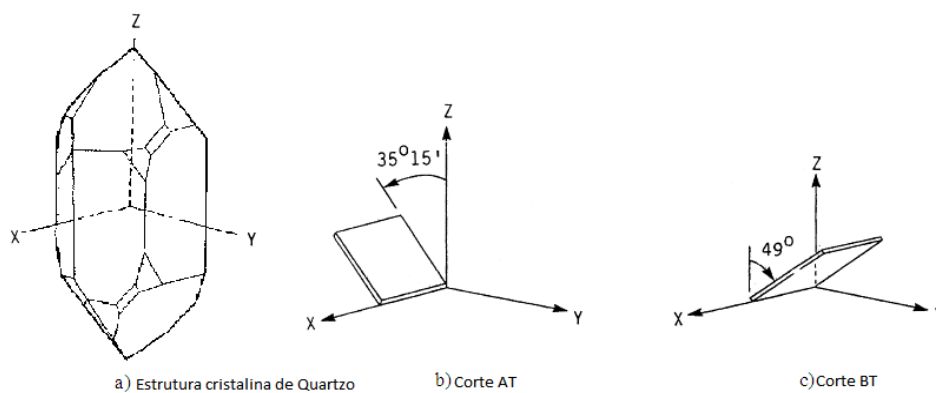


Figura 3: Estrutura cristalina de quartzo com representação de eixos coordenados, orientações de cortes AT e BT de cristais de quartzo, pertencentes aos cortes da família Y [20].

No entanto, é importante salientar que a dependência em relação à temperatura no caso de cristais de quartzo em líquidos, está relacionada fundamentalmente com as variações da viscosidade e densidade do meio [20].

Os cristais podem ser obtidos comercialmente por meio de diferentes tratamentos superficiais, e os mais comuns são os polidos e opticamente rugosos. As superfícies com essas características incrementam a aderência do metal sobre o cristal, mas podem causar problemas na determinação das variações das frequências quando o cristal é transferido do ar para líquido [20]. As frequências mais usadas estão entre 5 a 10MHz, porque os cristais têm espessuras razoáveis que facilitam a manipulação e o arranjo experimental [16].

3.3. Microbalança de Cristais de Quartzo (QCM)

A QCM (Microbalança de Cristais de Quartzo) baseia-se no facto de que a variação da massa à superfície do cristal provoca uma variação na frequência de vibração. Em 1959 Sauerbrey [16, 20, 22] demonstrou que essa variação de frequência é linearmente proporcional à massa depositada, que para um cristal piezoeléctrico de quartzo (q) com orientação de corte AT [21], pode ser expressa pela equação 1 seguinte:

$$\Delta F_q = - 2,3 \times 10^6 F_q^2 \Delta m / A \quad (2)$$

Onde: ΔF_q é a variação de frequência decorrente da variação da massa em Hz, F_q é a frequência de oscilação do cristal de quartzo em MHz, Δm é a variação da massa depositada em g, A é a área da superfície activa do cristal em cm^2 .

Sauerbrey demonstrou que a frequência de ressonância diminuía à medida que se adicionava a massa à superfície do sensor, porque a distância percorrida pela onda acústica, desde uma face do sensor até a outra aumentava devido ao aumento da espessura adicionada. Sauerbrey considerou que o filme depositado possuía as mesmas propriedades acústicas que o quartzo e que se tratava de um filme rígido e uniformemente distribuído [14, 20, 22].

Para a detecção de um analito é essencial que a espécie a ser detectada interaja com eléctrodos depositados na superfície do cristal de forma a fazer variar a massa sobre o cristal. No caso de não existir essa interacção ou de ela não ser suficiente, reveste-se o cristal com um filme que adsorva ou absorva muito especificamente quanto possível o analito [16, 20, 21].

Após estudos, vários autores [20, 22] comprovaram que além da viscosidade e a densidade do líquido, outros parâmetros como estrutura da interface sólido/solução, condutividade, temperatura, características hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície do cristal, uniformidade do filme sobre o cristal e a extensão da área do cristal em contacto com a solução são de grande relevância para aplicação da Microbalança de Cristais de Quartzo em ambientes líquidos [23].

3.4. Microbalança de Cristais de Quartzo em Líquidos

Até 1980 acreditava-se que não seria possível o funcionamento dos cristais piezoelétricos em meio líquido por causa do amortecimento causado pela viscosidade do líquido. As aplicações iniciais da QCM em ambientes líquidos não obtiveram êxito, uma vez que se verificava grande perda do factor de qualidade Q , e o cristal de quartzo cessava o movimento de oscilação quando imerso em líquidos [23].

Com o propósito de otimizar a aplicação de QCM a ambientes líquidos, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos. Nomura e Okuhara [24], ao estudarem as variações de frequências obtidas pela imersão de uma das faces do cristal em 17 líquidos orgânicos, sugeriram uma relação empírica da variação da frequência com a densidade (ρ) e viscosidade do líquido (η) como mostra a equação 2:

$$\Delta f = a\rho^{1/2} + b\eta^{1/2} \quad (3)$$

Os parâmetros a e b são constantes que dependem do cristal utilizado.

Estes investigadores concluíram ainda que o cristal não oscilava na presença de líquidos de elevada densidade e/ou viscosidade [24].

O efeito da viscosidade (Δf), descreve a interacção do cristal vibrando num meio viscoso e essa interacção leva a uma diminuição na frequência. Para um fluido Newtoniano, (baseado num modelo físico simples no qual se considerava o cristal de quartzo como um sólido elástico sem perdas, e o líquido, como um fluido puramente viscoso), Kanazawa e Gordon [25, 26], desenvolveram uma expressão matemática que relaciona o produto da viscosidade-densidade e a variação da frequência associada, para um QCM operando com uma face em contacto com o líquido e com influência da viscosidade.

A expressão pode ser representada pela equação 3:

$$\Delta f = -f_o^{3/2} (\eta_L \rho_L / \pi \mu_q \times \rho_q)^{1/2} \quad (4)$$

Onde Δf é a variação da frequência devido a mudança de viscosidade e densidade de um líquido, f_o é a frequência de ressonância do cristal de quartzo, μ_q é o módulo de

cisalhamento de um cristal de quartzo ($2,947 \times 10^{11} \text{g}/(\text{cm} \cdot \text{s}^2)$), η_L é a viscosidade absoluta de um líquido, ρ_q e ρ_L são as densidades de um cristal de quartzo ($2,648 \text{g}/\text{cm}^3$) e do líquido respectivamente.

3.5. Vantagens e desvantagens das QCM

A simplicidade do equipamento utilizado e miniaturização, o seu baixo custo e a facilidade de aquisição dos cristais, contribuem para tornar o método acessível. Além disso, experiências cuidadosamente controladas e planeadas mostram que a QCM é um método sensível que pode atingir uma exactidão e precisão excelentes.

A notável sensibilidade das microbalanças pode ser responsável pela possível variabilidade dos resultados. Esta variabilidade começa pelos cristais, e pode resultar de pequenas diferenças de variações na espessura e tamanho, tanto nos cristais como nos eléctrodos, imperfeições da sua superfície bem como irreprodutibilidade na deposição do revestimento [19].

A humidade é uma das variáveis que geralmente afecta a estabilidade do sensor, principalmente a baixas temperaturas, onde a água pode condensar sobre o cristal e impedir a vibração.

As análises em líquidos são mais complicadas do que na fase gasosa, uma vez que o líquido representa uma sobrecarga adicional e há dissipação de energia para o mesmo. O caudal tem de ser controlado, precisamente na injeção em fluxo uma vez que a variação do caudal pode causar uma grande variabilidade nos resultados.

3.6. Aplicações das microbalanças de cristais de quartzo

A alta sensibilidade e a sua capacidade inerente de controlar analitos em tempo real as mudanças em massa sobre o cristal do sensor fazem da QCM uma técnica muito atraente para uma ampla gama de aplicações, como na indústria alimentar, análises clínicas e ambientais desde a sua descoberta [20], nomeadamente na análise de drogas, biosensores para ADN (ácido desoxirribonucleico), immunosensores, detecção de poluentes gasosos no ar e em águas, monitorização *in situ* das propriedades de lubrificantes e do petróleo [20, 27].

Actualmente há uma variedade enorme de aplicações da QCM na ciência, tecnologia e indústria. Estas áreas demonstram enorme interesse neste tipo de sensores pelo facto destes poderem imitar as papilas gustativas e o olfacto humanos, sendo mesmo estes sensores vulgarmente designados de “línguas” e “narizes” electrónicos, respectivamente.

3.7. Revestimento do cristal de quartzo

A sensibilidade da QCM depende do revestimento, esta secção foi dedicada ao estudo de critérios que ditaram a escolha do OMCP-naftoquinona como revestimento do cristal de quartzo.

3.7.1. Critérios para a escolha do revestimento

A escolha do revestimento é sem dúvida um dos passos mais importantes no desenvolvimento do sensor. Dessa selecção, que se prende ao tipo de interacção do revestimento com os componentes da amostra, depende a estabilidade, reversibilidade, tempo de resposta, sensibilidade, reprodutibilidade e selectividade do mesmo. Questões práticas relacionadas com a quantidade e a facilidade da aplicação do revestimento, como por exemplo a sua solubilidade num solvente que se evapore facilmente, terão que

ser consideradas aquando da escolha [19]. Escolhido o revestimento e definidos estes parâmetros passa-se a optimização dos mesmos.

3.7.2. Revestimento: Sua interacção com o ião fluoreto

Um das classes atraentes de macromoléculas receptoras de aniões são os calixpirróis, dos quais o octametilcalix[4]pirrol (OMCP), figura 4 aquele que tem a estrutura mais simples. Os esforços para melhorar a afinidades de ligação do anião, bem como para modular a selectividade e estabilidade do OMCP, resultaram em diversas modificações estruturais, figura 4b e 4c.

A presença de substituintes no OMCP, figura 6, torna o NH pirrólico mais ácido, devido ao efeito sacador do substituinte, aumentando assim a interacção com os aniões.

A figura 4 mostra os compostos testados para o revestimento do cristal. Estes compostos foram sintetizados e fornecidos pelo grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro [28].

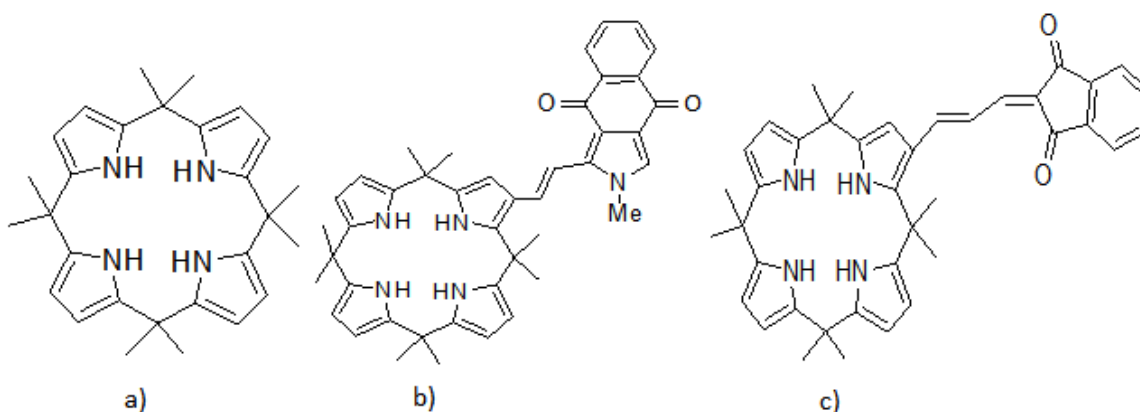


Figura 4: Estruturas do a) octametilcalix[4]pirrol (OMCP), b) Octametilcalix[4]pirrol-naftoquinona (OMCP-naftoquinona) e c) Octametilcalix[4]pirrol-indenodiona

Os calix[4]pirróis são constituídos por quatro unidades de pirrol electronicamente independentes, podendo cada uma delas estabelecer uma ligação de hidrogénio. O OMCP apresenta várias conformações sendo a conformação alternada- 1,3 (figura 5b), com uma

cavidade profunda, a mais favorável na ausência de aniões. Na presença de aniões o OMCP adopta uma conformação mais estável, que é a conformação em cone (figura 5c). Desta forma, estas substâncias complexam com aniões ou moléculas neutras por interacção entre estes e os NH internos pirrólicos, apresentando uma conformação em cone mais estável devido a formação de 4 de ligações de hidrogénio, NH...anião, com interacções muito fortes, figura 5c [29].

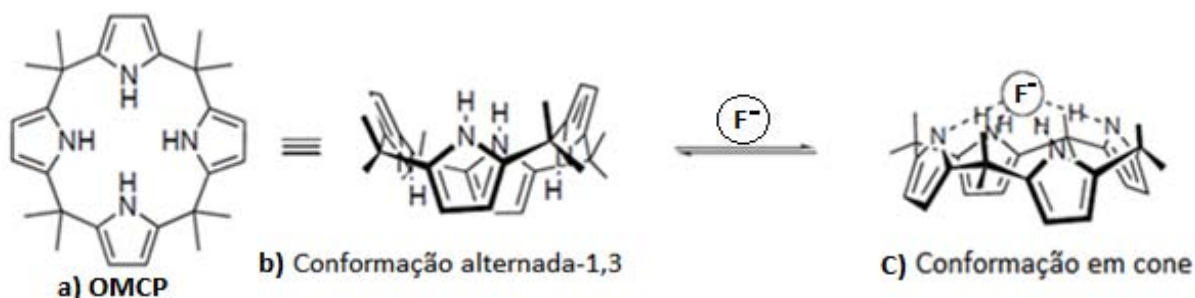


Figura 5: Octametilcalix[4]pirrol e as interconversões entre as conformações alternada-1,3 e a conformação em cone.

No caso dos compostos 4b e 4c, os grupos ligados ao OMCP facilitam a formação de ligações por ponte de hidrogénio, como indicado na figura 6 abaixo:

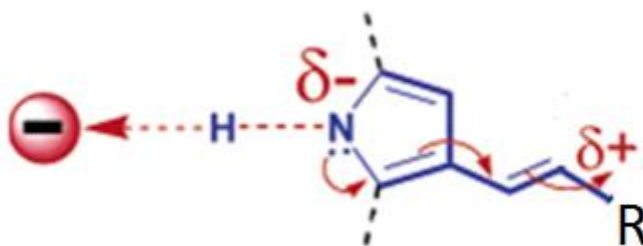


Figura 6: Mecanismo da ligação anião-hidrogénio resultante da transferência parcial de carga do pirrol rico em electrões para o "braço" pobre em electrões.

4. Materiais e Métodos

Nesta secção referente à parte experimental são enumerados primeiramente os reagentes, o material, o equipamento, os métodos e os procedimentos experimentais usados para a execução deste trabalho. A seguir é apresentado o arranjo experimental para técnica de análise por injeção em fluxo (FIA) usado para automatizar o transporte da amostra e os padrões até a QCM. Seguidamente apresenta-se a preparação da amostra.

4.1. Reagentes

Todos os sais utilizados neste trabalho, a seguir enumerados, foram previamente secos numa estufa a 105°C de temperatura e as suas concentrações aferidas pelo espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama por determinação do Na⁺.

Acetato de sódio (CH₃COONa) Panreac 131633, acetona (CH₃COCH₃) Riedel-de Hæn 32201, ácido fórmico (HCOOH) Panreac 131030, Brometo de sódio (NaBr) Panreac 131646, Cloreto de sódio (NaCl) Merck 1.06404, Clorofórmio (CHCl₃) BDH Prolabo 22711.324, Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O) Panreac 131965, Fluoreto de sódio (NaF) Fluka 71522, Formato de sódio (HCOONa) Panreac 131676, Hidróxido de sódio (NaOH) Panreac 131687, Iodeto de sódio (NaI) Alfa Aesar 941, Nitrato de sódio (NaNO₃) Fluka 31440, Solução padrão de sódio (1000±0,002mg/L) Panreac 313192, Sulfato de sódio NaSO₄ Aldrich 12110088.

4.2. Materiais

Todo o material volumétrico de vidro era de classe A. Para as soluções de íon fluoreto usaram-se balões volumétricos de polietileno de 50 e 25mL, que tiveram de ser calibrados por pesagem da água Milli-Q, depois de cheios até à marca e usando a densidade da água à temperatura da mesma

O material usado foi primeiramente lavado com água da torneira e detergente depois com água destilada e por fim passado em água ultra pura Milli-Q, (com 18,2MΩcm de resistividade eléctrica), produzida pelo Millipore Plus 185.

Todos os compostos testados para os revestimentos dos cristais foram sintetizados e fornecidos pela Secção de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

4.3. Procedimento experimental para Análise por Injecção em Fluxo

Os sistemas de análise por FIA (Flow Injection Analysis) têm sido utilizados principalmente para a automatização dos instrumentos em análises químicas. Estes sistemas asseguram a reprodutibilidade dos processos físicos e químicos e não exigem o estabelecimento do equilíbrio químico [30, 31, 32].

Na figura 7 mostra-se o esquema de arranjo experimental para a análise por FIA.

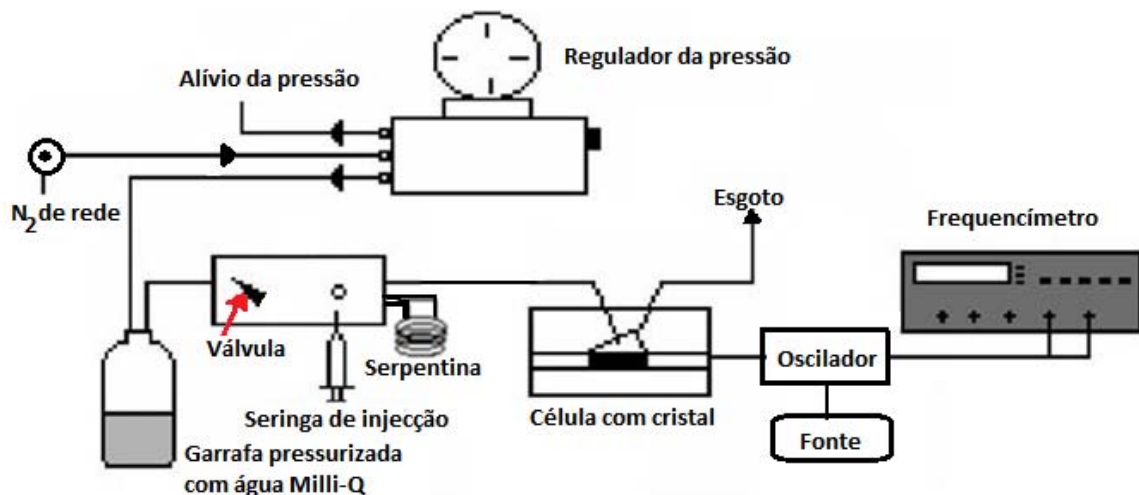


Figura 7: Desenho esquemático do arranjo experimental para a técnica FIA com detecção por QCM.

No processo de análise por injeção em fluxo, alíquotas do padrão ou amostra foram injectadas em fluxo de 0,8mL/min de água Milli-Q, utilizou-se uma válvula de injeção com uma serpentina de 0,5mL. Os padrões ou amostras são transportados através desse fluxo até a célula contendo o cristal piezoeléctrico de quartzo.

A solução contacta apenas com uma das faces do cristal piezoeléctrico. O cristal está ligado a um oscilador, que está ligado por sua vez a uma fonte de alimentação e a um frequencímetro que medirá continuamente a frequência do cristal.

A injeção de soluções padrão de diferentes concentrações permite construir uma curva de calibração. A injeção de uma alíquota da amostra irá provocar uma variação da frequência que permite calcular a sua concentração através da curva de calibração.

A propulsão da água de arraste do sistema foi feita com a utilização de garrafas pressurizadas com azoto Alphagaz do ArLíquido.

4.4. Procedimento da aplicação do revestimento

Revestiu-se apenas uma das faces do cristal, aquela que ia estar em contacto com a solução de ião fluoreto, a outra permaneceu sempre em contacto com o ar. Os cristais foram previamente lavados com acetona, etanol e água Milli-Q. O composto de interesse OMCP-naftoquinona foi solubilizado em clorofórmio e conservado fora da luz para evitar a sua degradação.

Com ajuda de uma micropipeta colocou-se uma gota do composto da solução do OMCP-naftoquinona sobre o cristal e foi espalhada com ajuda do "Spin Coater" DELTA 10TT, figura 8, programado para manter uma rotação de 16rpm durante 60s. Por fim deixou-se o cristal a secar no excicador, protegido da luz durante 2 dias. A frequência de ressonância do cristal foi medida antes do revestimento e após terem decorrido os dois dias depois da sua aplicação. Esta diferença de frequências é proporcional a quantidade do revestimento aplicado.

Os cristais piezoelétricos utilizados nas experiências eram de 9MHz, corte AT, polidos e com eléctrodos de ouro.

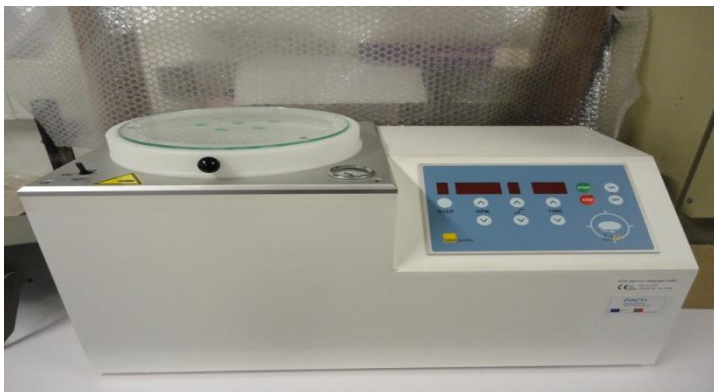


Figura 8: Spin coater Delta 10TT, usado para aplicar o composto de revestimento no cristal.

4.5. Estudo dos aniões interferentes

Para estudar os aniões interferentes usou-se o método de interferente fixo, recomendado pela IUPAC, através da determinação dos coeficientes de selectividade.

Para tal quantidade (2,5mL da solução a 1000ppm) fixa do possível anião interferente foi adicionada aos padrões do ião fluoreto a diferentes concentrações e completou-se o volume até a marca com água Milli-Q.

Construiu-se a curva de calibração, na qual se observou uma primeira zona linear com maior influência do anião interferente, com menor declive, e a outra zona linear onde o anião deixa de interferir e, a intersecção das duas rectas indica o ponto onde a recta de calibração é ditado pela concentração dos iões fluoreto.

O valor do coeficiente de selectividade é igual a concentração (ppm) do ião fluoreto no ponto da intersecção das duas rectas dividido pela concentração (ppm) fixa do anião em estudo.

4.6. Solubilização e digestão da Amostra



Para testar a exactidão do método, na ausência de material de referência, foi adquirida numa farmácia portuguesa, comprimidos para a profilaxia da cárie dentária Zymafluor®, com o código e registo nº 8507723. Segundo informação da Novartis Consumer Health cada comprimido com a massa de 40mg continha 1mg de fluoreto de sódio.

Utilizaram-se 4 comprimidos em cada análise. Os comprimidos foram sujeitos a uma fusão alcalina de acordo com o método de Malde et al, 2003 [33], e segundo o procedimento que a seguir se descreve:

Pesou-se 4 comprimidos directamente num cadinho de níquel. Partiram-se os comprimidos em quartos dentro do cadinho, com muito cuidado com ajuda de uma vareta. No nicho adicionou-se 5mL de NaOH 8mol/L, tendo-se retirado a vareta depois de a lavar com pequenos jantos de água Milli-Q. Aqueceu-se ligeiramente (70 a 80°C) numa placa de aquecimento até à secura. A seguir colocou-se o cadinho na mufla para a fusão a 200°C durante um período de 16 horas após o qual se aumentou a temperatura para 525°C. Ao fim 3 horas retirou-se o cadinho para um excicador, após o seu arrefecimento adicionaram-se 15mL de água Milli-Q, aqueceu-se de novo na placa de aquecimento até à dissolução total e deixou-se arrefecer. A seguir transferiu-se *quantitativamente* a solução para um copo de polietileno, e com ácido fórmico ajustou-se o pH da solução (que era de aproximadamente 13,0) para pH de aproximadamente 9 (próximo do valor do pH das soluções de NaF). Por fim transferiu-se quantitativamente a solução amostra para um balão volumétrico de polietileno de 50mL e ajustou-se o volume até à marca com água Milli-Q. Prepararam-se os brancos seguindo o mesmo procedimento descrito, mas sem os 4 comprimidos ou seja sem amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Reversibilidade do sensor baseado num cristal piezoelétrico revestido com OMCP-naftoquinona

A partir de um trabalho anterior, sabia-se que, de entre os calixpirróis testados, o octametilcalix[4]pirrol-naftoquinona (OMCP-naftoquinona), era o que apresentava melhor estabilidade e maior sensibilidade ao ião fluoreto, tendo sido por isso o revestimento escolhido para este trabalho.

Para utilizar o sensor baseado neste composto foi necessário estudar a interacção do mesmo com o ião fluoreto. Começou-se por estudar o tempo de recuperação do sensor após uma injeção de um padrão de 34,83ppm em ião fluoreto. Na figura 9 pode-se ver a frequência de um cristal piezoelétrico em contacto com água Milli-Q, e após a injeção de 0,5mL da solução de fluoreto.

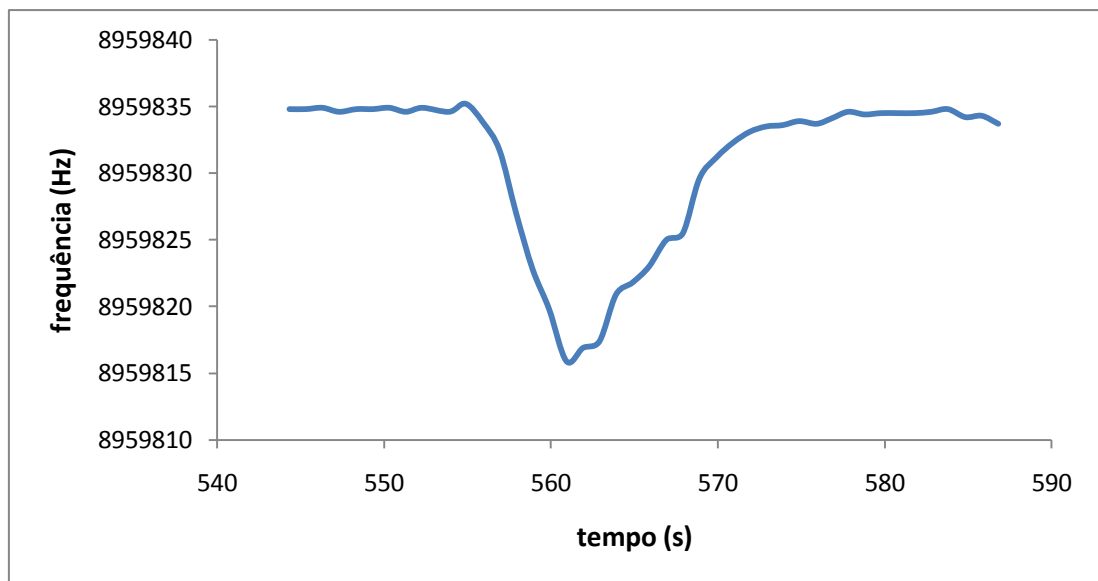


Figura 9: Frequência do cristal piezoelétrico antes e depois da injeção de 0,5mL de uma solução de ião fluoreto de 34,83ppm.

A figura 9 mostra que o OMCP-naftoquinona interage de uma forma reversível e rápida com o ião fluoreto. Após a injeção do padrão a resposta é obtida em aproximadamente 10s e a recuperação completa do sensor é obtida em aproximadamente 15s.

5.2. Zona de calibração linear e sensibilidade

Revestiu-se um cristal piezoelétrico com uma quantidade de OMCP-naftoquinona que produziu um decréscimo de frequência de 22kHz. Construiu-se uma curva de calibração com os valores das concentrações do ião fluoreto em ppm e as variações de frequência observadas (Δf) em Hz. Na tabela 1 mostram-se os valores das frequências observadas para diferentes concentrações.

Tabela 1: Variações das frequências observadas para diferentes concentrações do ião fluoreto

$[F^-]$ (ppm)	2,04	4,08	7,82	11,4	23,4	34,8	46,8	58,7	81,5	106,2	117,7	140,6
Δf (Hz)	2	4	6	8	13	18	24	30	39	47	50	52

A figura 10 mostra a curva de calibração do ião fluoreto. Desta curva de calibração foi extraída a zona de calibração linear que é apresentada na figura 11.

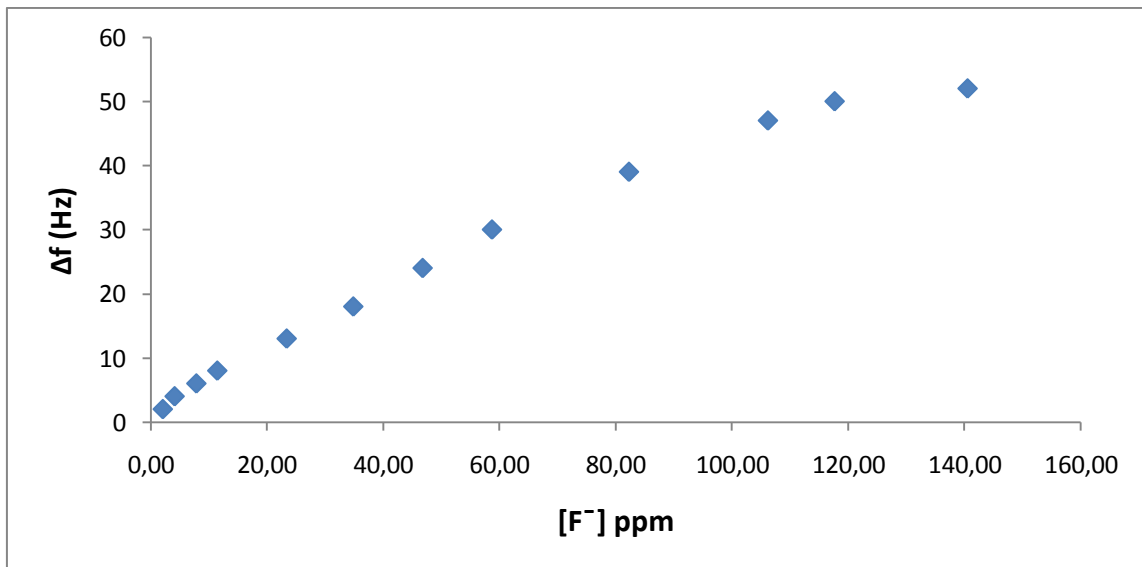


Figura 10: Curva de calibração do ião fluoreto.

Pode-se ver ainda na figura 11 a curva de calibração, a equação da recta na zona de calibração linear, bem como o coeficiente de determinação (R^2).

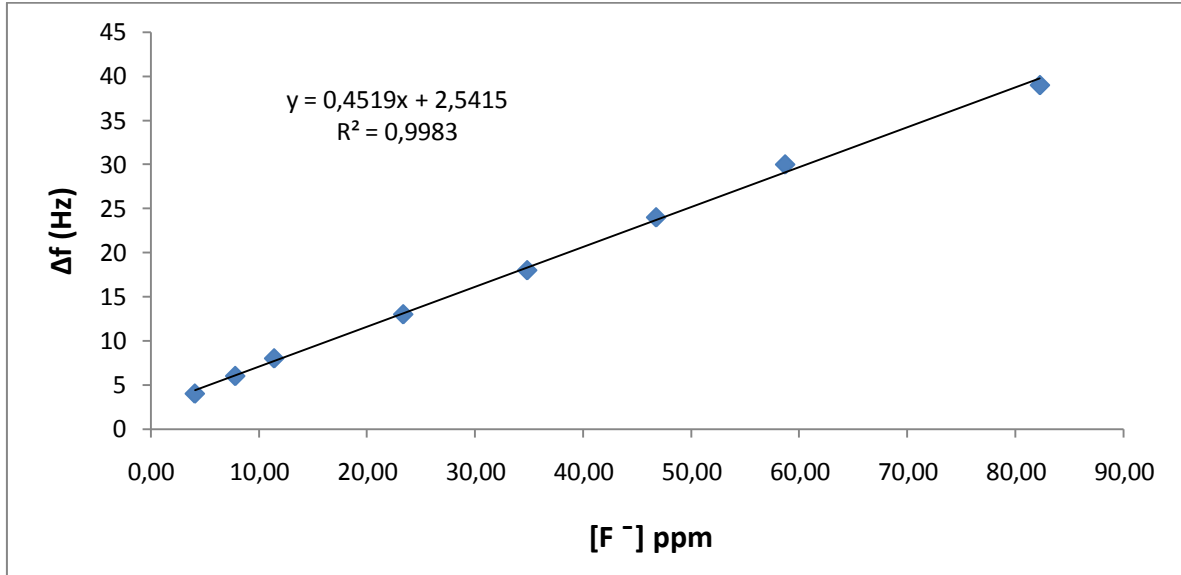


Figura 11: Recta de calibração para o ião fluoreto na zona linear.

Usando um cristal revestido com OMCP-naftoquinona com uma quantidade de revestimento na qual provocou um Δf de 22kHz, obteve-se uma zona de calibração linear compreendida entre 4,00 e 80,00ppm. A sensibilidade do sensor é de 0,45Hz/ppm e o limite de detecção definido, como a concentração que daria um sinal igual à ordenada na origem acrescida de 3 desvios padrão dos resíduos $S_{y/x}$, de 3,66ppm [34].

5.3. Estudo dos interferentes

Os calixpirróis são uma família de compostos que possuem interações fortes com muitos aniões, que podem interferir na análise do ião fluoreto. Por isso foram determinados neste trabalho os coeficientes de selectividade para o sensor revestido com OMCP-naftoquinona. A determinação dos coeficientes de selectividade foi realizada segundo o método de interferente fixo recomendado pela IUPAC.

Na figura 12 são mostrados os coeficientes de selectividade do sensor.

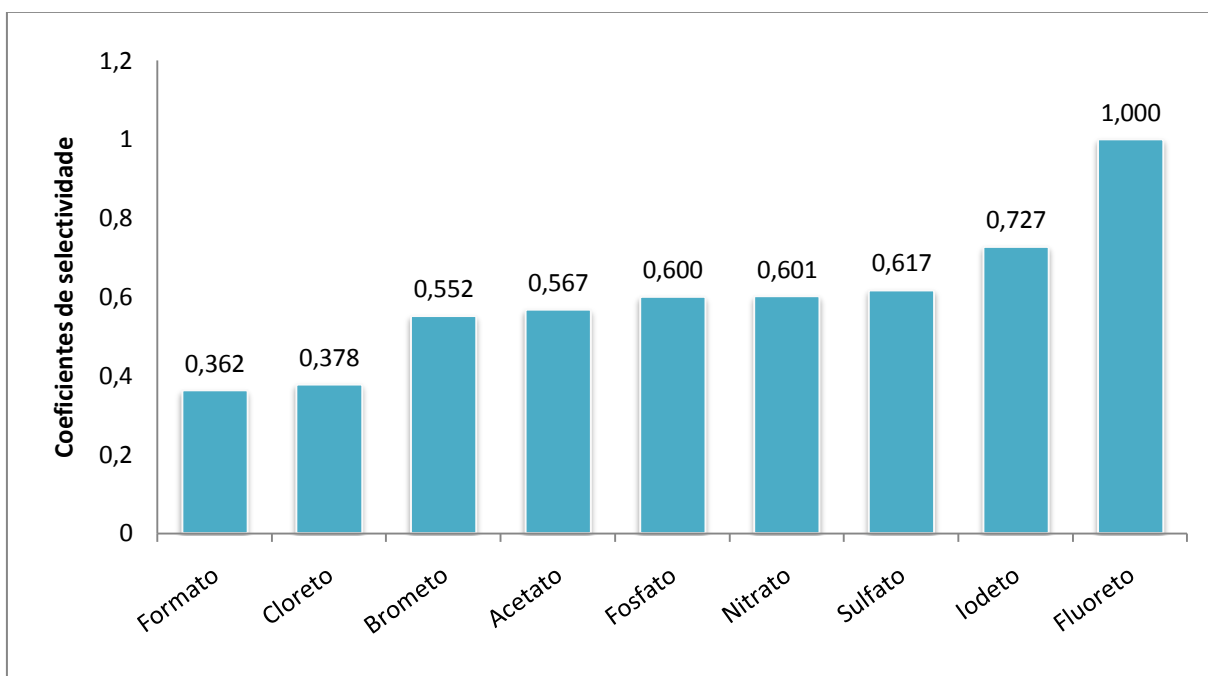
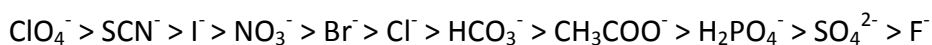


Figura 12: Coeficientes de selectividade do OMCP-naftoquinona para os aniões estudados.

A figura 12 mostra que o cristal piezoeléctrico revestido com OMCP-naftoquinona responde a todos os aniões estudados. De entre os aniões estudados o anião formato foi aquele que menos interferiu na determinação do ião fluoreto.

Os coeficientes de selectividade do sensor relativamente aos aniões estudados não seguem a clássica série de Hofmeister:



ordenando-se como se segue:

formato < cloreto < brometo < acetato < fosfato < nitrato < sulfato < iodeto < fluoreto.

Uma vez que o anião formato foi o anião para qual se obteve menor resposta, o pH da solução amostra foi ajustado, após a digestão, com ácido fórmico.

5.4. Análise da sensibilidade do sensor

Com vista a estudar o tempo de vida do sensor comparam-se os declives das rectas de calibração (sensibilidades) obtidos com o mesmo sensor ao longo do tempo.

Durante o período de observação de 9 semanas, o cristal não foi retirado da célula. Na tabela 2 mostram-se as respostas do sensor a diferentes concentrações de ião fluoreto, obtidas ao longo dum período de 9 semanas.

Ainda pode-se ver na tabela 2 um decréscimo sistemático de Δf para as mesmas concentrações dos padrões ao longo de 9 semanas de observação da sensibilidade do sensor.

Tabela 2: Respostas do sensor a soluções de ião fluoreto com diferentes concentrações.

	1ª Análise	8 Semanas depois	9 Semanas depois
[F ⁻]ppm	- Δf (Hz)	- Δf (Hz)	- Δf (Hz)
11,42	8	8	7
23,36	13	12	11
34,83	19	17	16
46,76	25	22	19
58,70	31	27	24

A figura 13 mostra três curvas de calibração referentes a início e fim da observação cujas datas estão indicadas na tabela 2 acima.

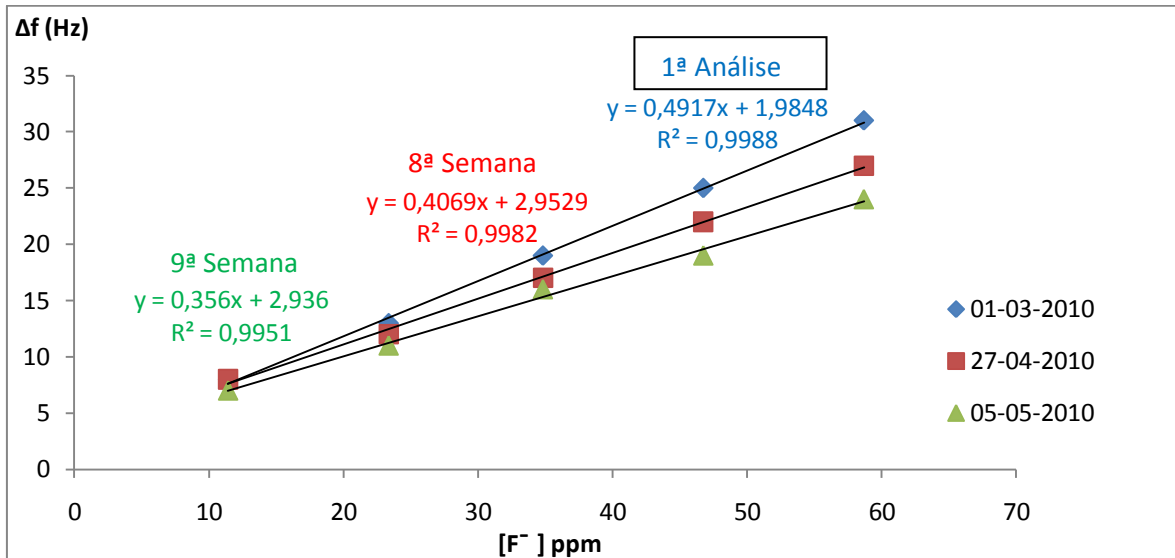


Figura 13: Curvas de calibração para o ião fluoreto obtidas com um intervalo de 9 semanas de utilização.

O declínio na sensibilidade do sensor nesta figura 13 é bem patente (0,4917 para 0,3560Hz/ppm). O teste estatístico F-Fisher mostrou que os desvios padrão das três rectas não diferem significativamente (1ª análise e 8ª semana $F_{\text{calculado}} = 2,059 < F_{\text{tabelado}} = 6,388$ e para 1ª análise e 9ª semana $F_{\text{calculado}} = 1,648 < F_{\text{tabelado}} = 6,388$). Através do teste t-student provou-se que os declives da 1ª e 3ª rectas de calibração diferem significativamente a um nível de confiança de 95% ($t_{\text{calculado}} = 7,69 > t_{\text{tabelado}} = 2,45$), isto é na 9ª semana, mas as rectas 1ª análise e da 8ª semana não mostraram diferenças significativas a 95% de nível de confiança ($t_{\text{calculado}} = 1,97 < t_{\text{tabelado}} = 2,45$) [34, 35].

Neste período de 9 semanas, a frequência de oscilação do cristal em água Milli-Q subiu 2kHz, concluindo-se que a perda de sensibilidade está relacionada com a perda de revestimento do cristal.

Daqui se concluiu que o sensor perde sensibilidade, diminuindo os declives das rectas de calibração o que se reflecte na diminuição dos valores das respostas do sensor.

5.5. Determinação do ião fluoreto nos comprimidos Zymafluor®

Para avaliar a exactidão do método baseado em QCM na ausência de materiais de referência, os resultados foram comparados com os dados para os comprimidos Zymafluor® fornecidos pela Novartis Consumer Health, que foram os seguintes:

Peso de cada comprimido: $40,0 \pm 1,6\text{mg}$

Peso correspondente ao fluoreto de sódio por comprimido: 1,0mg

Na análise da solução da amostra começou-se por estudar o tempo de recuperação do sensor após uma injeção da mesma. Na figura 14 pode-se ver a frequência de um cristal piezoeléctrico em contacto com água Milli-Q, e após a injeção de 0,5mL da amostra contendo ião fluoreto.

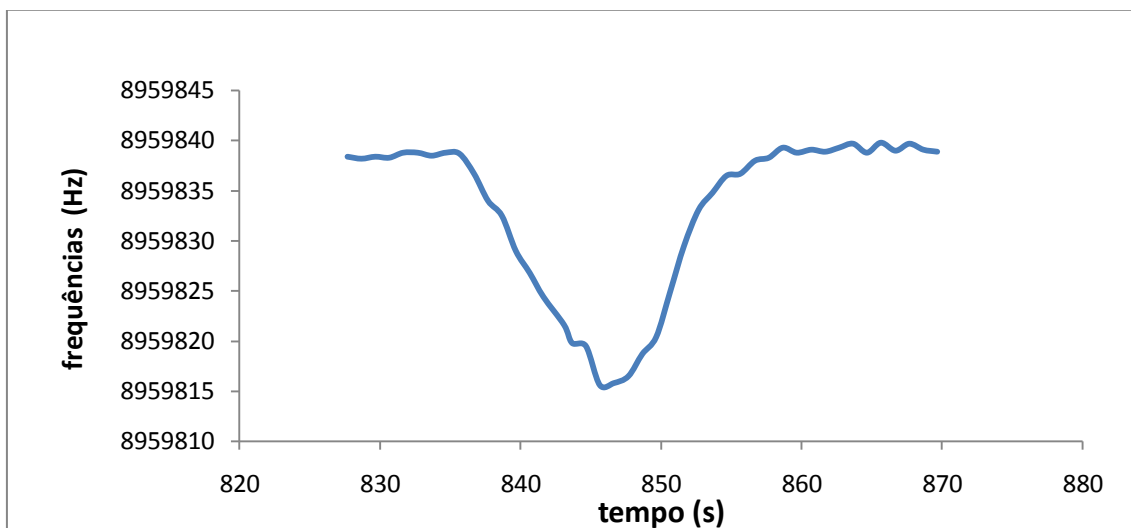


Figura 14: Frequência do cristal piezoeléctrico antes e depois da injeção de 0,5mL da solução amostra.

A figura 14 mostra mais uma vez que o OMCP-naftoquinona interage de uma forma reversível e rápida com o ião fluoreto presente na amostra, com um tempo de resposta e de recuperação após a injeção de aproximadamente 25s.

Este sinal é muito semelhante ao da figura 9, que corresponde à injeção de um padrão de ião fluoreto com uma concentração próxima da solução amostra.

- **Curvas de calibração do ião fluoreto**

Nas tabelas 3 e 4 mostram-se as variações de frequência obtidas injectando padrões de concentrações diferentes de ião fluoreto.

Tabela 3: Variações de frequência observadas para diferentes padrões do ião fluoreto, a usar para a determinação da sua concentração nas amostras.

	- Δf (Hz)				
[F]ppm	1ª Amostra	2ª Amostra	3ª Amostra	4ª Amostra	5ª Amostra
11,42	8	7	6	7	6
23,36	13	11	11	10	10
34,83	19	14	14	14	13
46,76	25	19	18	18	17
58,70	31	23	22	22	21

Estas variações de frequência com as concentrações do ião fluoreto permitiram construir as diferentes curvas de calibração apresentadas na figura 15, seguinte:

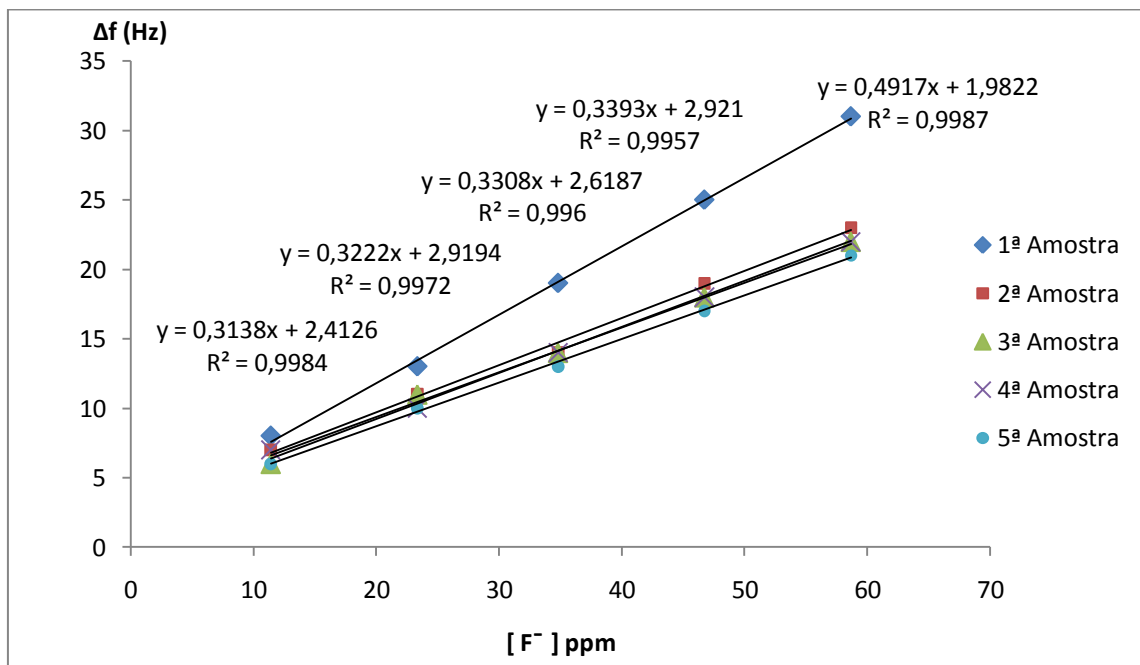


Figura 15: Rectas de calibração usadas para a determinação do ião fluoreto na amostra

Na tabela 4 seguinte mostram-se as variações de frequência com as concentrações do ião fluoreto a usa-las na determinação do ião fluoreto nos brancos.

Tabela 4: Variações de frequência observadas com diferentes padrões do ião fluoreto, a usar para a determinação da sua concentração nos brancos.

[F ⁻]ppm	-Δf (Hz)				
	1º Branco	2º Branco	3º Branco	4º Branco	5º Branco
4,079	4	4	4	3	4
7,819	6	5	6	5	5
11,42	7	7	8	7	8
23,36	13	13	12	11	12
34,83	19	18	18	17	17
46,76	24	23	23	22	22

Na figura 16 mostram-se as diferentes rectas a usa-las na determinação da concentração de iões fluoreto nos brancos.

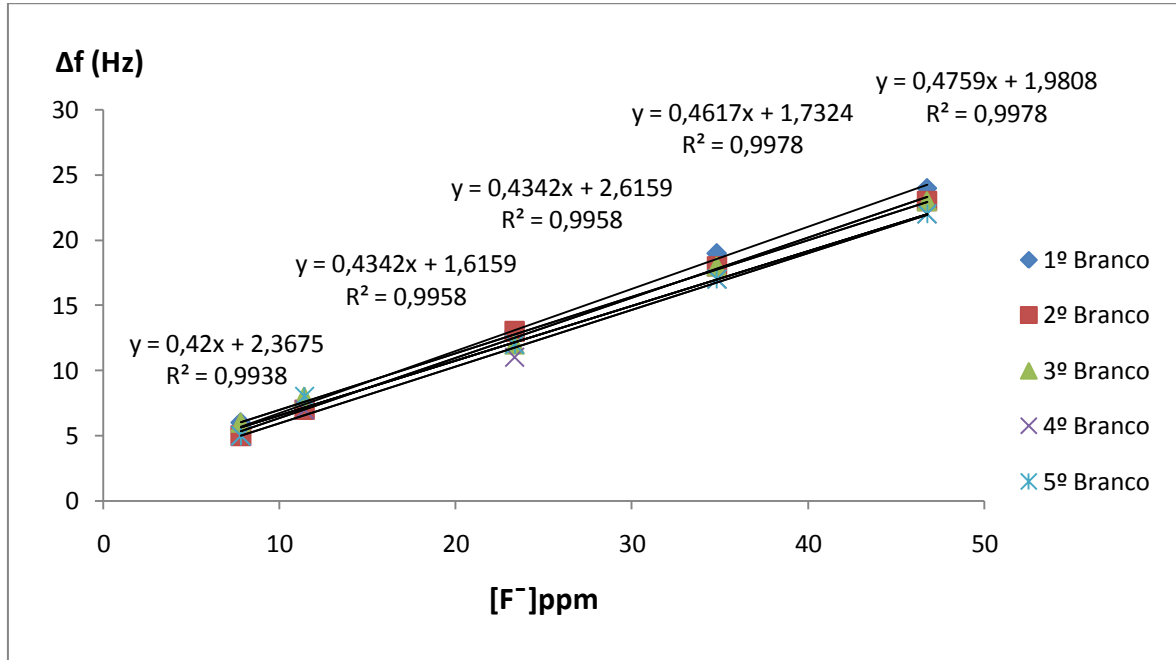


Figura 16: Rectas de calibração usadas para a determinação do ião fluoreto no branco

- **Concentração do íon fluoreto na solução amostra**

Na tabela 5 mostram-se as massas dos 4 comprimidos usados na análise das 5 réplicas e a variação média da frequência resultante das leituras obtidas com 5 injeções de cada réplica.

Tabela 5: Dados experimentais referentes à amostra dos 4 comprimidos, ao volume em que foram dissolvidos e a média das variações das frequências obtidas em 5 injeções da amostra.

Dados referentes a amostra	Amostra				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Massa de 4 comprimidos (g)	0,1578	0,1582	0,1599	0,1577	0,1597
Volume da solução com os 4 comprimidos (mL)	49,64	49,64	49,64	49,64	49,64
Média Δf (Hz) das 5 injeções	22,0	16,6	16,2	15,8	15,2

A tabela 6 mostra as variações de frequências obtidas na análise de cinco brancos.

Tabela 6: Variações de frequências médias na análise do branco (5 injeções de cada branco)

Análises do branco	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Vol. dos balões contendo as sol. dos brancos (mL)	49,64	49,64	49,64	49,64	49,64
Média Δf (Hz) das 5 injeções	4,6	4,4	4,8	4,0	4,8

Usando as equações lineares ajustadas pelo método dos mínimos quadrados, que se encontram nas figuras 15 e 16, e os valores das variações das frequências (Δf) das tabelas 5 e 6, estimaram-se os valores da concentração do íon fluoreto nas amostras e nos brancos, respectivamente.

Uma vez que o fabricante indica uma massa de 40,0mg por comprimido e os comprimidos analisados tinham massa variável em resultado do desgaste dos mesmos produzidos pelos choques sofridos ainda na embalagem, as concentrações indicadas na tabela 7, foram corrigidas para a massa de 4x40,0mg, sendo 4 o número de comprimidos usados, e também foram corrigidos os volumes dos balões de diluição para 50,00mL.

Na tabela 7 apresentam-se as concentrações médias obtidas experimentalmente para as amostras e os brancos, bem como o seu desvio padrão.

Tabela 7: Concentrações corrigidas dos íões fluoreto na solução amostra e no branco

Análises	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	Média	s
[F ⁻] ppm na amostra	40,98	40,48	40,79	40,27	40,53	40,61	0,1240
[F ⁻] ppm no branco	5,41	5,44	5,32	5,77	5,82	5,55	0,1019

Subtraindo a média dos brancos da média das amostras, vem para o teor do íon fluoreto com um nível de confiança de 95%, o valor experimental de **35,06 ± 0,45ppm**.

Expressando o teor em íon fluoreto por comprimido, admitindo que um comprimido intacto pesava 40mg, conforme informação da Novartis Consumer Health, viria:

0,44 ± 0,02mg de íon fluoreto/ comprimido

O valor indicado pelo fabricante de 0,45mg está dentro do intervalo de confiança da média experimental.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Da análise dos resultados obtidos experimentalmente conclui-se que:

O OMCP-naftoquinona interage de uma forma reversível e rápida com o ião fluoreto, com um tempo de resposta e de recuperação após a injeção da solução de aproximadamente 25s.

O cristal piezoelétrico de quartzo revestido com uma quantidade de revestimento de OMCP-naftoquinona que provocou um decréscimo de frequência de 22kHz, tem uma zona de calibração linear compreendida entre 4 e 80ppm onde a sensibilidade do ião fluoreto é de 0,45Hz/ppm e permite detectar uma concentração de 3,66ppm do ião fluoreto.

O sensor desenvolvido responde a todos outros aniões estudados pela seguinte ordem, dada pelos valores dos coeficientes de selectividade: formato < cloreto < brometo < acetato < fosfato < nitrato < sulfato < iodeto < fluoreto.

Após um período de 8 semanas de calibrações o sensor começa a perder uma quantidade significativa do revestimento. Esta perda de revestimento reflecte-se na diminuição da sensibilidade e consequentemente na diminuição dos valores das respostas do sensor.

A comparação do valor obtido experimentalmente utilizando o sensor químico de massa baseado em microbalança de cristais piezoelétricos de quartzo e o valor conhecido, mostrou uma concordância entre os valores, com um nível de confiança de 95%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Wang, L., Meyerhoff, M. E., Polymethacrylate polymers with appended aluminum (III)-tetraphenylporphyrins: Synthesis, characterization and evaluation as macromolecular ionophores for electrochemical and optical fluoride sensors, *Anal. Chim. Acta*, (2008), 611: 97-102.
- [2] Malinowska, E., Górski, L., Meyerhoff, M.E., Zirconium(IV)-porphyrins as novel ionophores for fluoride-selective polymeric membrane electrodes, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 468: 133–141.
- [3] WHO (World Health Organization), Chapter 6.5: Fluorides, (2000), *Air Quality Guidelines*, 2nd Edition, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 1-9. Acedido em 15, Abril, 2010, em: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf.
- [4] Fawell, J., Bailey, K., Chilton, J., Dahi, D., Fewtrell, L., Magara, Y., Fluoride in Drinking-water, WHO, (2006), 1-134.
- [5] Wilson, S. A., Gent, C.A., The Determination of Fluoride in Geologic Samples by Ion Chromatography, *Anal. Lett.*, (1982), 15: 851-856.
- [6] Gonçalves, M.L.S.S., Métodos Instrumentais de Análise de soluções, *Análise Quantitativa*, Fundação Calouste Gulbenkian, (1996), 3^a edição, 237-258 e 553-591.
- [7] Gjerde, D.T., Fritz, J.S., *Ion Chromatography*, New York, (1987,) 2nd Edition, 9-17 e 94.
- [8] Haddad, P.R., Comparison of ion chromatography and capillary electrophoresis for the determination of inorganic ions, *J. Chromatogr. A*, (1997), 770: 281-290.
- [9] Patterson, M.M., Reddy, J.K., Jackson, R., Comparison of Two Methods for Analysis of Fluoride in Vegetation Standard, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (2003), 34: 1077-1082.
- [10] Michalski, R.; Mathews, B., Simultaneous determination of fluoride and monofluorophosphate in toothpastes by suppressed ion chromatography, *Central European Journal of Chemistry*, (2006), 4: 798-807.

- [11] Willend, H., Merritt, L., Dean, J., *Análise Instrumental*, Fundação Calouste Gulbenkian, (1979), 2ª edição, 668-669.
- [12] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, (2001), McGraw Hill, 5ª edição, 536-537.
- [13] Yamamura, S.S., Wade, M.A., Sikes, J.H., *Direct Spectrophotometric Fluoride Determination*, *Anal. Chem.*, (1962), 34: 1308-1312.
- [14] Cattaral, R.W., *Chemical Sensor*, Oxford Chemistry Primers, New York, (1997), 52: 1-73.
- [15] Hulanicki, A., Staniseaw, G., Folke, I., *Chemical Sensors: Definitions and Classification*, *Pure Appl. Chem.*, (1991), 63: 1247-1250.
- [16] Buck, R.P., Lindner, E., Kunter, W., Inzelt, G., *Piezoelectric Chemical Sensors*, *Pure Appl. Chem.*, (2004), 76: 1139-1160.
- [17] Buttry, D.A., Ward, M.D., *Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance*, *Chem. Rev.*, (1992), 92: 1355-1379.
- [18] Taylor, G.W., Gagnepain, J.J., Meeker, T.R., Nakamura, T., Shuvalov, L.A., *Piezoelectricity - ferroelectricity and related phenomena*, Gordon and Breach Science Publishers, New York, (1985), Vol.4.
- [19] Gomes, M.T., *Desenvolvimento de Sensores Baseados em Microbalanças de Cristais piezoelétricos para a determinação de CO₂ e SO₂*, Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro (1996), 38-53.
- [20] O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., *Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications*, *Biosensors & Bioelectronics*, (1999), 14: 663-670.
- [21] Wu, D.H., Tsai, T.Y., Yen, Y.T., *Robust design of quartz crystal microbalance using finite element and Taguchi method*, *Sens. Actuators B*, (2003), 9: 337-344.

- [22] Itoh, A., and Ichihashi, M., A frequency of the quartz crystal microbalance (QCM) that is not affected by the viscosity of a liquid, *Meas. Sci. Technol.*, (2008), 9: 1-9.
- [23] Yoshimoto, M., Tokimura, S., Kurosawa, S., Characteristics of the series resonant-frequency shift of a quartz crystal microbalance in electrolyte solutions, *The Analyst*, (2006), 131: 1175–1182.
- [24] Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J., Piezoelectric quartz crystal biosensors, *Talanta*, (1998), 46: 1223-1236.
- [25] Kanazawa, K.K., Gordon, J.G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid, *Anal. Chem.*, (1985), 57: 1770-1771.
- [26] Wang, D., Mousavi, P., Hauser, P.J., Oxenham, W., Grant, C.S., Quartz crystal microbalance in elevated temperature viscous liquids: Temperature effect compensation and lubricant degradation monitoring, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, (2005), 268: 30-39.
- [27] Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H., Biosensors based on piezoelectric transducers, *Analisis*, (1999), 27: 606-616.
- [28] Farinha, A. S. F., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Reconhecimento supramolecular de aniões por macrociclos tetrapirrólicos, *Ver. Virtual Quim.*, (2009), 1: 170-180.
- [29] Nishiyabu, R., Anzenbacher, P., 1,3-Indane-Based Chromogenic Calixpyrroles with Push–Pull Chromophores: Synthesis and Anion Sensing, *Org. Lett.*, (2006), 8: 359-362.
- [30] Tóth, K., Stulík, K., Kutner, W., Fehér, Z., Linder, E., Electrochemical Detection in Liquid Flow Analytical Techniques: Characterization and Classification, *Pure Appl. Chem.*, (2004), 76: 1119–1138.
- [31] Zagatto, E.A.G., Staden, J.F.V., Maniasso, R.I., Marshall, G.D., Information Essential for Characterizing a Flow-Based Analytical System, *Pure Appl. Chem.*, (2002), 74: 585–592.
- [32] Ruzicka, J., Hansen, E.H., Retro-review of flow-injection analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, (2008), 27: 390-393.

[33] Malde, M.K., Bjorvan, K., Julshamn, K., Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode, *Food Chemistry*, (2001), 73: 373-379.

[34] Miller, J.N., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Prentice Hall, Harlow, (2005), 5th ed.: 1-262

[35] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of chemometrics and qualimetrics*, Amsterdam, (1997), 2nd ed.: 208-209.

[36] Kathryn E.M.L., Howard, L.C., Comparison of the SPADNS-Zirconium Lake and Specific Ion Electrode Methods of Fluoride Determination in Stack Emission Samples, *Anal. Chem.*, (1973), 45: 1272-1273.