

ESTIMATIVA DA INCERTEZA ASSOCIADA À DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE As, Cd, Hg, Pb EM AMOSTRAS DE URINA USANDO HRICP-MS

João Cristiano Ulrich, Jorge Eduardo de Souza Sarkis,
Maurício Hiromitu Kakazu e Renata Medeiros Lobo do Nascimento

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN
Centro de Química e Meio Ambiente - CQMA
Laboratório de Caracterização Química – LCQ
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – São Paulo, Brasil
jculrich@ipen.br

INTRODUÇÃO

Análises elementares de fluídos corporais têm sido consideradas e utilizadas como uma importante parte do monitoramento biológico de estudos ambientais e de saúde ocupacional além de diagnósticos de uma ampla faixa de distúrbios^{1,2,3}. O biomonitoramento de elementos tóxicos ou carcinogênicos é importante como um indicador para uma pessoa que foi exposta a uma poluição individual ou ambiental.

Muitos elementos tem sido descritos como tóxicos ou carcinogênicos, entre eles o arsênio (As), Cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb).

O elemento arsênio (As) tem um mecanismo de carcinogenicidade suposto que na verdade ele age como um co-carcinogênico, ou um promotor de tumores, em vez de um iniciador direto. Estudos provaram o As é um genotóxico indireto, ou seja, não causa mutação genética, mas pode afetar a expressão de genes que controlam proliferação e diferenciação celular⁴. Exposição crônica a As inorgânico pode estar relacionada à ingestão de alimentos contaminados de forma inadvertida ou propositadamente, ingestão de água contaminada por ação geológica natural ou por ação industrial próxima. Segundo Sakuma et al⁴, o As inorgânico na urina pode ser mais bem relacionado com a maioria dos efeitos críticos (câncer) do que os outros indicadores do elemento.

A toxicidade do cádmio (Cd) se expressa em vários órgãos e tecidos, entretanto, os órgãos alvo são os rins e o fígado. Órgãos como testículos, pâncreas, tireóide, glândulas adrenais, ossos, sistema nervoso central e pulmões foram estudados quanto aos efeitos tóxicos deste elemento⁵. Nas situações de exposição crônica, a toxicidade se expressa nos rins em nível de túbulo proximal provocando dano celular com proteinúria (principalmente proteínas de baixos pesos moleculares). A toxicidade aguda pode ocorrer através da ingestão de concentração relativamente alta de Cd contidas em bebidas ou alimentos. Os alimentos e as bebidas podem ser contaminados por utensílios como potes e panelas contendo esmaltes ou soldas que apresentam cádmio. As exposições ocupacionais podem ocorrer em fundição e refino de zinco, chumbo e cobre, eletrodeposição, manufaturas de ligas de cádmio, pigmentos e estabilizadores de plásticos (principalmente na fabricação de PVC), produção de baterias níquel-cádmio e solda metálica que contenha cádmio. O aumento do Cd na urina apenas ocorre após a saturação dos sítios ligantes do metal, principalmente a metalotioneína, que é a proteína transportadora de metais pelo organismo. A maior parte do Cd na urina está ligada à metalotioneína, razão pela qual a medição de metalotioneína é também considerada um indicador de exposição.

Para o elemento mercúrio (Hg) há várias formas de riscos de exposição ambiental, tais como, ar, água, solo, efluentes e esgoto⁶. Existem também os riscos de exposição ocupacional e através de alimentos. O transporte de Hg iônico é realizado pelo plasma enquanto o Hg elementar é transportado pelas hemácias. Os principais locais de deposição são os rins e o cérebro. A oxidação de Hg⁰ para Hg²⁺ no cérebro permite que este elemento ali se armazene. É importante mencionar que a exposição aos mercuriais estimula a síntese da metalotioneína. Os sais mercúricos são corrosivos. O seu contato,

particularmente com membranas mucosas, produz efeito inflamatório, vesicular e necrótico. Exposições a altas concentrações de vapores de Hg elementar podem produzir sintomas em poucas horas, como debilidade, calafrios, gosto metálico, náuseas, vômitos, diarreia, diápnéia, tosse e sinais de opressão do tórax. Os melhores biomarcadores de exposição ao metal são o sangue, cabelo e urina.

O chumbo (Pb) é um elemento de ocorrência natural e seu teor no solo é muito influenciado por atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias fontes. Tanto a deposição seca quanto a úmida são importantes vias de contaminação. As principais fontes de contaminação e exposição humana são o ar, solo e água. As exposições ocupacionais ao Pb que resultam em intoxicação, com sintomatologia moderada ou pronunciada, pode ocorrer por transporte de poeira de chumbo no local de trabalho em fundições e refinarias de Pb. A contaminação de bebidas alcoólicas por Pb pode ocorrer através do uso de solda de chumbo em barris ou pela presença de praguicidas, como por exemplo, o arsenato de chumbo, usado na cultura da uva. Os alimentos podem ser contaminados através da migração dos recipientes que o contém para os alimentos nele contidos. O chumbo absorvido por qualquer via entra na circulação sanguínea e é distribuído para vários órgãos e tecidos. O metal não é distribuído de forma homogênea no organismo e três compartimentos distintos foram identificados (sangue, ossos e tecidos moles (fígado, rins)). Segundo Paoliello e De Capitani⁷, vários efeitos tem sido estudados em relação aos níveis de Pb no organismo, efeitos cardiovasculares, gastrintestinais, hematológicos, renais, endócrinos, neurológicos, imunológicos e reprodutivos são alguns deles. O Pb é eliminado do organismo através da urina e das fezes (excreção biliar).

Dessa forma, a determinação precisa, com resultados confiáveis, desses elementos em amostras biológicas constitui-se em um importante aspecto da química clínica para o diagnóstico de doenças, intoxicações e avaliações de exposição ambiental e ocupacional.

Após o estudo e desenvolvimento da metodologia, há necessidade desta ser validada com o objetivo de se comprovar de que os requisitos para a aplicação e uso pretendido foram atendidos. Um dos critérios empregados na validação de métodos é a incerteza de medição.

O resultado de uma medição é apenas uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. Sendo assim, a representação completa desse mensurando deverá incluir a incerteza de medição.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o “Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia”⁸ é “parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando”.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

Com o objetivo de identificar e analisar as possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas avaliadas, os procedimentos adotados, para cada etapa, devem ser detalhados e estruturados de forma a garantir a abrangência necessária para entendimento e conhecimento do processo de medição e evitar a duplicidade de fontes de incerteza. Normalmente, este objetivo é atingido utilizando-se o diagrama de causa-e-efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe. O uso do diagrama facilita a resolução de problemas, associando os sintomas e suas causas, até a solução. O uso deste diagrama é extensamente descrito no guia Eurachem⁹.

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma induzido (HRICP-MS) se firmou como uma técnica confiável na química clínica devido aos baixos limites de detecção, uma ampla faixa de determinação e a rápida capacidade multielementar. Em comparação com um instrumento quadrupolo (ICP-MS) as interferências podem ser eliminadas devido a alta

capacidade de resolução de massa. A análise de urina por HRICP-MS tem sido reportada por vários autores^{1,2,3,10,11}.

Neste trabalho é apresentada uma metodologia para determinação dos metais As, Cd, Hg e Pb em amostras de urina, empregando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HRICP-MS) com posterior cálculo da incerteza associada ao processo de medição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Instrumentação

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de plasma induzido da marca Finnigan MAT, Element (Bremen, Germany). Esse instrumento apresenta um sistema analisador de dupla focalização de íons, com geometria reversa (Nier-Johnson): um analisador magnético seguido de um analisador eletrostático. Esse tipo de instrumento pode operar em três modos nominais de resolução: 300, 3000 e 7500.

Reagentes e soluções padrão

Para a diluição das amostras, preparação das soluções branco e da curva analítica, ácido nítrico (HNO₃) grau analítico (Merck, Darmstadt, Germany) foi utilizado após purificação adicional por destilação sub-boiling em destilador de quartzo.

Para a preparação da solução de ácido nítrico, água Milli-Q (Millipore Milli-Q, Bedford, USA) com resistividade de 18,2 MΩ. foi utilizada.

Soluções padrão Spex ®, dos elementos a serem determinados, foram utilizadas para preparação das soluções da curva analítica.

Preparação da amostra

Uma alíquota de 0,5 g de cada amostra recebida do DOH (Department of Health – State of New York) foi transferida para tubos de poliestireno graduados e o volume final de 10 g foi obtido adicionando-se solução de ácido nítrico (HNO₃) a 2%, obtendo-se uma proporção final de 1:20. Solução do elemento índio (In) foi utilizada como padrão interno nas determinações.

Análise das amostras

As amostras foram analisadas no equipamento utilizando-se sistema de introdução de amostras composto por bomba peristáltica com fluxo controlado.

O cálculo das concentrações foi realizado através da interpolação dos dados obtidos da curva analítica (sinal de resposta versus concentração).

ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

A partir de estudos detalhados dos procedimentos realizados, as fontes de incerteza que contribuem na metodologia são: a concentração da solução diluída do padrão estoque, C_{dil} , que por sua vez produziu as soluções de calibração, a concentração do elemento na alíquota analisada, $C_{aliquota}$, a precisão do método que foi obtida por comparação dos desvios padrão relativos em solução padrão analisada, o fator de diluição da amostra, a massa da amostra obtida por pesagem e a recuperação do método.

Uma solução estoque com 1000 µg g⁻¹ foi diluída na base massa-massa. A incerteza da solução diluída é calculada por¹²:

$$u(C_{dil}) = C_{dil} \times \sqrt{\left(\frac{u(C_{estoque})}{C_{estoque}}\right)^2 + \left(\frac{s_1}{m_1}\right)^2 + \left(\frac{s_2}{m_2}\right)^2} \quad (1)$$

Onde: $u(C_{dil})$ = incerteza da solução diluída; C_{dil} = concentração nominal da solução diluída, $C_{estoque}$ = concentração real da solução padrão estoque, $u(C_{estoque})$ = incerteza dada no certificado da solução padrão estoque. Esta é dividida por $\sqrt{3}$ pois a única informação fornecida é que tem 95% de confiança, s_1 e s_2 = desvios padrão obtidos de pesagens sucessivas de uma massa (m_1) e massa (m_2).

A concentração do elemento na alíquota analisada é obtida utilizando-se a equação dada no guia Eurachem⁹:

$$u(C_o) = \frac{S}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(C_o - \bar{c})^2}{A^2 Q_{xx}}} \quad (2)$$

Onde:

S = desvio padrão residual, dado por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (Y_j - L - A c_j)^2}{m - 2}} \quad (3)$$

Sendo Y_j = sinal de resposta do equipamento; L = coeficiente linear da função calibração; A = coeficiente angular da função calibração; c_j = concentração real de cada solução utilizada na curva analítica; m = número total de medições realizadas para a calibração do instrumento;

Obs.: todos os dados de Y_j , L, A, c_j , m são para cada analito analisado.

n = número de medições realizadas para determinar C_o

C_o = concentração elementar estimada do analito nas soluções amostra (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) ou ainda é a $C_{aliquota}$

Q_{xx} = somatório dado por:

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^m (c_i - \bar{c})^2 \quad (4)$$

Onde:

c_i = concentração medida de cada solução utilizada na curva analítica. c_i é obtida através da equação da curva analítica

\bar{c} = valor médio de concentração das soluções padrão utilizadas na calibração

A precisão do método, como dito anteriormente, foi obtida por comparação dos desvios padrão relativos (desvio padrão obtido e dividido pelo valor médio da concentração obtida na análise da solução padrão).

O fator de diluição é dado por:

$$D = \frac{M_f}{M_i} \quad (5)$$

onde:

M_f = massa final

M_i = massa inicial, ou seja, massa de solução de amostra a diluir.

Como a diluição foi feita em base massa, o que deve ser considerado é a balança. Então massas de m_1 g e m_2 g foram checadas na balança dando desvio padrão s_1 e s_2 . Estes valores são usados para estimar a incerteza da precisão da balança. A incerteza associada com o fator de diluição é dada por¹²:

$$u(D) = D \times \sqrt{\left(\frac{s_1}{m_1}\right)^2 + \left(\frac{s_2}{m_2}\right)^2} \quad (6)$$

A massa da amostra foi obtida por pesagem, assim, as fontes de incerteza que devem ser consideradas são aquelas inerentes ao processo de pesagem, ou seja, a contribuição da incerteza informada no certificado de calibração da balança utilizada, os dados históricos existentes no laboratório (gráfico de controle) e a repetitividade da balança.

A incerteza total da massa final é calculada por:

$$u(m_a) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2 + (u_3)^2} \quad (7)$$

A recuperação é calculada por:

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{cert}} \quad (8)$$

E a incerteza da recuperação é dada por¹²:

$$u(R) = R \times \sqrt{\left(\frac{u(C_{dil})}{C_{dil}}\right)^2 + \frac{s_{obs}^2}{n \times C_{obs}^2}} \quad (9)$$

A partir das equações acima, a quantificação de cada fonte de incerteza foi efetuada e assim a incerteza padrão combinada para os elementos foi calculada, em quatro amostras, a partir da equação:

$$u(Conc_{Metal}) = C_{Metal_Am} \times \sqrt{\left(\frac{\mu(C_{dil})}{C_{dil}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{aliquota})}{C_{aliquota}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(precisão)}{precisão}\right)^2 + \left(\frac{\mu(D)}{D}\right)^2 + \left(\frac{\mu(M_{amostra})}{M_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(R)}{R}\right)^2} \quad (10)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor visualização dos valores de incerteza relativa de cada fonte de contribuição, são apresentados nas figuras 1 a 4, esses valores versus fontes de incerteza, para cada elemento determinado, em uma amostra. Nestes gráficos, é possível visualizar qual fonte de incerteza contribuiu na incerteza total da metodologia.

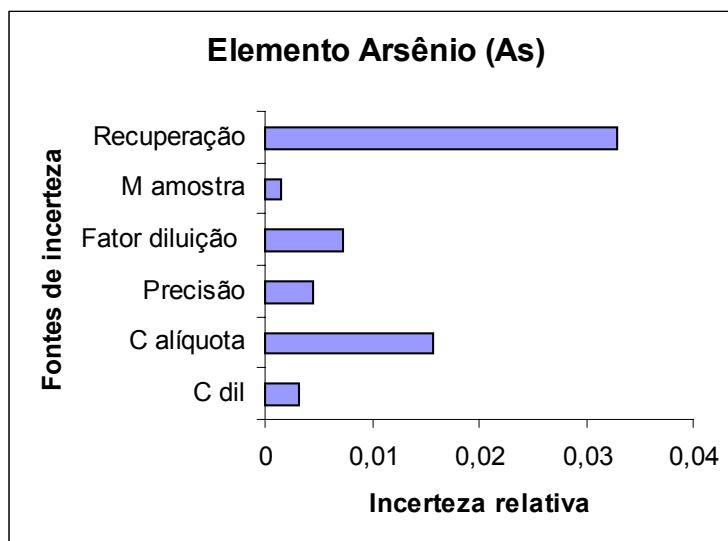


Figura 1. Fontes de incerteza versus incerteza relativa para o elemento Arsênio

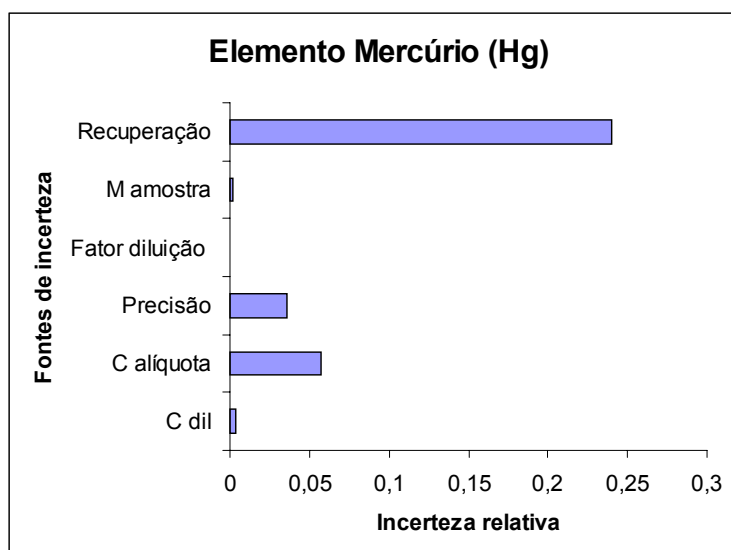


Figura 2. Fontes de incerteza versus incerteza relativa para o elemento mercúrio

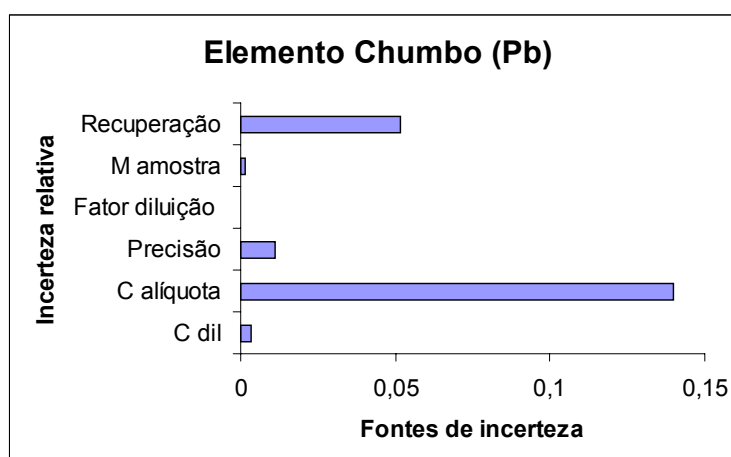


Figura 3. Fontes de incerteza versus incerteza relativa para o elemento Chumbo

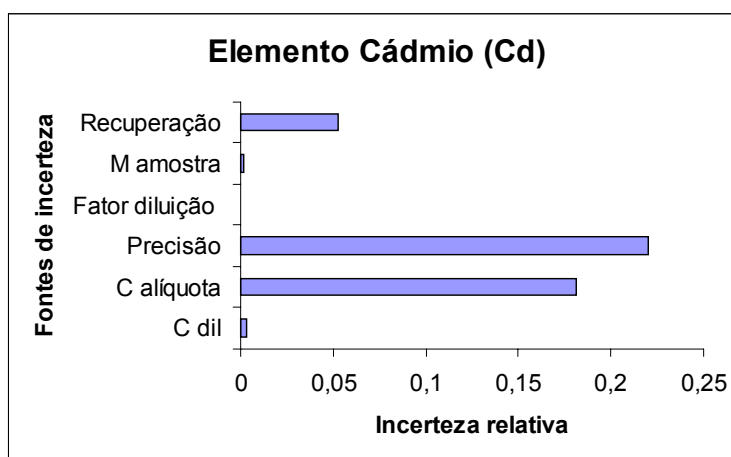


Figura 4. Fontes de incerteza versus incerteza relativa para o elemento Cádmiio

Conforme se verifica pelos gráficos, para os elementos As e Hg (figuras 1 e 2) a maior contribuição na incerteza total foi a incerteza na recuperação, representando 3,2% para As e 24,0% para Hg. A incerteza expandida (global) para estes elementos foram iguais a 7,4% e 50,0%, respectivamente. A incerteza expandida obtida para o elemento As é um valor comparável e/ou melhor do que aqueles encontrados na literatura, e assim, talvez não haja necessidade de proceder qualquer alteração na metodologia de análise deste elemento. Para o Hg, entretanto, verifica-se a necessidade de se estudar e planejar alterações no procedimento com o objetivo de melhorar os valores de recuperação e conseqüentemente os valores da incerteza expandida. Quando estudado com maior atenção, os resultados das concentrações de Hg obtidos para algumas das amostras analisadas no estudo da recuperação, mostraram-se próximos ou iguais ao limite de detecção (LD) para este elemento, o que pode ter provocado a variação nos resultados finais, ou seja, um alto valor para o desvio padrão das medidas. Dessa forma, uma alteração na etapa de preparação das amostras, para obtenção das alíquotas que serão analisadas, pode melhorar o valor da concentração obtida ou mesmo uma alteração no sistema de introdução das amostras para determinação de Hg, utilizando-se talvez de geração de hidretos.

Para o elemento chumbo (Pb), a maior contribuição na incerteza expandida foi a incerteza relativa da concentração na alíquota analisada, conforme se verifica na figura 3. Esta contribuição representou 12,7% para uma incerteza expandida igual a 30%. Como para As, este valor de incerteza expandida é também comparável e/ou melhor do que aqueles encontrados na literatura. Porém, após um minucioso estudo dos resultados das amostras analisadas verificou-se que a incerteza pode ser melhorada ao se alterar as concentrações da curva analítica, uma vez que, alguns valores de concentração estão muito próximos dos dois primeiros pontos da curva e uma das amostras não está dentro da faixa de interpolação da curva analítica, mas muito acima do último valor de concentração presente na curva analítica. Dessa forma, ao se proceder a alteração pretende-se diminuir consideravelmente os valores de incerteza na concentração da alíquota e conseqüentemente os valores de incerteza expandida.

Para o elemento cádmio (Cd), a maior contribuição na incerteza expandida foi a incerteza relativa da precisão das medidas seguida pela incerteza relativa da concentração na alíquota analisada, conforme se verifica na figura 4. Estas contribuições representaram 22,0% para a precisão e 18,2% para a concentração na alíquota analisada em uma incerteza expandida igual a 58%. Constatou-se que a faixa de concentração deste elemento em todas as amostras analisadas é igual a $0,17 - 0,75 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo portanto os menores valores obtidos da concentração da alíquota quando comparados aos outros elementos. Esta faixa de concentração encontrada nas amostras é próxima do limite de detecção para este elemento ($\text{LD} = 0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$). Verificou-se também que quando da análise das soluções para obtenção da curva analítica para a faixa de $0,16 - 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ a repetitividade apresentou valores de 2,7 a 10%. Sendo assim, a repetitividade na curva analítica influenciou significativamente na determinação do elemento nas amostras. Uma alteração pode ser implantada na etapa de preparação das amostras com o

objetivo de melhorar a estatística dos resultados obtidos na análise das alíquotas e assim melhorar a precisão das medidas (repetitividade) e também aumentar a concentração deste elemento.

A incerteza expandida (U) é obtida pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator k. O valor do fator utilizado é geralmente igual a 2, para um nível de confiança de 95%. Como exemplo, é mostrado abaixo o cálculo da incerteza padrão combinada e incerteza expandida para o elemento arsênio (As) em uma das amostras.

$$u(As) = 111,4 \times \sqrt{\left(\frac{0,003759}{1,197}\right)^2 + \left(\frac{0,087323}{5,57}\right)^2 + \left(\frac{0,0247}{5,60}\right)^2 + \left(\frac{0,007256}{20}\right)^2 + \left(\frac{0,0007769}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,03}{0,91}\right)^2}$$

$$u(As) = 111,4 \times 0,0369387 = 4,1149712$$

$$U = 4,1149712 \times 2 = 8,2299424$$

$$\text{Assim, } C_{As} = 111,4 \pm 8,2 \mu\text{g kg}^{-1}$$

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de concentração com incerteza expandida para todos os elementos determinados na mesma amostra.

Tabela 1. Resultados obtidos para os elementos determinados

Elemento	Concentração \pm incerteza expandida ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (k=2, 95% de confiança)
As	111,4 \pm 8,2
Pb	65,0 \pm 19,5
Cd	5,0 \pm 2,9
Hg	24,8 \pm 12,4

CONCLUSÕES

Ao se analisar variados elementos em uma mesma amostra, verifica-se que diferentes fontes de contribuição na incerteza expandida podem estar presentes. Enquanto que, para determinados elementos (como As e Hg) a incerteza relativa na recuperação contribui de forma significativa, para outros (como Cd) a precisão de medida é a fonte responsável da contribuição.

Percebe-se que algumas fontes de contribuição, como fator de diluição e massa de amostra, podem ser consideradas como insignificantes no processo de obtenção da incerteza expandida. Porém, sempre deve haver a consideração dessas fontes e avaliá-las tecnicamente, principalmente se houver mudança dos equipamentos utilizados ou do pessoal envolvido na preparação das amostras.

Apesar de tedioso, o cálculo da incerteza é uma ferramenta importante para se tomar decisões quanto a alterações em metodologias ou mesmo em substituir metodologias de análise. Cada etapa pode ser estudada separadamente e assim identificado onde deve ocorrer alteração e se há necessidade dessa alteração.

Cabe ressaltar que após o desenvolvimento de planilhas de cálculo, estas servem de modelo para qualquer determinação realizada pela mesma metodologia e que, quando o cálculo for alterado fica somente o trabalho de proceder a alteração na parte da planilha necessária, não precisando elaborar nova planilha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Völlkopf, U., Barnes, K. Rapid multielement analysis of urine. *Atomic Spectroscopy*, p. 19-21, january/february 1995.
2. Rodushkin, I., Determination of trace and ultratrace elements in body fluids using sector-field ICP-MS. Thermo Finnigan, Application flash report n^o E11, 2001.
3. Bocca, B., Ammonti, A., Petrucci, F., Violante, N., Sancesano, G., Fone, G., Serotome, O. Quantification of trace elements by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry in urine, serum, blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Spectrochimica Acta part B*, vol. 59, p. 559-566, 2004.
4. Sakuma, A.M., De Capitani, E.M., Tiglea, P. Arsênio. Capítulo 8 em *Metais: gerenciamento da toxicidade* p. 263-298, Editora Atheneu, São Paulo, 2003.
5. Chasin, A.A.M., Cardoso, L.M.N. Cádmio. Capítulo 10 em *Metais: gerenciamento da toxicidade* p. 263-298, Editora Atheneu, São Paulo, 2003.
6. Azevedo, F.A., Nascimento, E.S., Chasin, A.A.M. Mercúrio. Capítulo 11 em *Metais: gerenciamento da toxicidade* p. 263-298, Editora Atheneu, São Paulo, 2003.
7. Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M. Chumbo. Capítulo 12 em *Metais: gerenciamento da toxicidade* p. 263-298, Editora Atheneu, São Paulo, 2003.
8. INMETRO. Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia – VIM. 3^a Edição, Rio de Janeiro, 2003.
9. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Editors: Ellison, S.R.L., Rosslein, M., Williams, A. 2nd. Ed., 2000.
10. Rodushkin, I., Ödman, F. Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine. *J. Trace Elements Med. Biol.* Vol. 14, p. 241-247, 2001.
11. Heitland, P., Köster, H.D. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clinica Chimica Acta*, 365, p. 310-318, 2006.
12. Barwick, V.J., Ellison, S.L.R., Fairman, B. Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology. *Analytica Chimica Acta* 394, p. 281-291, 1999.