

M. C. U. Araújo, S. R. B. Santos, E. A. Silva, G. Vêras

Departamento de Química - CCEN - UFPB - CP 5093 - 58051-970 - João Pessoa - PB

J. L. F. C. Lima e R. A. S. Lapa

Faculdade de Farmácia - Depto de Química-Física - Universidade do Porto - Portugal

Recebido em 21/3/96; aceito em 13/11/96

**AN INEXPENSIVE FLOW PHOTOMETER FOR CLINICAL ANALYSIS BASED ON A BICOLOUR LIGHT EMITTING DIODE.** The construction and evaluation of an inexpensive flow photometer for clinical analysis, using a bicolour LED and a phototransistor adapted for tubular flow cell, are described. The instrument presents some new features such as: automatic zero, electronic calibration and peak-hold signal. When compared with a classical photometer, it is simpler and has the advantages of a flow analysis system: lower volumes of reagents and samples, lower levels of contamination, shorter time for analysis and lower analysis costs. The instrument was used in the determination of the constituents in blood samples. The results obtained agree with those obtained by a classical photometer and the precision was better.

**Keywords:** flow photometer; light emitting diode; clinical analysis.

## INTRODUÇÃO

Um grande número de análises químicas realizadas no mundo empregam a fotometria de absorção molecular na região do visível, sendo corrente o uso de fotômetros (ou fotocolorímetros) que utilizam como fonte de radiação visível uma lâmpada de tungstênio, e para selecionar a radiação analítica de interesse eles empregam filtros e lentes óticas. Tem sido mostrado na literatura<sup>1-31</sup> que a utilização de um LED ("light emitting diode") como fonte de radiação visível, além de dispensar o emprego de lâmpadas de tungstênio, filtros e lentes óticas, permite construir fotômetros simples, baratos, duráveis e de pequeno volume.

O espectro de emissão da maioria dos LEDs na região visível apresenta normalmente larguras de bandas menores do que  $\pm 20\text{nm}$  que são comparáveis aos melhores filtros óticos, que apresenta largura de banda de  $\pm 10$  a  $\pm 30\text{nm}$ <sup>8,31</sup>. A intensidade da luz emitida por um LED é cerca de 5 vezes maior do que a intensidade de um feixe proveniente da fenda de saída de um monocromador<sup>2,31</sup>. O tempo de vida útil de trabalho contínuo para um LED é tipicamente de 50.000 horas (variando entre 20.000 a 100.000 horas), enquanto que para uma lâmpada de tungstênio é de 1000-2000 horas<sup>7,31</sup>. A colocação do LED diretamente na célula fotométrica permite superar problemas de colimação, focagem e alinhamento do feixe de luz, e isso é de interesse especial quando se trabalha com constituinte na faixa de micro ou traços, empregando longos caminhos óticos<sup>2</sup>. Outras vantagens dos LEDs são o baixo consumo de energia e a alta estabilidade, o que dispensa a necessidade de circuitos eletrônicos caros e especiais para controlar a fonte de radiação. A alta estabilidade dos LEDs tem permitido atingir desvios padrão nas medidas de absorbância de até  $7,5 \times 10^{-7}$ <sup>31</sup>. Portanto, os LEDs são fontes de radiação bastante adequadas para a construção de fotômetros usados nas análises por absorção molecular na região visível.

Dasgupta et al<sup>31</sup>, em uma excelente revisão, descrevem em detalhes, os diferentes fotômetros a base de LED, com respeito a construção, os circuitos eletrônicos, os desenhos das celas de

detecção, a performance e o custo destes instrumentos. Além do mais, eles discutem sucintamente as características dos LEDs e dos detectores disponíveis comercialmente.

Embora sejam conhecidos LEDs que emitem radiações em todas as regiões do visível<sup>31</sup>, não são encontrados comercialmente LEDs que emitem simultaneamente em mais de duas regiões. Um dos LEDs bicolores mais comum é aquele que emite na região verde e na vermelha. Todavia, o número limitado de LEDs multiemissor não é um sério problema pois, devido ao grande número de métodos fotométricos existentes para uma mesma espécie química, é possível encontrar um procedimento adequado que permita que sejam feitas análises nas regiões verdes e vermelha. Por exemplo, a literatura registra<sup>32-34</sup>, que quase todas as análises fotométricas dos constituintes de soro ou plasma sanguíneo podem ser realizadas usando ou filtro verde (ou LED verde) ou filtro vermelho (ou LED vermelho).

Apesar das inúmeras referências que têm surgido na literatura<sup>31</sup> acerca da construção de fotocolorímetros baseados em LED como elemento emissor, na sua maioria, eles apresentam alguns problemas operacionais que reduzem a facilidade da sua utilização em sistemas analíticos, principalmente devido a não incorporarem as possibilidades de zeragem automática rápida e estável, calibração eletrônica, que dispensa o uso freqüente de soluções padrão e detecção de sinal de pico, que descarta o uso de um registrador potenciométrico em técnicas de análise por injeção em fluxo. Além do mais, normalmente eles não são adequados à análise em fluxo. Incorporando todas essas características, desenvolveu-se, neste trabalho, um fotômetro a base de um LED bicolor (verde e vermelho) e um fototransistor, adaptados a uma cela de fluxo tubular<sup>35</sup>. A performance deste fotocolorímetro foi avaliada realizando dosagens clínicas (colesterol, uréia, glicose, etc.) em soro ou plasma sanguíneo.

## EXPERIMENTAL

### Reagentes, Soluções Padrão e Amostras

Nos testes preliminares para verificação da linearidade do fotômetro desenvolvido, foram empregadas soluções de  $\text{KMnO}_4$  e de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . As soluções padrão empregadas

E-mail:ugulino@terra.npd.ufpb.br

foram preparadas por diluições adequadas de suas soluções estoques (0,100M de  $KMnO_4$  e 1,00M de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ).

Os reagentes e as soluções padrão utilizadas nas determinações de proteínas totais, albumina, colesterol, uréia, hemoglobina, ácido úrico e glicose foram adquiridos em forma de kits da empresa BIOCLIN<sup>32</sup>. A preparação dos reagentes foi realizada conforme procedimento descrito no manual de instruções fornecido pela BIOCLIN<sup>32</sup>.

As amostras de soro e plasma sanguíneo foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba e foram analisadas sem qualquer tratamento prévio.

## Materiais e Equipamentos

Para efetuar um estudo comparativo do fotômetro de fluxo foi utilizado um fotômetro clássico da marca Procyon, modelo C-27. As medidas com este instrumento foram realizadas usando cubetas cilíndricas de vidro.

Todos os componentes eletrônicos utilizados na construção do fotômetro de fluxo foram adquiridos no comércio local.

## Cela de Detecção

A cela de detecção, mostrada na figura 1, foi construída em um bloco retangular opaco de baquelite, ao qual se fez passar um tubo de vidro com diâmetro interno de 2mm e 25mm de comprimento. O LED e o fototransistor foram colocados frontais um ao outro e perpendiculares ao tubo de vidro. A cela possui um volume morto de cerca de 100 microlitros.

## Construção do Fotômetro de Fluxo

O circuito eletrônico global do fotocolorímetro de fluxo, mostrado na figura 2, pode ser desdobrado nas seguintes malhas:

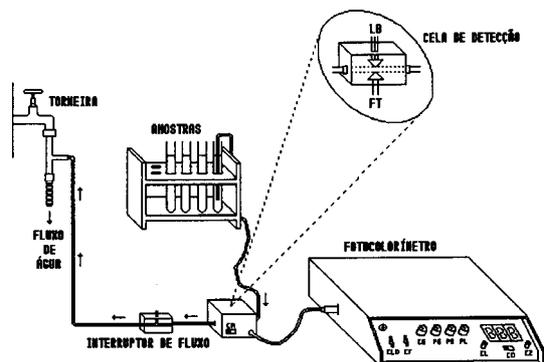


Figura 1. Sistema de análise com o fotômetro de fluxo.

fonte de radiação, detector, ganho, zero automático, retentor de pico, displays e fonte de alimentação. A pinagem dos circuitos integrados (CI) e os valores dos componentes discretos são mostrados no Apêndice.

A malha da fonte de radiação é formada pelas chaves CLD(LED), CF, CR e CG, pelas resistências R1 a R9 e pelos LEDs monocolor LM e bicolor LB. LM é usado para sinalizar quando o instrumento é ligado. LB é usado como fonte de radiação visível: verde (com comprimento de onda máximo,  $\lambda_{max}$ , a 560nm e largura a meia altura da banda emitida,  $w_{1/2}$ , de  $\pm 15nm$ )<sup>31</sup> ou vermelha (com  $\lambda_{max}$  a 630nm e  $w_{1/2}$  de  $\pm 8nm$ )<sup>31</sup>. A radiação emitida por LB é selecionada usando a chave CR. As resistências R1 a R4 têm a função de limitar a corrente sobre os LEDs. A responsividade do detector e a intensidade da radiação emitida por LB na região verde são menores do que na região vermelha. Para permitir que o sinal produzido em ambas regiões fosse de mesma grandeza foi colocado o resistor R5. As resistências R6 a R9, selecionadas

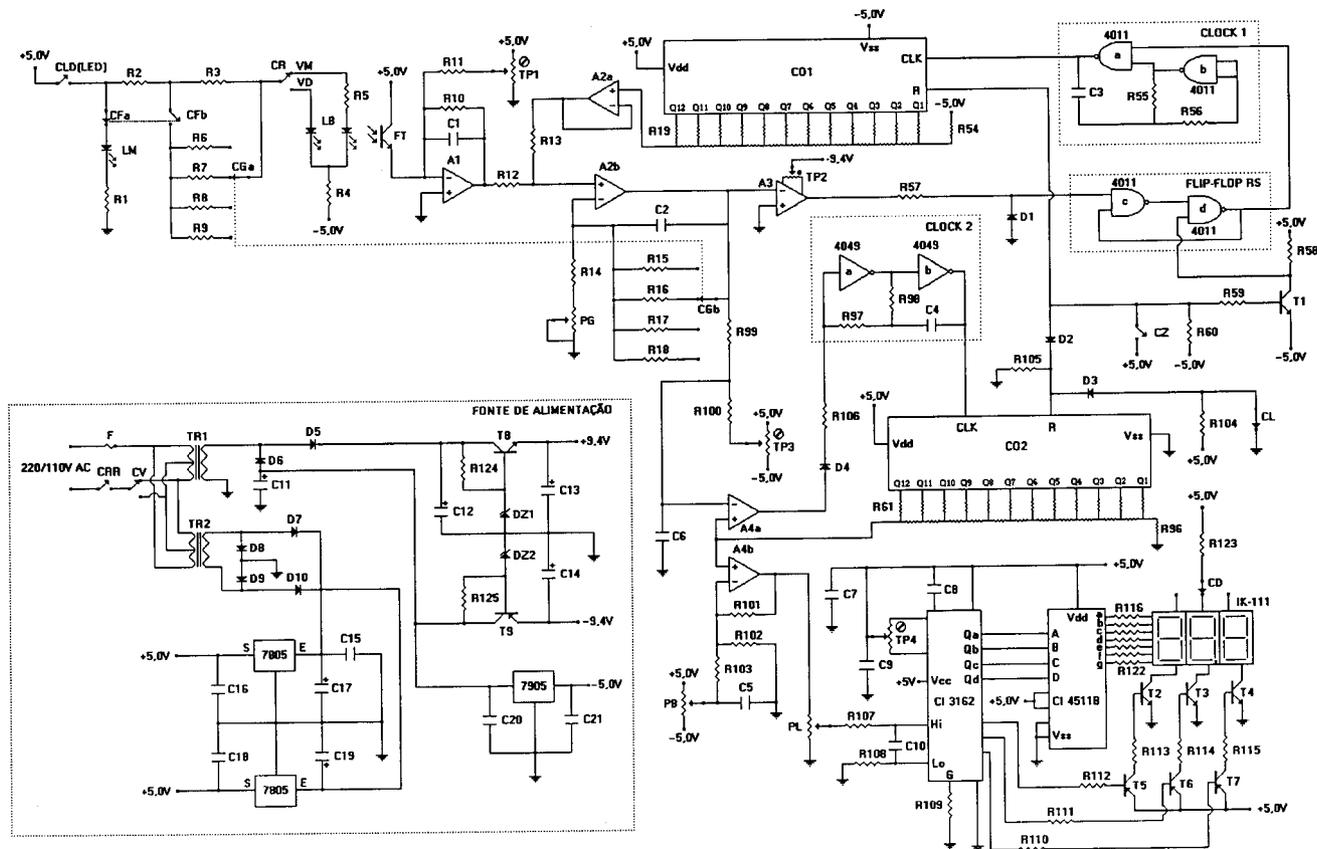


Figura 2. Circuito eletrônico global do fotocolorímetro de fluxo.

dependendo da posição da chave **CG**, são usadas para selecionar o ganho do fotômetro de fluxo.

A *malha do detector* é formada pelo fototransistor **FT**, pelo amplificador operacional **A1** (**CI 3140**), pelo capacitor **C1**, pelo trimpot **TP1** e pelas resistências **R10** e **R11**. A radiação ao incidir sobre a superfície fotossensível do **FT** faz drenar uma corrente que é amplificada pelo **A1**. **TP1** polariza o circuito do detector de modo que, nas condições de iluminação normal, a saída de **A1** esteja dentro do limite de controle da rampa digital gerada na malha do zero automático. **C1** é usado para filtrar ruídos de alta frequência.

A *malha de ganho* é formada por um dos amplificadores operacionais (**A2b**) do **CI 747**, pelas resistências **R12** a **R18**, pelo potenciômetro de ganho **PG**, pelo capacitor **C2** e pela chave de ganho **CG**. Dependendo da posição do potenciômetro **PG** e da chave **CG** é possível se obter ganhos de tensão de 1 a 8 vezes do valor proveniente da malha do detector. Na amplificação, os ruídos de alta frequência são filtrados, devido a colocação do capacitor **C2**. As resistências **R12** e **R13** são resistências que formam um somador de corrente na entrada do amplificador operacional **A2b**.

A *malha de zero automático* é constituída de outras quatro sub-malhas: conversor (D/A), **clock 1**, **flip-flop RS** e comparador. A sub-malha do conversor D/A é formada pelo contador **CO1** (**CI 4040B**), uma associação de resistências em escada R-2R (**R19** a **R54**) e um buffer, formado com o segundo amplificador operacional (**A2a**) do **CI 747**. A sub-malha do **clock 1** é formada por duas portas **NAND**(a e b) do **CI 4011**, pelo capacitor **C3** e pelas resistências **R55** e **R56**. A sub-malha do **flip-flop RS** foi construída usando as outras duas portas **NAND** (c e d) do mesmo **CI 4011**. A sub-malha do comparador é formado pelo amplificador operacional **A3** (**CI 741**), o trimpot **TP2** de ajuste de offset do **A3** e o diodo **D1** e a resistência **R57**, usados para proteção do **flip-flop RS**. A malha de zero automático conta ainda com o transistor **T1** (**BC548**), a chave de zeragem automática **CZ**, as resistências **R58** a **R60**, utilizados para controle do **flip-flop RS**, e o diodo **D2**, usado para impedir a zeragem do contador **CO1** (**CI 4040B**), quando do acionamento da chave **CL**, durante uma leitura do retentor de pico.

A *malha do retentor de pico* é constituída de outras quatro sub-malhas: conversor D/A, **clock 2**, comparador e correção de drift do instrumento. A sub-malha do conversor D/A é formada pelo contador **CO2** (**CI 4040B**) e uma associação de resistências em escada R-2R (**R61** a **R96**). A sub-malha do **clock 2** é formado por duas portas inversoras (a e b) do **CI 4049**, as resistências **R97** e **R98** e o capacitor **C4**. A sub-malha do comparador é formada por um dos amplificadores operacionais (**A4a**) do **CI 747**, pelas resistências **R99** e **R100** e pelo trimpot **TP3**, usado para ajuste de "offset" do amplificador operacional **A4a**. A malha de correção de drift do instrumento é formada pelo segundo amplificador operacional (**A4b**) do **CI 747**, pelas resistências **R101** a **R103**, pelo capacitor **C5** e pelo potenciômetro **PB**. A malha do retentor de pico conta ainda com as resistências **R104** e **R105**, o diodo **D3**, que permite a zeragem do contador **CO2** (**CI 4040B**) apenas quando a chave de leitura **CL** estiver aberta, o capacitor **C6**, usado para eliminar ruído na entrada do comparador **A4a**, o diodo **D4** e a resistência **R106**, usados para proteção do **clock 2**.

A *malha dos display* é composta de um conversor A/D (**CI 3162**) para sistemas de leituras em três dígitos, um decodificador (**CI 4511B**) de BCD para sete segmentos e três displays **Icotron-111**. Os transistores, a chave de ponto decimal **CD**, os resistores e os capacitores foram colocados segundo as especificações do fabricante dos circuitos integrados. Esta malha necessita apenas de uma alimentação de +5V e permite leituras de -99mV a +999mV correspondendo a valores numéricos de -99 a 999. Esta malha conta ainda com um potenciômetro de leitura **PL**, usado para ajustar nos displays um valor qualquer desejado.

A *malha da fonte de alimentação* foi construída para fornecer

tensões de +9,4V, -9,4V, +5V e -5V, sendo as duas primeiras usadas para alimentar os circuitos integrados **CI 747** e as duas últimas usadas para alimentar o restante de todo o circuito. As tensões +5 e -5V foram reguladas usando os **CI 7805** e **7905**, enquanto as tensões +9,4 e -9,4V foram reguladas usando transistores **BC338**. Foram também incluídos nesta malha filtros capacitivos e indutivos. A utilização de dois reguladores **7805** deveu-se a nossa opção de usar, para alimentar o conversor **A/D 3162** da malha dos displays, uma alimentação independente da alimentação do restante do circuito. Ele foi colocado na mesma placa, junto ao **A/D 3162**, para descartar qualquer possibilidade de haver algum tipo de oscilação na leitura, como é muito comum neste tipo de montagem. Para não ter essa preocupação, para economizar tempo durante a montagem do circuito e devido ao baixo custo do **7805**, resolvemos usar mais um deste **CI**.

## FUNCIONAMENTO DO FOTÔMETRO DE FLUXO

### Zeragem Automática

Inicialmente, coloca-se o branco no caminho ótico, pressiona-se solta-se a chave **CZ**. Os contadores **CO1** e **CO2** são zerados pelo fornecimento de um nível lógico alto (+5V) as suas entradas de **RESET**. Ao mesmo tempo, o transistor **T1** é levado a saturação, fornecendo um nível lógico baixo (-5V) a entrada de **SET** do **flip-flop RS**. Como a entrada de **RESET** do **flip-flop RS** se encontra em um nível lógico alto, porque a tensão negativa fornecida pela malha de ganho leva o comparador **A3** da malha de zero automático a gerar um nível lógico alto, o **flip-flop RS** gera em sua saída um nível lógico alto, acionando o **clock 1**. Uma rampa de tensão, com resolução de 2,44mV mas, reduzida para 0,244mV pelo divisor de tensão formado pelas resistências **R12** e **R13**, é gerada pelo contador **CO1**, até se igualar ao sinal proveniente da comparador **A1** da malha do detector. A partir de então, o comparador **A3** envia um nível baixo a entrada do **RESET** do **flip-flop RS**, desativando o **clock 1**. O sinal do contador **CO2**, que continua em zero, é enviado através do amplificador **A4b** ao circuito dos displays e, após conversão analógica para digital, um valor zero é apresentado nos displays do fotômetro de fluxo. Se por acaso aparecer um pequeno sinal de ruído, flutuação ou até mesmo um drift térmico após longo tempo de uso, um ajuste fino do zero pode ser obtido utilizando-se o potenciômetro **PB**.

### Leitura de uma Solução Absorvente (Leitura do Retentor de Pico)

Inicialmente, coloca-se a solução absorvente na cela de detecção, pressiona-se e solta-se a chave **CL**. As saídas do contador **CO2** e a entrada não inversora do comparador **A4a** da malha do retentor de pico são zerados pelo fornecimento de um nível lógico alto (+5V) a entrada de **RESET** do **CO2**. Como um sinal positivo, proveniente da malha de ganho, é gerado na entrada inversora do comparador **A4a**, um nível lógico baixo é produzido na sua saída. Com isso o **clock 2** é ativado, dando início a formação de uma rampa de tensão (com resolução de 0,25mV) no contador **CO2**. Quando a rampa de tensão se iguala a tensão de entrada da malha de ganho, o comparador **A4a** gera um sinal alto na entrada do **clock 2**, desativando-o. O sinal analógico da saída do contador **CO2** é digitalizado na malha dos displays e apresentado nos displays do fotômetro de fluxo.

### Procedimentos Analíticos

Todas as determinações foram realizadas usando metodologias analíticas já bem estabelecidas<sup>33,34</sup> e descritas no manual de instruções fornecido pela **BIOCLIN**<sup>32</sup>. Na tabela 1 é mostrado um quadro das metodologias utilizadas na determinação das

**Tabela 1.** Métodos usados nas dosagens clínicas e as regiões do visível em que foram realizadas as medidas com fotômetro de fluxo e com clássico.

Análises	Métodos	Regiões do Visível	
		Clássico(Filtro)	Fotômetro de Fluxo(LED)
Proteínas Totais	Biureto	verde( $\lambda_{\text{máx}}=530\text{nm}$ )	verde( $\lambda_{\text{máx}}=560\text{nm}$ )
Albumina	Verde de Bromocresol	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )
Colesterol	Liebermann-Buchard	verde( $\lambda_{\text{máx}}=530\text{nm}$ )	verde( $\lambda_{\text{máx}}=560\text{nm}$ )
Uréia	diacetilmonoximatiossemicarbazida	verde( $\lambda_{\text{máx}}=530\text{nm}$ )	verde( $\lambda_{\text{máx}}=560\text{nm}$ )
Hemoglobina	ferricianeto-cianeto de potássio	verde( $\lambda_{\text{máx}}=530\text{nm}$ )	verde( $\lambda_{\text{máx}}=560\text{nm}$ )
Ácido Úrico	fosfotungstato de sódio	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )
Glicose	o-toluidina	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )	vermelho( $\lambda_{\text{máx}}=630\text{nm}$ )

diferentes espécies analisadas e qual a região do visível em que foram realizadas as medidas com fotômetro de fluxo e com fotômetro clássico.

#### Medidas com o Fotômetro Clássico

As medidas com o fotômetro clássico foram realizadas de acordo com as seguintes etapas: após seleção do filtro ótico (verde ou vermelho) e de se esperar um tempo (cerca de 15 minutos) para estabilização eletrônica, o 0% de transmitância é ajustado acionando o interruptor do feixe ótico e o 100% é ajustado enchendo a cubeta com o branco e colocando-a no caminho ótico. Enche-se a cubeta com a solução padrão e mede-se a sua transmitância. Depois, para cada amostra, enche-se a cubeta e mede-se as suas transmitâncias. Após calcular as absorvâncias para a solução padrão e para as amostras, usando a expressão  $A = 2 - \log T\%$ , a concentração de cada amostra, **Ca**, é calculada pela equação:  $Ca = F.Aa$ ; onde, **F** é a relação  $Cp/Ap$ , conhecida comumente como fator de calibração, **Aa** e **Ap** são as absorvâncias da amostra e da solução padrão e **Cp** é a concentração conhecida da solução padrão.

#### Medidas com Fotômetro de Fluxo sem Calibração Eletrônica

As medidas com o fotômetro de fluxo foram realizadas de acordo com as seguintes etapas: após selecionar, usando a chave **CR**, a radiação (verde ou vermelha) a ser emitida pelo LED bicolor e esperar um tempo (cerca de 15 minutos) para estabilização eletrônica, o branco é aspirado para encher a cela de detecção. O enchimento da cela é feito sobre a ação de uma trompa de vácuo (Fig. 1), quando o tubo capilar é mergulhado no recipiente contendo o branco e o orifício do interruptor de aspiração do fluido (Fig. 1) é tampado com o dedo. Com o branco no caminho ótico, faz-se a zeragem automática do instrumento pressionando (fechando) e soltando (abrindo) a chave de zero **CZ**. Enche-se a cela de fluxo com a solução padrão, pressiona-se (abre-se) e solta-se (fecha-se) a chave de leitura **CL**. Um valor qualquer, entre 0 e 999, aparecerá nos displays do fotocolorímetro de fluxo. Utilizando o potenciômetro de leitura **PL** e a chave **CG**, esse sinal é ajustado ao valor conhecido da concentração da solução padrão. Este valor pode ser, por exemplo, 3,8 (em unidade g/dl) para solução padrão de albumina, 100 (em unidade de g/dl) para glicose, 200 (em

unidade g/dl) para colesterol, etc., que são os valores das concentrações das soluções padrão, normalmente usadas nestas análises. Coloca-se a amostra no caminho ótico e, após pressionar e soltar a chave **CL**, o valor da concentração do analito aparecerá diretamente nos displays.

#### Medidas com Fotômetro de Fluxo Usando Calibração Eletrônica

Em laboratórios de análises clínicas usando um fotômetro convencional, dois procedimentos de calibração são normalmente utilizados em rotina.

- 1- Inicialmente, é feito o ajuste de 0 e 100% de transmitância do instrumento e, após a realização da marcha analítica, é medida a absorvância de uma solução padrão e o seu valor é anotado e guardado. Mede-se as absorvâncias das amostras e usando o valor anotado da absorvância da solução padrão, medida anteriormente, são calculadas as concentrações das amostras, multiplicando os valores de suas absorvâncias pelo parâmetro fator. Ao reiniciar uma nova análise, após o aparelho ter sido desligado, é feito o ajuste de 0 e 100% e, após a marcha analítica, é medida apenas as absorvâncias das amostras e a concentração de cada amostra é calculada multiplicando o parâmetro fator pelo valor de sua absorvância. Assim, este procedimento não utiliza uma solução padrão, ao reiniciar uma nova análise. Entretanto, para cada amostra, o valor da sua concentração necessita ser calculado a posteriori.
- 2- Inicialmente, é feito o ajuste de 0 e 100% de transmitância do instrumento e, após a marcha analítica, a solução padrão é colocada no caminho ótico e um valor qualquer é apresentado nos displays. Usando o botão de calibração, faz-se aparecer nos displays o valor conhecido da concentração da solução padrão. A solução padrão é trocada pela amostra e o valor da concentração é apresentado diretamente nos displays. Ao reiniciar uma nova análise, após o aparelho ter sido desligado, todo este procedimento precisa ser novamente repetido, pois não é possível definir exatamente a posição do botão de calibração, sem usar uma solução padrão, mesmo utilizando uma marca no painel do instrumento. Assim, este procedimento dispensa a necessidade de cálculos a posteriori; entretanto, ele sempre exige a utilização de uma solução padrão, ao reiniciar uma nova análise.

A calibração eletrônica aqui proposta incorpora as vantagens desses dois procedimentos, ou seja, não precisa de cálculos posteriores para fornecer a concentração da amostra e dispensa o uso de uma solução padrão para encontrar diretamente nos displays a concentração da amostra.

Para a análise por calibração eletrônica é necessário o conhecimento, a priori, do valor do parâmetro fator e a posição da chave CG.

### Obtenção do Parâmetro Fator

Após selecionar a radiação analítica emitida pelo LED, esperar a estabilização eletrônica e fazer a zeragem automática, enche-se a cela de detecção com solução padrão e depois pressiona-se e solta-se a chave **CL**. Um valor qualquer, entre 0 e 999, é apresentado nos displays. Utilizando o potenciômetro de leitura **PL** e a chave **CG**, esse sinal é ajustado ao valor da concentração conhecida da solução padrão. Feito este ajuste, faz-se uma nova zeragem automática com o branco. Até este momento, a chave **CF** está fechada. Ao abri-la, será simulado um decréscimo de transmitância. Este decréscimo dará uma determinada leitura nos displays que está associada a uma determinada posição das chaves **CG** e **PL**. O valor desta leitura é denominado de parâmetro fator e seu valor e a posição da chave **CG** devem ser anotados e guardados para posteriores análises usando a calibração eletrônica.

Para cada solução padrão utilizada em uma determinada análise clínica, tem-se um parâmetro fator diferente. Uma vez conhecido o valor do parâmetro fator e a posição da chave **CG** para este parâmetro fator, o aparelho pode ser desligado. Ao se iniciar uma nova análise, a calibração eletrônica pode ser realizada sem utilizar uma solução padrão.

Como pode ser verificado em uma análise do circuito eletrônico, um aumento no ganho do sinal analítico, diminui o valor do parâmetro fator e vice versa. Portanto, é importante que a seleção da posição da chave CG seja aquela que permita um bom ganho de sinal analítico com um preciso valor do parâmetro fator.

### Calibração Eletrônica

Após selecionar a radiação analítica emitida pelo LED bicolor, a calibração eletrônica é feita zerando-se, inicialmente, o fotocolorímetro com o branco no caminho ótico, a chave **CF** fechada e a chave **CG** na posição usada na determinação do parâmetro fator. Após abrir a chave **CF**, faz-se aparecer nos displays, utilizando o potenciômetro de leitura **PL**, o valor conhecido, a priori, do parâmetro fator. Fecha-se, então, a chave fator e está feita a calibração eletrônica. A partir daí, quando a amostra é colocada no caminho ótico, o valor da concentração do analito aparecerá diretamente nos displays.

Verifica-se, então, que as análises por calibração eletrônica com fotômetro de fluxo dispensam a necessidade de utilização freqüente de soluções padrão e de cálculos posteriores. Entretanto, o uso de reagentes deteriorados, procedimento analítico não adequado ou danos em componentes do fotômetro de fluxo podem produzir erros durante a análise por calibração eletrônica.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Avaliação da Faixa Linear do Sinal x Concentração do Fotômetro de Fluxo

Para avaliar a faixa linear do sinal x concentração para o fotocolorímetro de fluxo foram construídas curvas de calibração usando soluções padrão de  $\text{KMnO}_4$  (na faixa de 1,0 a 30,0 mMolar) e de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (na faixa 20 a 300 mMolar). O  $\text{KMnO}_4$  foi escolhido de modo a se fazer medidas usando a emissão verde do LED bicolor, pois essa espécie absorve mais

fortemente nesta região do visível. O  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  foi escolhido de modo a se fazer medidas usando a emissão vermelha do LED bicolor, pois é nessa região que esta espécie absorve mais fortemente.

Para fins de comparação, foram também construídas curvas de calibração usando um fotocolorímetro clássico (Procyon C-27) e as mesmas soluções de  $\text{KMnO}_4$  e de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Verificou-se nas curvas de calibração que a faixa linear para o fotômetro de fluxo é semelhante ao fotocolorímetro clássico. Ambos os instrumentos começam a apresentar desvios de linearidade a partir dos mesmos valores de concentração, ou seja, 15mM para o  $\text{KMnO}_4$  e 120mM para o  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Os coeficientes de correlação para região linear (0,0 a 15mM para o  $\text{KMnO}_4$  e 0,0 a 120mM para  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) foram de 0,9998 e 0,9991 para as medidas no fotômetro clássico e de 0,9995 e 0,9998 para as medidas no fotômetro de fluxo.

### Sinal Medido pelo Fotômetro de Fluxo versus a Concentração

O sinal, **S**, apresentado nos displays do fotocolorímetro de fluxo, como pode ser verificado no circuito eletrônico global, é sempre a diferença ( $\mathbf{S} = \mathbf{I}_0 - \mathbf{I}$ ) entre o sinal transmitido pelo branco (sinal  $\mathbf{I}_0$  da zeragem automática) e o sinal transmitido pela solução absorvente (sinal **I**), quando estas soluções são colocadas no caminho ótico.

Segundo a lei de Beer, a razão entre o sinal do branco ( $\mathbf{I}_0$ ) e o sinal da solução absorvente (**I**), considerando que o detector produz uma resposta linear com a intensidade da luz incidente ( $\mathbf{R} = \mathbf{kI}$ ), tem uma função exponencial com a concentração, e a absorbância (-log dessa razão) é que varia linearmente com a concentração. Entretanto, levando em consideração que o fotocolorímetro de fluxo utiliza uma cubeta cilíndrica (um tubo) com diâmetro de cerca de 2,0mm (caminho ótico "médio" é muito menor) e que ele é sempre operado com sinais em alta transmitância (**I** muito próximo de  $\mathbf{I}_0$ ), pode-se verificar, a partir do tratamento a seguir, que nestas condições, tem-se um comportamento aproximadamente linear entre a diferença dos sinais (**S**) e a concentração da solução absorvente (**C**).

Podemos escrever a partir da lei de Beer que:

$$A = -\log I/I_0 = \epsilon bC \quad (1)$$

ou seja,

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon bC} \quad (2)$$

onde,  $\epsilon$  e **b** são, respectivamente, a absorvidade molar e o caminho ótico. A diferença entre o sinal do branco ( $\mathbf{I}_0$ ) e o sinal da solução absorvente ( $\mathbf{I} = \mathbf{I}_0 \cdot 10^{-\epsilon bC}$ ) é dado por:

$$S = I_0 - I = I_0 - I_0 \cdot 10^{-\epsilon bC}$$

que dá:

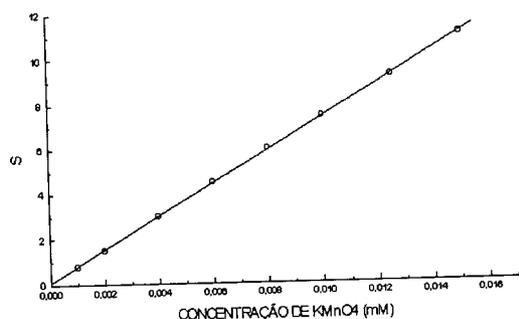
$$S = I_0 (1 - 10^{-\epsilon bC}) \quad (3)$$

Se, por exemplo, a nossa espécie absorvente é o  $\text{KMnO}_4$ , o produto  $\epsilon b$  "médio" (cubeta cilíndrica de cerca de 2mm) para o fotocolorímetro de fluxo, estimado por uma aproximação grosseira a partir das medidas realizadas com o fotocolorímetro convencional Procyon, é de cerca de  $3,3 \text{ l.cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Com base nesse valor de  $\epsilon b$  e considerando que  $\mathbf{I}_0$  é constante e pode assumir um valor qualquer (1 ou 100, por exemplo), podemos construir, a partir da equação (3), a tabela 2 para a faixa de concentração de  $\text{KMnO}_4$  (0,0 a 15mM) em que o fotocolorímetro de fluxo apresentou, experimentalmente, um comportamento linear. A curva de S x Concentração para os dados da tabela 2 é mostrado na figura 3.

O coeficiente de correlação para curva S x Concentração foi de 0,9999, enquanto que o coeficiente de correlação obtido a

**Tabela 2.** Valores de S obtidos a partir da equação (3) para diferentes concentrações de  $\text{KMnO}_4$ , considerando o produto  $eb$  igual  $3,3\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$

$C(\times 10^{-3}\text{M})$	$ebc(\times 10^{-3})$	S
1,0	3,3	0,76
2,0	6,6	1,5
4,0	13	3,0
6,0	20	4,5
8,0	27	6,0
10,0	33	7,4
12,5	42	9,2
15,0	50	11



**Figura 3.** Curva teórica  $S \times$  concentração para  $\text{KMnO}_4$ .

partir das medidas experimentais no fotolorímetro de fluxo, para esta mesma faixa de concentração de  $\text{KMnO}_4$ , foi de 0,9995. Portanto, para valores de  $I$  muito próximos de  $I_0$ , tem-se que  $S$  (o sinal medido pelo fotolorímetro de fluxo) apresenta uma relação aproximadamente linear com a concentração da espécie absorvente. Devido este comportamento não foi usado um circuito logarítmico para obter o sinal em absorbância, como é feito normalmente nos fotolorímetros comerciais.

Vale salientar que a lei de Beer só é rigorosamente linear para radiações monocromáticas. Como nos fotolorímetros clássicos as radiações analíticas não são monocromáticas (largura da banda passante de  $\pm 10$  a  $\pm 30\text{nm}$ ), não se obtém, normalmente, uma relação rigorosamente linear da absorbância com a concentração da espécie absorvente.

### Análises Clínicas Usando o Fotômetro de Fluxo e o Fotômetro Clássico

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do fotômetro de fluxo nos laboratórios de análises clínicas, foram feitas as seguintes determinações usualmente realizadas em rotina: proteínas totais, albumina, uréia, hemoglobina, ácido úrico e glicose em amostras de soro, plasma e sangue total. As mesmas amostras foram também analisadas usando o fotômetro clássico e os resultados obtidos em ambas determinações são apresentados na tabela 3.

Verifica-se que os valores obtidos nas análises com o instrumento desenvolvido estão em boa concordância com os valores obtidos nas análises usando o instrumento clássico. As estimativas dos desvios padrões relativos conjunta em cada grupo de amostras foram sempre melhores para as análises realizadas usando o fotolorímetro desenvolvido. Essa melhor precisão pode ser explicada pelo fato de que nas análises com o fotolorímetro clássico existe um significativa fonte de imprecisão, relacionada com a retirada e a colocação da cubeta no caminho ótico, durante as medidas. Esta fonte de imprecisão é evitada no fotômetro desenvolvido, uma vez que a cela de fluxo é mantida fixa e a troca de soluções é realizada simplesmente pelo bombeamento descontínuo durante o enchimento da cela de fluxo.

### Análises Clínicas Usando o Fotômetro de Fluxo com Calibração Eletrônica

Foram feitas análises de proteínas e albumina em soro sanguíneo, usando calibração com a solução padrão e a calibração eletrônica. A calibração eletrônica foi realizada após o fotolorímetro de fluxo ter sido desligado e os botões de controle (PL e CG) terem sido alterados. Os resultados obtidos com os dois procedimentos são mostrados na tabela 4. Verifica-se que os valores obtidos são bastantes concordantes e que a precisão é praticamente idêntica, o que vem comprovar a validade da utilização da calibração eletrônica.

### CONCLUSÕES

O fotômetro de fluxo é de simples construção e todos os componentes usados na sua montagem podem ser encontrados facilmente no mercado nacional. A simplicidade do sistema ótico, da cela de detecção e do circuito eletrônico permite que ele possa ser produzido a um custo muito mais barato do que os fotolorímetros clássicos. Características como a utilização da zeragem automática, do circuito retentor de pico e da calibração eletrônica, entre outras, não têm sido encontradas nos fotômetros desenvolvidos até aqui.

O instrumento desenvolvido permite que as análises sejam realizadas com um menor consumo de reagentes e amostras do que as análises fotométricas realizadas com instrumentos e procedimentos clássicos. Isto ocorre porque para encher a cela de fluxo necessita-se de apenas 0,1ml, enquanto uma cubeta clássica normalmente necessita de cerca de 2,5 a 5,0ml. Esta característica e junto com a utilização da calibração eletrônica, que dispensa o uso freqüente de soluções padrão, permite baratear significativamente o custo das análises.

O sistema (interruptor e a sucção por trompa de vácuo) de enchimento da cela de detecção é de baixo custo, principalmente, quando comparada com os sistemas em fluxo que utilizam bomba peristáltica.

O fotolorímetro de fluxo pode ser aplicado a maioria das análises clínicas fotométricas, uma vez que a maioria destas análises podem ser realizadas usando-se, ou a emissão verde ou a emissão vermelha do LED bicolor.

O fotômetro de fluxo pode ser também utilizado em sistemas de análise em fluxo (FIA e CFA) e projetos de pesquisa usando estas técnicas vêm sendo realizados em nosso laboratório. Uma outra característica do fotômetro de fluxo é que ele não necessita da utilização de registradores potenciométricos que são usualmente necessários aos sistemas de análise em fluxo. Além do mais, ele pode ser facilmente interfaceável a um microcomputador e projeto neste sentido vem também sendo conduzido em nosso laboratório.

Em todas as análises realizadas com o fotômetro de fluxo, os valores obtidos foram sempre concordantes com os valores encontrados usando um fotolorímetro clássico. Por não ser necessária a retirada e colocação de cubetas no caminho ótico durante as medidas, uma vez que a cela de detecção é mantida fixa e é enchida pelo bombeamento descontínuo das soluções medidas, as análises com o fotômetro de fluxo produzem uma maior velocidade analítica, uma menor acesso às contaminações e uma melhor precisão (desvio padrão relativo conjunto de 1,2% contra 2,1% para as análises com fotômetro clássico).

### APÊNDICE

São listados, a seguir, os valores dos componentes eletrônicos discretos utilizados na construção do fotolorímetro de fluxo.

*Trim pots:* **TP1**-trimpot multivolta de 500k $\Omega$ ; **TP2**-trimpot multivolta de 22k $\Omega$ , **TP3**-trimpot multivolta 50k $\Omega$  e **TP4**-trimpot multivolta 10k $\Omega$ .

**Tabela 3.** Resultados das análises de proteínas totais, albumina, uréia, hemoglobina, ácido úrico e glicose em amostras de soro, plasma e sangue total, utilizando o fotômetro de fluxo e o clássico, com uma calibração convencional.

Determinações	Amostras	Resultados Obtidos*	
		Fotômetro Clássico	Fotômetro de Fluxo
PROTEÍNAS	A1	6,8 (± 0,7)	6,9 (± 1,2)
TOTAIS(g/dl)	A2	7,2 (± 0,6)	7,4 (± 0,7)
	A3	6,8 (± 0,7)	7,2 (± 0,7)
	A4	8,0 (± 1,4)	8,2 (± 0,7)
	A5	7,0 (± 0,8)	7,3 (± 0,7)
ALBUMINA	A1	4,8 (± 2,2)	4,9 (± 0,8)
(g/dl)	A2	6,9 (± 1,5)	7,0 (± 2,4)
	A3	6,2 (± 3,2)	6,3 (± 1,4)
	A4	6,2 (± 2,4)	6,4 (± 1,2)
	A5	5,5 (± 3,6)	5,6 (± 1,3)
URÉIA	A1	28 (± 3,1)	31 (± 1,8)
(mg/dl)	A2	25 (± 1,8)	25 (± 1,8)
	A3	30 (± 2,8)	32 (± 1,1)
	A4	29 (± 1,9)	30 (± 2,3)
	A5	17 (± 4,1)	17 (± 2,6)
HEMOGLOBINA	A1	11 (± 0,9)	11 (± 0,7)
(g/dl)	A2	16 (± 1,1)	17 (± 1,2)
	A3	15 (± 0,7)	15 (± 1,9)
	A4	13 (± 1,7)	15 (± 0,3)
	A5	16 (± 0,9)	17 (± 0,6)
ÁCIDO	A1	4,5 (± 3,8)	4,9 (± 1,0)
ÚRICO((mg/dl)	A2	3,0 (± 1,7)	3,4 (± 1,5)
	A3	1,7 (± 4,7)	1,7 (± 4,7)
	A4	4,6 (± 4,8)	3,8 (± 3,9)
	A5	4,5 (± 1,3)	4,3 (± 1,4)
GLICOSE	A1	93 (± 0,6)	95 (± 0,0)
(mg/dl)	A2	93 (± 0,5)	95 (± 0,5)
	A3	90 (± 3,9)	90 (± 0,0)
	A4	140 (± 1,2)	140 (± 0,4)
	A5	110 (± 0,6)	110 (± 0,5)
COLESTEROL	A1	220 (± 3,7)	220 (± 0,2)
(mg/dl)	A2	250 (± 2,3)	250 (± 1,9)
	A3	240 (± 2,0)	240 (± 1,1)
	A4	250 (± 3,3)	290 (± 1,3)
	A5	210 (± 4,1)	230 (± 0,1)
DPRC*		± 2,1	± 1,2

\*Valores entre parênteses são as estimativas do desvios padrão relativo percentual (DPR) para 5 repetições e DPRC são as DPR conjunta para todas as análises.

*Potenciômetros:* **PG** e **PL**-potenciômetros lineares de 4,7kΩ (**PB**) e 15kΩ(**PL**).

*Chaves:* **CF**, **CR**, **CV**, **CLD** e **CRR**-chaves deslizantes, tipo H, 2 pólos 2 posições; **CD**-idem chaves anteriores com 3 posições; **CL** e **CZ**-chaves do tipo "push botton" com 1 polo normalmente fechado(**CL**) ou normalmente aberto(**CZ**); e **CG**-chave rotativa de 4 posições e 2 seqões.

*LEDs:* **LM**-LED monocolor verde da SIEMENS com 3,2mm de diâmetro; **LB**-LED bicolor vermelho/verde com diâmetro de 5mm.

*Fototransistor:* **FT**- fototransistor do tipo FPT500, com lente.

*Displays:* displays de 7 segmentos com 12,5mm, da Icotron-111.

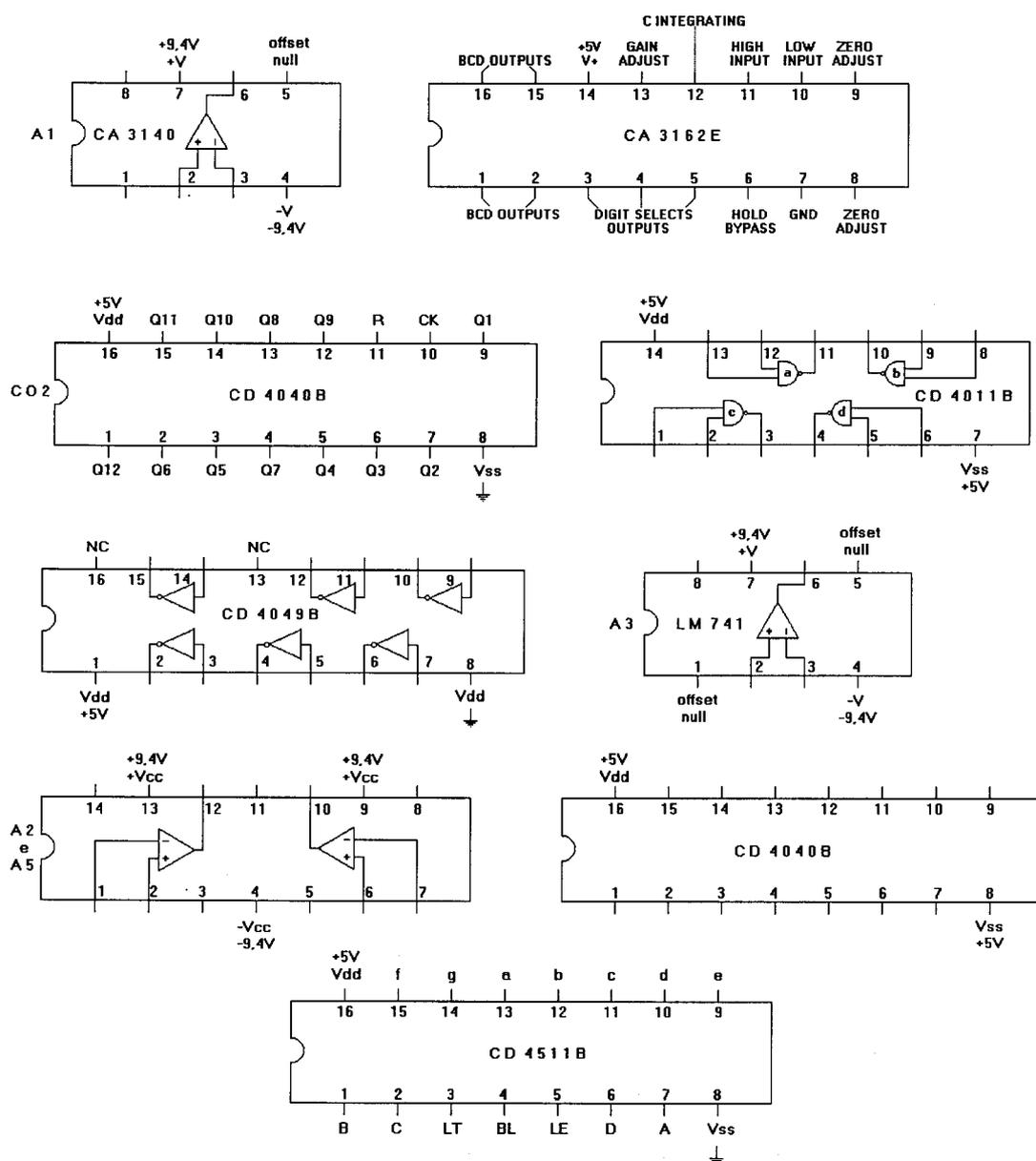
*Transistores:* **T1**, **T2**, **T3**, **T4**-transistor de silício, tipo BC548B, **T5**, **T6**, **T7** e **T9**-transistores de silício, tipo BC328B e **T8**-transistor de silício, tipo BC338B.

*Transformadores:* **TR1**-transformador de força primário (110/220V) e secundário (12+12V, 300 mA) e **TR2**-transformador de força primário (110/220) e secundário (9+9 V, 500 mA).

**Tabela 4.** Resultados das análises de proteínas totais em amostras de soro com o fotômetro de fluxo, usando calibração convencional e a calibração eletrônica.

Determinações	Amostras	Resultados Obtidos*	
		Calib. Clássica	Calib. Eletrônica
PROTEÍNAS	A1	7,1 (± 0,0)	7,0 (± 0,5)
TOTAIS	A2	7,6 (± 0,5)	7,5 (± 0,5)
(g/dl)	A3	6,8 (± 0,0)	6,9 (± 0,5)
	A4	5,7 (± 0,6)	5,8 (± 0,5)
ALBUMINA	A1	5,3 (± 0,5)	5,2 (± 0,5)
(g/dl)	A2	7,3 (± 0,1)	7,2 (± 0,5)
	A3	4,9 (± 0,9)	4,9 (± 0,9)
	A4	5,7 (± 0,5)	5,7 (± 0,9)
DPRC*		± 0,4	± 0,6

\*Valores entre parênteses são as estimativas do desvios padrão relativo percentual (DPR) para 5 repetições e DPRC são as DPR conjunta para todas as análises.



**Figura 4.** Pinagem dos circuitos integrados do fotômetro de fluxo.

**Resistores:** resistores de carbono (0,25W e  $\pm 5\%$ ) de 560 $\Omega$ (**R1**, **R116** a **R123**), de 680 $\Omega$ (**R124** e **R125**), de 5K $\Omega$ (**R106**), de 10K $\Omega$ (**R59**, **R110** a **R112**), de 15K $\Omega$ (**R105**), de 47K $\Omega$ (**R55**, **R58**, **R98**, **R113** a **R115**), de 100K $\Omega$ (**R56** e **R97**), de 516K $\Omega$ (**R57**), de 10M $\Omega$ (**R101**), de 15M $\Omega$  (**R102**) e resistores de metal-filme (0,25W e  $\pm 1\%$ ) de 560 $\Omega$ (**R2** a **R4**), de 470 $\Omega$ (**R5**), de 1K $\Omega$ (**R6**), de 2,2K $\Omega$ (**R7**), de 4,7K $\Omega$ (**R8** e **R14**), de 6,8K $\Omega$ (**R9**) de 10K $\Omega$ (**R103** e **R109**), de 15K $\Omega$ (**R15**), de 20K $\Omega$ (**R12**), de 27K $\Omega$ (**R16**), de 47K $\Omega$ (**R19** a **R54**, **R104**, **R60** a **R96** e **R99**, **R100**), de 55,6K $\Omega$ (**R17**), de 100 K $\Omega$ (**R107** e **R108**), de 118K $\Omega$ (**R18**), de 180K $\Omega$ (**R13**), de 330K $\Omega$ (**R10**) e de 500K $\Omega$ (**R11**).

**Capacitores:** capacitores de poliéster metalizado de 0,01 $\mu$ F x 100V(**C4**), de 0,015 $\mu$ F x 100V(**C3**), de 0,047 $\mu$ F x 100V(**C2** e **C5**), de 0,1 $\mu$ F x 100V(**C1** e **C7**, **C9** e **C10**). De 0,22 $\mu$ F x 100V(**C6**), de 0,33 $\mu$ F x 100V(**C8**); capacitores eletrolíticos de 100 $\mu$ F x 16V(**C13** e **C14**), de 1000 $\mu$ F x 16V(**C17** e **C19**) e de 1000 $\mu$ F x 25V(**C11**, **C12**) e capacitores de disco de cerâmica de 0,1 $\mu$ F x 50V(**C15**, **C16**, **C18**, **C20**, **C21**).

**Diodos:** diodos de Silício IN4148(**D1** a **D3** e **D10**); diodos de silício IN4001(**D4** a **D9**) e diodos Zenner 10V, 0,4W(**DZ1** e **DZ2**).

A pinagem dos circuitos integrados utilizados na construção do fotocolorímetro de fluxo são apresentados na figura 4.

## REFERÊNCIAS

1. Flaschka, H.; Mckeithan, C. e Barnes, R. M.; *Anal. Lett.* **1973**, *6*, 585.
2. Anfalt, T.; Granéli, A. e Strandberg, M.; *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 357.
3. Betteridge, D.; Daugless, E. L.; Fields, B. e Graves, N. F.; *Analyst* **1978**, *103*, 897.
4. Betteridge, D.; *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 832A.
5. Betteridge, D.; *Z. Anal. Chem.* **1982**, *312*, 441.
6. Sly, T. J.; Betteridge, D.; Wibberley, D. e Porter, D. J.; *J. Autom. Chem.* **1982**, *4*, 186.
7. Betteridge, D.; Cheng, W. C.; Daugless, E. L.; David, P.; Goad, T. B.; Deans, D. R.; Newtor, D. A. e Pierce, T. B.; *Analyst* **1983**, *108*, 1.
8. Hookey, D. J. e Dessy, R. E.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 313.
9. Johnson, K. S. e Petty, R. L.; *Limnol. Oceanogr.* **1983**, *28*, 1266.
10. Imasaka, T.; Kamikubo, T.; Kamabata, Y. e Ishibashi, N.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, *153*, 261.
11. Trojanowicz, M.; Augustyniak, W. e Hulanicki, A.; *Mikrochim. Acta* **1984**, *II*, 17.
12. Schmidt, G. J. e Scott, R. P. W.; *ibid* **1984**, *109*, 997.
13. Pasquini, C. e Raimundo, I. M.; *Quím. Nova* **1984**, *7*, 24.
14. Johnson, K. S.; Beehler, C. L. e Sakamoto Arnold, C. M.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *179*, 245.
15. Wolfbeis, O. S.; Schaffar, B. P. H. e Kaschnitz, E.; *Analyst* **1986**, *111*, 1331.
16. Sweileh, J. A. e Dasgupta, P. K.; *Mikrochim. Acta* **1986**, *III*, 175.
17. Mitsubishi Electric Corp.; *Optical Semiconductors*; Torrance, CA, 1986.
18. Worsfold, P. J.; Clinch, J. R. e Casey, H.; *ibid.* **1987**, *197*, 43.
19. Clinch, J. R.; Worsfold, P. R. e Casey, H.; *ibid.* **1987**, *200*, 523.
20. Clinch, J. R.; Worsfold, P. J. e Sweeting, F. W.; *ibid.* **1988**, *214*, 401.
21. Trojanowicz, M.; Worsfold, P. J. e Clinch, J. R.; *Trends Anal. Chem.* **1988**, *7*, 301.
22. Smith, B. W.; Jones, B. T. e Winefordner, J. D.; *Appl. Spectros.* **1988**, *42*, 469.
23. Sweileh, J. A. e Dasgupta, P. K.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *214*, 107.
24. Casey, H.; Carke, R. T.; Smith, S. M.; Clinch, J. R. e Worsfold, P. J.; *ibid.* **1989**, *227*, 329.
25. Petersen, K. e Dasgupta, P. K.; *Talanta* **1989**, *36*, 49.
26. Benson, R. L.; Worsfold, P. J. e Sweeting, F. W.; *ibid.* **1990**, *238*, 177.
27. Trojanowicz, M. e Szpunar-Lobinska, J.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *230*, 125.
28. Sonne, K. e Dasgupta, P. K.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 427.
29. Dong, S. e Dasgupta, P. K.; *Talanta* **1991**, *38*, 133.
30. Vecera, Z. e Dasgupta, P. K.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2210.
31. Dasgupta, P. K.; Bellamy, H. S.; Liu, H.; Lopez, J. L.; Loree, E.L.; Morris, K.; Petersen, K. e Mir, K. A.; *Talanta* **1993**, *40*, 53.
32. BIOCLIN-Reagentes para Laboratórios de Análises Clínicas, Quimbasa-Química Básica LTDA, R. Teles de Menezes, 92, Belo Horizonte - Brasil.
33. Henry, J. R., *Clin. Chem.*; HHH, Editora; Londres, 1966.
34. Moura, R. A.; *Técnicas de Laboratório*; Livraria Atheneu, Editora; 3ª Edição, São Paulo-Rio de Janeiro, 1992.
35. Araújo, M. C. U.; Honorato, R. S., Santos, A. V. e Silva, E. C.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 86.