

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE ELEMENTAR DE CARNES:  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E ESTRATÉGIAS PARA  
TÉCNICAS COM FONTE DE PLASMA**

**Ana Beatriz Santos da Silva\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA  
ANALÍTICA.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira**

**\* bolsista: CNPq**

São Carlos - SP

2020



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Beatriz Santos da Silva, realizada em 13/10/2020.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (UNESP)

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez (UNESP)

Prof. Dr. Alex Virgilio (CENA/USP)

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedico esse trabalho a minha mãe,  
Magali, com toda a minha gratidão e  
carinho.*

*"Em todas as circunstâncias, dai graças"*

*I Tessalonicenses, 5*

*"Por que se chamavam homens*

*Também se chamavam sonhos*

*E sonhos não envelhecem"*

*Milton Nascimento, Lô Borges e Marcio Borges*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por iluminar todos os meus caminhos e amparar-me nos momentos difíceis;*

*Aos meus pais, pela confiança e incentivo que sempre me impulsionam a seguir em frente;*

*À Dra. Ana Rita, pela orientação, conselhos, amizade, dedicação, respeito e por todo seu exemplo profissional;*

*À banca avaliadora, Prof. Dr. Alex Virgílio, Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, Prof. José Anchieta Gomes Neto e Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez pelas correções e contribuições;*

*Ao Prof. Dr. George Luis Donati por te me recebido para realização do doutorado sanduíche e por toda ajuda durante a minha estadia;*

*Aos co-autores dos trabalhos publicados, Dra. Aline, Dr. Carlos, Msc. Julymar e Dra. Raquel;*

*Aos meus amigos da Embrapa Pecuária Sudeste, Aline, Carlos, Cibeli, Ellen, July, Herick, Ívero, Mayumi, Mykaelli, Raíza e Samia por toda convivência e experiências compartilhadas;*

*A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Análise Instrumental Aplicada (GAIA);*

*À Julymar Higuera por toda amizade, apoio e companheirismo ao longo desses anos;*

*Ao Professor Dr. Joaquim de Araújo Nobrega e Dra. Clarice Amaral, pelas sugestões, críticas e discussões na etapa do seminário;*

*A todos os professores da graduação e pós-graduação que contribuíram com a minha formação acadêmica;*

*Ao Dr. Jake Carter e B.Sc. John Sloop por todo auxílio durante o meu período na Wake Forest University;*

*A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos;*

*Ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos;*

*As secretarias do programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo de doutorado concedida (Processo: 153125/2016-0);*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado sanduíche. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

**Muito obrigada!**

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>8-HQ</b>	8-hidroxiquinolina
<b>DLLME</b>	Microextração luido-luido dispersiva
<b>DV</b>	Volume do solvente dispersor
<b>EC</b>	Calibração externa
<b>EGCM</b>	Módulo de controle de gás externo
<b>ETFE</b>	Etileno tetrafluoroetileno
<b>EV</b>	Volume do solvente extrator
<b>IC</b>	Cromatografia iônica
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
<b>ICP-MS/MS</b>	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com configuração tandem
<b>LOD</b>	Limite de detecção
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação
<b>MEC</b>	Calibração multienergtica
<b>MFC</b>	Calibração multivazões
<b>MIP OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas

<b>ORS</b>	Sistema octopolar de reação
<b>PEEK</b>	Poli(éter-éter-cetona)
<b>PFA</b>	Resina de polímero perfluoroalcóxico
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>R</b>	Coefficiente de correlação
<b>SA</b>	Calibração por adição de analito

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Mapa bibliográfico obtido para as 30 palavras chaves mais utilizadas em buscas envolvendo o MIP OES.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2. Espectro de uma solução aquosa obtida por MIP OES.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3. Representação gráfica da calibração multienergética (multi-energy calibration). .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. Representação gráfica da calibração de multivazões (multi-flow calibration).....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5. Representação da configuração do ICP-MS/MS. (a) modo mass shift e (b) modo on-mass.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 1.1. Cromatograma da fração lipídica obtido após digestão por via seca.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 1.2. Gráfico de estabilidade (60 min) para o sinal do fósforo sem correção e corrigido pelo Te e Co .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 1.3. Curva de calibração obtida utilizando a correção de sinal com a espécie molecular.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 1.4. Efeito do metanol na emissão das bandas moleculares. (a) OH e (b) N<sub>2</sub><sup>+</sup> .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 2.1. Representação da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 2.2. Superfície de resposta obtida para os planejamentos de mistura para seleção do solvente extrator. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 2.3. Superfície de resposta obtida para os planejamentos de mistura para seleção do solvente dispersor. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 3.1. Desenho do nebulizador com tecnologia flow blurring e flow focusing .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 3.2. Desenho dos nebulizadores comerciais avaliados. (a) concêntrico; (b) MiraMist e (c) OneNeb series 1 e 2.....</b>	<b>68</b>

<b>Figura 3.3. Exemplo do gráfico de Boltzmann empregado para o cálculo de temperatura do plasma.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 3.4. Valores de RSD (%) obtidos para os quatro nebulizadores comerciais em diferentes matrizes. (a) HNO<sub>3</sub> (1% v v<sup>-1</sup>), (b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v v<sup>-1</sup>), (c) EIEs, (d) Etanol (1% v v<sup>-1</sup>) e (e) Carbono (1000 mg L<sup>-1</sup>).....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 3.5. Otimização da vazão do gás de nebulização para o Ca utilizando o OneNeb series 2. ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 4.1. Gráfico de correlação para os analitos determinados em amostras de carne bovina. ....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Valores do limite máximo permitido pela ANVISA em carne e derivados (RDC n. 42).....</b>	<b>3</b>
<b>Tabela 2. Espécies moleculares presentes em um plasma de nitrogênio. ....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 3. Trabalhos descritos na literatura que empregaram o ICP-MS/MS como técnica de detecção.....</b>	<b>22-23</b>
<b>Tabela 1.1. Parâmetros Instrumentais do MIP OES utilizados para determinação do P na fração lipídica da carne .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 1.2. Trabalhos reportados na literatura que utilizaram o EGCM durante a análise por MIP OES.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 1.3. Valores de P determinado na fração lipídica empregando a padronização interna, adição de padrão e calibração externa. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 1.4. Determinação de P na fração lipídica empregando OH e N<sub>2</sub><sup>+</sup> para a correção de sinal.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 1.5. Determinação de P na fração lipídica em amostras de carne empregando OH e Te como corretores de sinal .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 1.6. Limites de detecção obtidos empregando OH e Te.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 2.1. Parâmetros operacionais do MIP OES e ICP-MS para determinação de Mo em carne.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 2.2. Níveis estudados e seus respectivos volumes utilizados nos planejamentos de mistura.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 2.3. Planejamento experimental Box-Behnken empregado para otimização da DLLME.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 2.4. Parâmetros analíticos obtidos combinando DLLME e MIP OES.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 2.5. Teores de Mo determinados em amostras de carne de ovinos por DLLME-MIP OES e ICP-MS.....</b>	<b>59</b>

<b>Tabela 2.6. Procedimentos de pré-concentração descritos na literatura para a determinação de Mo.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 3.1. Parâmetros operacionais do MIP OES utilizados para avaliação dos nebulizadores.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 3.2. Informações dos desenhos dos nebulizadores empregados.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 3.3. Parâmetros empregados para construção do gráfico de Boltzmann.....</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 3.4. Parâmetros fundamentais e eficiência de transporte calculados para os nebulizadores comerciais.....</b>	<b>72</b>
<b>Tabela 3.5. Energias de ionização e excitação dos analitos avaliados.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabela 3.6. Limites de detecção calculado para os nebulizadores comerciais.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabela 3.7. Valores determinados e recuperações obtidas para os materiais de referência empregando os diferentes nebulizadores comerciais.....</b>	<b>80</b>
<b>Tabela 3.8. Ensaios de adição e recuperação para amostra de cachaça.....</b>	<b>81</b>
<b>Tabela 3.9. Observações e aplicações dos nebulizadores comerciais avaliados.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 4.1. Parâmetros instrumentais empregados para determinação dos elementos essenciais e potencialmente tóxicos em carne por ICP-MS/MS.....</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 4.2. Possíveis interferências espectrais para os analitos investigados.....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 4.3. Valores determinados e recuperações dos ensaios de adição e recuperação para o Cr.....</b>	<b>95</b>

<b>Tabela 4.4. Valores determinados e recuperações obtidos para a análise do CRM (1577 b NIST).</b> .....	94
<b>Tabela 4.5. Valores de limites de detecção obtidos empregando o ICP-MS/MS.</b> .....	96
<b>Tabela 4.6. Teores dos elementos essenciais e tóxicos em amostras de carne de bovino e ovino.</b> .....	96
<b>Tabela 4.7. Teores dos elementos essenciais e tóxicos em amostras de carne reportados na literatura.</b> .....	100

## RESUMO

ANÁLISE ELEMENTAR DE CARNES: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTRATÉGIAS PARA O USO DE TÉCNICAS COM FONTE DE PLASMA. A carne é amplamente consumida em todo mundo. Adicionalmente, esse alimento possui uma grande influência na economia brasileira. Em termos nutricionais, a carne é considerada como fonte de elementos essenciais, como cobre, ferro, fósforo, manganês e molibdênio, e, que desempenham importantes funções no organismo humano. Nesse contexto, o objetivo dessa tese é o desenvolvimento de métodos analíticos e investigação de estratégias para a determinação de elementos essenciais e tóxicos em carne por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem (ICP-MS/MS). O uso do MIP OES foi investigado para a determinação do fósforo a partir dos fosfolipídios em carne. Devido a introdução de solvente orgânico no plasma, foram adotadas algumas estratégias como o uso do módulo de controle de gás externo (EGCM) e a correção do sinal do P por padronização interna (Te) e espécie molecular (OH). Para estimar a exatidão do método, os resultados foram comparados a valores obtidos por cromatografia iônica, e as recuperações foram 95% para a padronização interna e 94% para a espécie molecular. Os resultados demonstraram que o uso dessas correções de sinais foram efetivas e representaram melhoria na exatidão. A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi empregada para aumentar a sensibilidade de procedimento para a determinação de molibdênio em carne por MIP OES. As escolhas dos solventes dispersor e extrator foram baseadas nos planejamentos de misturas. Adicionalmente, os parâmetros da DLLME foram otimizados empregando um planejamento Box-Behnken. O material de referência certificado de fígado bovino (NIST, 1577c) foi analisado para avaliar a exatidão, sendo obtida recuperação de 92%. O fator de pré-concentração e o limite de detecção foram 4,5 e 0,20  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Em outro estudo, foi realizada uma avaliação crítica dos nebulizadores para o plasma de nitrogênio. Neste tópico os efeitos de quatro nebulizadores (Concêntrico, MiraMist e OneNeb series 1 e 2) foram investigados quanto aos parâmetros fundamentais do plasma, como temperatura e densidade eletrônica. Adicionalmente foi avaliada a reprodutibilidade em diferentes matrizes. A exatidão foi investigada pela análise de quatro CRMs e pela

adição e recuperação em amostra de cachaça, devido a seu teor alcoólico. Os resultados demonstraram que os parâmetros fundamentais do plasma foram significativamente afetados pelos nebulizadores. Ademais, o nebulizador *OneNeb serie 2* apresentou um melhor desempenho em relação a sensibilidade, eficiência de transporte e precisão. Em outro estudo, a determinação de nove elementos essenciais e tóxicos (As, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Pb, Sr e V) em amostras de carne foi realizada por ICP-MS/MS. Inicialmente, foi avaliado o uso dos gases ( $O_2$ ,  $H_2$  e He) no sistema octopolar de reação (ORS) para a minimização de possíveis interferências espectrais. A escolha da melhor condição operacional foi baseada na exatidão obtida durante a análise do material de referência de fígado bovino (NIST, 1577b). Para o Cd, Co, Mo, Pb e V não foi necessário o uso de gases. Por outro lado, para Cr e As, o uso do He foi mais adequado, enquanto o emprego do  $H_2$  apresentou melhor recuperação para o Sr. Os limites de detecção para esse método variaram entre  $0,08 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Cd) e  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Mo). Posteriormente, amostras de carne bovina foram digeridas e analisadas em ICP-MS/MS sob condições ótimas. Por meio de um gráfico de correlação observou-se correlação positiva entre o Cd e Pb e Sr e Pb.

## ABSTRACT

ELEMENTAL ANALYSIS OF MEAT: ANALYTICAL METHODS DEVELOPMENT AND STRATEGIES FOR THE USE OF PLASMA-BASED TECHNIQUES. Meat is widely consumed around the world. Besides, this food has a significant influence on the Brazilian economy. Regarding the nutritional terms, it is considered as a source of essential elements (e.g., molybdenum, copper, and manganese) that are important to the human organism. In this context, this thesis's goal is the development of analytical methods and the investigation of strategies for the determination of essential and toxic elements in meat by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) and inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). The use of MIP OES was investigated for the determination of phosphorus from phospholipids in meat. Due to the introduction of organic solvent, some strategies were adopted, such as the employment of an external gas control module (EGCM) and the signal correction applying internal standardization (Te) and molecular species (OH). The accuracy was estimated by comparing the results obtained with ion chromatography. The recovery found using the internal standardization was 95%, while molecular specie was 94%. These results indicated that these signal corrections were effective, and their employment significantly improved accuracy. The dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was used to enhance the procedure's sensitivity for the determination of molybdenum in meat by MIP OES. In this study, the selection of extracting and dispersing solvents was based on the mixture design. Additionally, the DLLME parameters were optimized by applying a Box-Behnken design. A bovine liver certified reference material (1577c, NIST) was employed to check the accuracy and a recovery of 92% was obtained. The enhancement factor and the limit of detection estimated were 4.5 and  $0.20 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. In another work, a critical evaluation of nebulizer effects in a nitrogen plasma was performed. Four nebulizers (concentric, MiraMist, OneNeb series 1 and 2) were investigated concerning the plasma fundamental parameters (e.g., temperature and number of electron density) and solvent transport efficiency. Besides, the reproducibility was evaluated in different matrices, and the accuracy was investigated by analyzing four CRMs and s spiked sample from sugarcane spirit due to its alcoholic composition. The results demonstrated that the plasma fundamental parameters were considerably affected by the nebulizer type. Besides, the OneNeb series 2 showed the best performance considering the sensitivity, solvent transport efficiency and precision. The determination

of nine essential and toxic elements (As, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Pb, Sr, and V) in meat samples was performed by ICP-MS/MS. Initially, the use of gases ( $O_2$ ,  $H_2$ , and He) in the reaction octopolar system (ORS) was explored to minimize the spectral interferences. The best operating mode was selected evaluating the recoveries obtained during the CRM analysis (1577b, NIST). For Cd, Co, Mo, Pb, and V, the ORS's gas use was not required. On the other hand, for chromium and arsenic, He was more suitable, and for Sr,  $H_2$  was the best. The limit of detection varied from  $0.08 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Cd) to  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Mo). Then, meat samples were digested and analyzed by ICP-MS/MS using the optimal conditions. A correlation graphic showed the occurrence of a positive correlation between Cd – Pd and Sr – Pb.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO GERAL.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).....	8
Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com configuração tandem (ICP-MS/MS).....	19
Capítulo 1 .....	24
<i>Espécies moleculares e padronização interna: Abordagens para correção de sinal na determinação do fósforo a partir do fosfolipídio em amostras de carne por MIP OES</i> .....	24
1.1 INTRODUÇÃO .....	25
1.2 OBJETIVO .....	27
1.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
1.3.1 Equipamentos.....	27
1.3.2 Reagentes, soluções padrão e amostras.....	28
1.3.3 Preparo de amostra.....	29
1.3.4 Fósforo total e residual.....	30
1.4 RESULTADOS.....	31
1.4.1 Cromatografia iônica.....	31
1.4.2 Correção de sinal.....	32
1.4.3 Padronização interna .....	34
1.4.4 Espécies moleculares .....	36
1.5 Conclusões parciais.....	41
2 Capítulo 2.....	42
<i>Microextração líquido-líquido dispersiva como estratégia para determinação de molibdênio em carnes por MIP OES</i> .....	42
1.1 INTRODUÇÃO .....	43
2.1 OBJETIVO .....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.2.1 Equipamentos.....	46
2.2.2 Amostras, soluções e reagentes.....	48

2.2.3	Preparo de amostra .....	48
2.2.4	Seleção dos solventes extrator e dispersor .....	49
2.2.5	Otimização dos parâmetros experimentais da DLLME .....	49
2.2.6	Microextração líquido-líquido dispersiva .....	49
2.3	RESULTADOS.....	52
2.3.1	Seleção dos solventes extrator e dispersor e otimização do DLLME 52	
2.3.2	Desempenho analítico .....	55
2.3.3	Aplicações .....	58
2.4	Conclusões parciais.....	58
3	Capítulo 3.....	60
	<i>Avaliação do desempenho de diferentes nebulizadores em espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas</i> .....	60
3.1	INTRODUÇÃO .....	61
3.2	OBJETIVO .....	63
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	63
3.3.1	Equipamentos .....	63
3.3.2	Reagentes, soluções padrão e amostras.....	64
3.4	Resultados e Discussão .....	65
3.4.1	Desenho dos nebulizadores .....	65
3.4.2	Desempenho analítico dos nebulizadores .....	73
3.4.3	Aplicações dos nebulizadores na literatura .....	82
3.5	Conclusões parciais.....	84
4	Capítulo 4.....	85
	<i>Avaliação dos modos operacionais para a determinação multielementar de elementos tóxicos e essenciais por ICP-MS/MS</i> .....	85
4.1	INTRODUÇÃO .....	86
4.2	OBJETIVOS .....	87
4.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	88
4.3.1	Equipamentos .....	88
4.3.2	Reagentes, soluções e amostras.....	88
4.3.3	Preparo de amostra .....	89
4.4	RESULTADOS.....	90

4.4.1	Seleção dos gases utilizados no sistema octopolar de reação (ORS)	90
4.4.2	Limites de detecção e aplicação.....	95
4.5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	101
	CONCLUSÕES FINAIS .....	103
	REFERÊNCIAS .....	105

# *Introdução*

---

## INTRODUÇÃO

A carne tem sido utilizada na cadeia alimentar humana desde o início da civilização. Esse alimento consiste em músculos de animais como bovinos, ovinos, aves e suínos, entre outros.<sup>1</sup> Atualmente, o seu consumo apresenta crescimento com o progresso da urbanização. No entanto, alguns atributos como a produção agropecuária e a economia também influenciam diretamente.<sup>2</sup> De acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, *Organization for Economic Cooperation and Development*), em 2019, os principais países que consumiram carne bovina foram Argentina, Estados Unidos, Brasil e Israel. Em relação a carne suína, a União Europeia, Coreia do Sul e Vietnã lideram o ranking de consumo com respectivamente 34,6, 30,8 e 30 kg *per capita*. Por outro lado, o consumo de aves é predominante em Israel, Estados Unidos e Malásia. O consumo de ovinos tem sido presente principalmente no Cazaquistão, Austrália, Noruega e Arábia Saudita.<sup>3</sup>

A carne bovina desempenha um importante papel na economia brasileira. O Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial. Em 2018, estima-se que foram produzidos 11 milhões de toneladas de equivalente carcaça, sendo que 20% foram destinados à exportação para 95 países. Nesse contexto, a pecuária de corte representou 8,3% do produto interno bruto (PIB). Considerando a produção de bovinos no país, verifica-se que a região centro-oeste (Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul) concentra 35% do rebanho brasileiro.<sup>4</sup>

Em termos nutricionais, a carne possui importantes componentes para a nutrição humana, entre eles, vitaminas do complexo B, lipídios e proteínas.<sup>1,5,6</sup> Ademais, esses alimentos são fontes de importantes minerais tais como cálcio, potássio, molibdênio, ferro, selênio, e zinco, os quais desempenham importantes funções para o organismo.<sup>7,8</sup> O Zn tem se

destacado em funções para o sistema imunológico, especialmente para as respostas inflamatórias. Alguns estudos indicam que a alteração da sua concentração no organismo tem se relacionado diretamente com a presença de doenças infecciosas e inflamatórias.<sup>9</sup> Outros elementos como Mo e Fe desempenham funções como co-fatores de importantes enzimas (citocromo c oxidase e xantina oxidase).<sup>10-12</sup> Por outro lado, alguns elementos mesmo que essenciais quando ingeridos em excesso causam danos à saúde humana. Por exemplo, estudos indicam que altas concentrações de Mn podem afetar o cérebro por meio do estresse oxidativo.<sup>10</sup>

A presença de contaminantes inorgânicos em carne como As, Pb e Hg também tem se tornado uma preocupação. A presença desses elementos está relacionada com o processo de produção da carne, o qual está relacionado com a espécie animal, bem como com o tipo de alimentação e produção.<sup>10</sup> Visando a proteção da saúde pública, alguns órgãos reguladores têm estabelecido valores dos teores máximos permitidos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução - RDC Nº 42, determina limites máximos para As, Cd e Pb em carne e derivados (Tabela 1).<sup>13</sup> Adicionalmente, os valores de ingestão diária recomendada (RFI) para os elementos essenciais são fornecidos pela *Food and Nutrition Board*. Deve-se ressaltar que esses valores são discriminados de acordo com a faixa etária e o gênero.<sup>14</sup>

**Tabela 1. Valores de limite máximo permitido pela ANVISA em carne e derivados (RDC n. 42)**

<b>Elemento</b>	<b>Alimento</b>	<b>Limite máximo (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>As</b>	Carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, derivados crus, congelados ou refrigerados, embutidos e empanados crus	0,50
	Miúdos comestíveis exceto fígado e rins	1,0
	Fígado de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral	1,0
	Rins de bovinos, ovinos, suínos, caprinos.	1,0
<b>Cd</b>	Carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, derivados crus, congelados ou refrigerados, embutidos e empanados crus	0,05
	Fígado de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral	0,5
	Rins de bovinos, ovinos, suínos, caprinos	1,0
<b>Pb</b>	Carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, derivados crus, congelados ou refrigerados, embutidos e empanados crus	0,10
	Miúdos comestíveis exceto fígado e rins	0,5
	Fígado de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral	0,5
	Rins de bovinos, ovinos, suínos, caprinos	0,5

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos para a análise elementar de carne é fundamental para garantia da qualidade e da segurança alimentar. Para essa finalidade, verifica-se que as técnicas espectroscópicas têm ganhado grande destaque. A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é comumente utilizada, principalmente pela sua capacidade multi-elementar e ampla faixa linear. Essa técnica tem sido aplicada principalmente para a determinação de macronutrientes (Mg, Ca, P e S).<sup>7,15,16</sup>

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) possui características semelhantes às do ICP OES, no entanto, a principal vantagem dessa técnica relaciona-se com a sua alta sensibilidade e capacidade isotópica.<sup>17,18</sup> Portanto, o ICP-MS tem sido explorado para a quantificação de elementos essenciais e tóxicos em concentrações mais baixas em carne, além de análises de especiação.<sup>7,19</sup> Também é importante ressaltar que essa técnica é afetada por interferências devido a sobreposições espectrais por espécies poliatômicas. Nesse sentido, algumas estratégias para minimização desses efeitos como a cela de colisão com discriminação por energia cinética (KED, *kinect energy discrimination*), plasma frio, equações matemáticas e diferentes sistemas de introdução de amostras como dessolvatores, têm sido investigadas.<sup>20</sup>

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) também tem sido utilizada para análise elementar de carne.<sup>21,22</sup> Como fonte de excitação, o MIP OES emprega um plasma de nitrogênio, correspondendo a uma redução do custo operacional. Por outro lado, isso também resulta em menores temperaturas do plasma e maior suscetibilidade a efeitos de matriz.<sup>23,24</sup> Muitos trabalhos apresentam novas alternativas para viabilizar o uso dessa técnica para diferentes tipos de amostras. Nesse sentido, estudos de pré-concentração e novos métodos de

calibração SDA (*standard dilution analysis*), MEC (*multi-energy calibration*) e MFC (*multi-flow calibration*), além de correções de sinais com a padronização interna e espécies moleculares vem sendo explorados.<sup>25-28</sup>

# *Objetivos*

---

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal dessa tese foi avaliar o emprego da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) e da espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem (ICP-MS/MS) para análise elementar em carnes. Nesse contexto, estratégias para aumentar a sensibilidade e minimizar interferências espectrais e não-espectrais serão avaliadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Explorar métodos de correção de sinal (espécies moleculares e padronização interna) para determinação de fósforo na fração lipídica da carne por MIP OES;
- Investigar o uso da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para incremento de sensibilidade na determinação de molibdênio em carnes por MIP OES;
- Avaliar o efeito de diversos nebulizadores comerciais sob o plasma de nitrogênio;
- Analisar o uso de gases como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e He no sistema octopolar de reação (ORS) para minimizar interferências espectrais em ICP-MS/MS ;
- Desenvolver um método para determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos por ICP-MS/MS.

# *Revisão Bibliográfica*

---

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)

O uso da radiação micro-ondas para a manutenção de plasmas tem sido descrito desde 1950. Os plasmas de micro-ondas são divididos em dois grupos: plasma de micro-ondas acoplado capacitivamente (CMP) e o plasma induzido por micro-ondas (MIP). Essa classificação baseia-se em características como o mecanismo de transferência de energia para o gás do plasma, bem como a forma e a posição do plasma.<sup>26</sup> O CMP foi desenvolvido em 1951 como uma fonte de excitação, e o plasma é formado na ponta do eletrodo por meio da transferência de energia de um condutor interno na tocha.<sup>29</sup> Por outro lado, o MIP emprega a transferência de energia induzida por meio de emissão de radiação micro-ondas em uma cavidade ressonante. Desse modo, o campo elétrico e magnético gerado mantêm o plasma.<sup>30</sup>

Historicamente, o CMP e o MIP foram desenvolvidos paralelamente. O primeiro equipamento comercial que empregava um plasma de micro-ondas acoplado capacitivamente operado com uma potência de 2.45GHz foi introduzido em 1968. Nos 10 anos seguintes, mais dois espectrômetros foram desenvolvidos, no entanto, essas técnicas apresentaram limitações relacionadas às interferências, portanto, não foram competitivas frente ao ICP OES. Em 1985, o desenvolvimento da tocha de plasma de micro-ondas (*microwave plasma torch*, MPT) resultou em um plasma mais estável a introdução de amostras aquosas. Por fim, em 1999, um MPT OES comercial foi lançado na China.<sup>24</sup>

Em relação aos plasmas induzidos por micro-ondas, observa-se que até 1970, os plasmas eram gerados sob baixas pressões (*low-pressure MIP*). Esses plasmas eram bastante aplicados em acoplamentos com cromatografia

gasosa. Adicionalmente, o uso de sistemas de introdução de amostras como a vaporização eletrotérmica e a geração de vapor químico foi amplamente investigado devido aos efeitos das amostras aquosas no plasma. Em 1976, foi desenvolvido a cavidade de Beenakker a qual possuía um acoplamento simétrico e transferência de energia mais efetiva.<sup>31</sup> Essas características resultaram em um plasma mais estável. Posteriormente, em 1981, um trabalho avaliou o acoplamento do plasma induzido por micro-ondas (MIP) a um espectrômetro de massas (MS) para determinação elementar de Ag, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Tl. Nesse estudo, o argônio foi empregado para a formação do plasma e a potência aplicada foi 200 W.<sup>24,30</sup> Um equipamento comercial MIP-MS foi lançado em 1994 e nesse caso o gás utilizado para formação do plasma foi o nitrogênio. Em 1999, um plasma de hélio com formato anular foi desenvolvido por Okamoto.

Em 2012, a *Agilent Technologies* disponibilizou um equipamento comercial que consiste em um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), com arranjo de cavidade de Hammer. Entre as vantagens do MIP OES pode-se destacar a capacidade multi-elementar e a ampla faixa linear, as quais o conferem uma grande versatilidade.<sup>24</sup> Os principais componentes desse equipamento são sistema de introdução de amostras, fonte de excitação, sistema de alimentação do plasma e detector. Ademais, essa técnica opera com uma potência fixa de 1000 W.<sup>32</sup>

No MIP OES, o nitrogênio gasoso é empregado para a formação do plasma. O uso do N<sub>2</sub> representa uma redução significativa de custos quando comparado a outros gases como o argônio. Além disso, não há necessidade de um chiller, reduzindo o custo de aquisição. Alternativamente, a *Agilent Technologies* desenvolveu um gerador de nitrogênio, o qual funciona como uma peneira molecular e permite separar o N<sub>2</sub> do ar

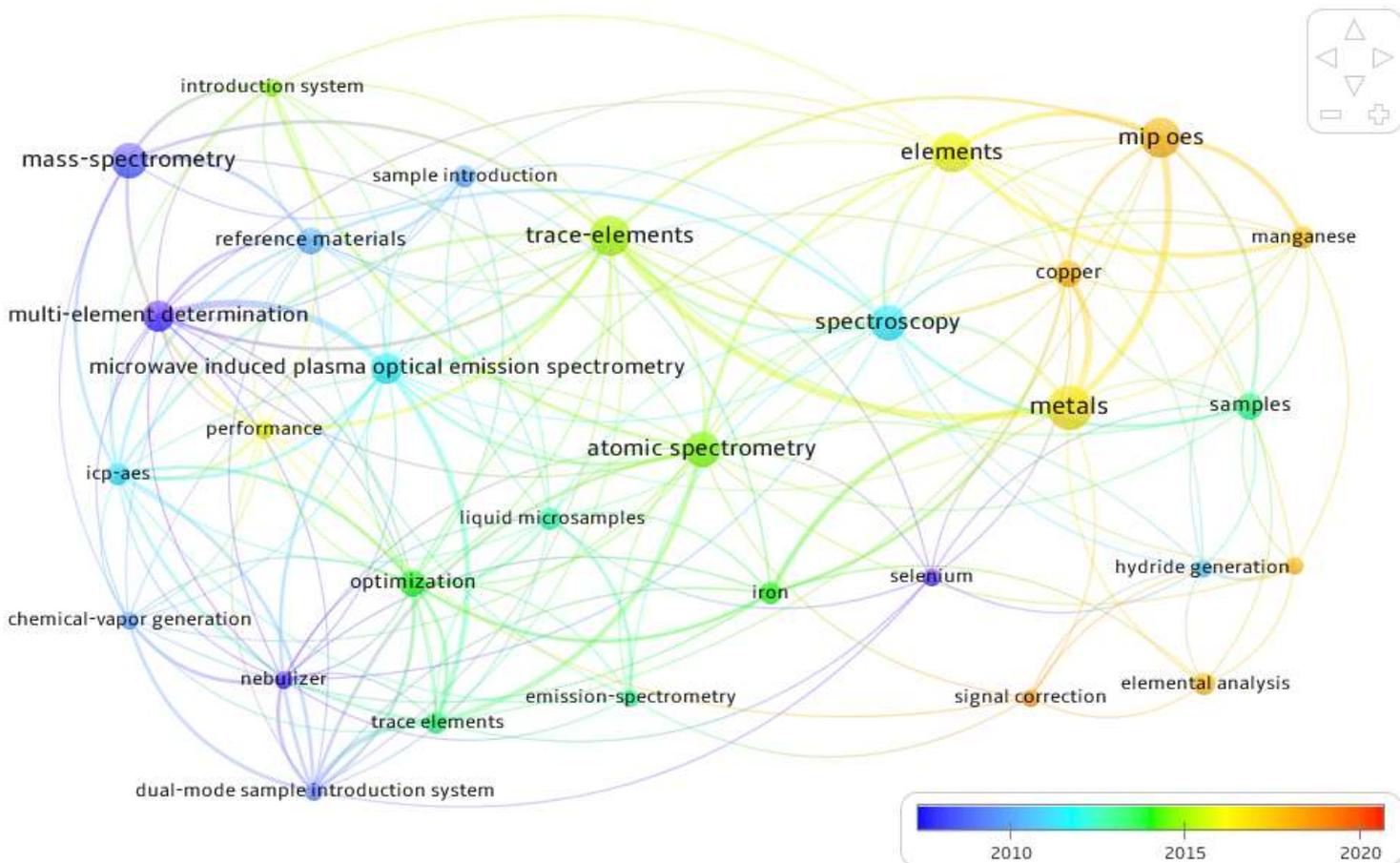
atmosférico. Consequentemente, a aquisição de cilindro de gases não é necessária. É importante ressaltar que a visão de leitura é axial, porém com a tocha é posicionada verticalmente. Essa configuração foi adotada para fornecer ao plasma maior robustez e estabilidade.<sup>24</sup>

Em uma pesquisa realizada na base Web of Science, aproximadamente 80 trabalhos utilizaram o MIP OES como técnica de detecção. Adicionalmente, encontra-se uma grande variedade de matrizes analisadas, tais como alimentos, ambientais e biológicas.<sup>24,33-36</sup> Por meio de um mapeamento bibliográfico obtido pelo programa *VOSviewer* (Fig. 1) foi possível se observar as 30 palavras-chave principais usadas. De acordo com o mapa obtido são verificados três *clusters*. Nesse caso, um envolve os últimos estudos realizados, tais como a correção de sinal analítico, a geração de hidretos e a determinação elementar. Por outro lado, o segundo e terceiro *clusters* envolvem pesquisas relacionadas com o sistema de introdução de amostra, nebulizadores, otimização, geração de vapor químico, determinação de elementos traço e comparação com outras técnicas espectroanalíticas.

Apesar das vantagens da operação do MIP OES com plasma de nitrogênio, alguns problemas relacionados aos efeitos de matriz têm sido relatados. O plasma de nitrogênio atinge uma temperatura de 5000 K, a qual é inferior à do argônio (8000 - 10000 K). Nesse sentido, alguns mecanismos de ionização e excitação podem ser comprometidos. Além disso, a presença de solventes orgânicos e elementos facilmente ionizáveis podem afetar criticamente a análise.<sup>23,24</sup>

O efeito de matriz ocasionado pelo carbono, enxofre e cálcio no MIP OES foi investigado por Serrano et al. 2019.<sup>37</sup> Para o desenvolvimento desse estudo, os autores empregaram soluções contendo glicerol, nitrato de cálcio e ácido sulfúrico. Nesse caso, foram investigados dez analitos (As, Co,

Cu, Mg, Mn, Mo, Sc, Se, Sr e Zn), aos quais correspondem linhas atômicas e iônicas com intervalo da soma de energia ( $E_{sum}$ ) entre 2,69 e 15,40 V. Em relação aos efeitos de transporte, os resultados indicaram que nenhuma matriz afetou significativamente o tamanho da gota do aerossol formado. Por outro lado, as matrizes contendo ácido sulfúrico e nitrato de cálcio reduziram a temperatura do plasma. Em relação aos efeitos sob a intensidade de emissão dos analitos, foi verificado que apenas o cálcio influenciou significativamente os efeitos de supressão ou aumento do sinal analítico.



**Figura 1.** Mapa bibliográfico obtido para as 30 palavras chaves mais utilizadas em trabalhos envolvendo o MIP OES.

### *Novas estratégias para redução de interferências não espectrais*

Devido ao menor custo relativo e a versatilidade do MIP OES, muitos trabalhos na literatura têm focado em estratégias para minimizar os efeitos de matriz e assim possibilitar a análise de amostras complexas.<sup>24</sup> Abordagens convencionais como a padronização interna, adição de analito e supressão de ionização têm sido aplicados.<sup>38</sup> Pires et al. avaliaram o uso de Be, Ga, In, Sc e Y como padrões internos para análise elementar de cerveja por MIP OES.<sup>39</sup> O germânio foi empregado como padrão interno para a determinação de As, Bi, Sb, Se e Sn por geração de hidretos.<sup>40</sup> Recentemente, novos métodos têm focado em calibrações e correções de sinais que possibilitam minimizar esses efeitos de matriz de forma mais eficiente. Entre esses métodos pode-se destacar a calibração multienergética (MEC), calibração multivazões (MFC), análise por diluição de padrão (SDA), somatório de linhas (para minimizar interferências) e correção de sinal com espécies moleculares.<sup>25,28,41-43</sup>

### ***Correção de sinal com espécies moleculares***

Em um plasma de nitrogênio, pode ocorrer a formação de sinal de fundo por bandas moleculares. Essas bandas são resultantes da excitação de espécies moleculares (neutras, iônicas ou radicalares), tais como, OH, CN, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO, N<sub>2</sub>, CH. Essas espécies possuem transições eletrônicas características e suas bandas podem ser observadas em comprimentos de ondas específicos (Tabela 2). A intensidade de emissão das bandas moleculares pode variar de acordo com a matriz e o sistema de introdução de amostras empregado. Dependendo do analito analisado, interferências espectrais podem ocorrer.<sup>30</sup> Chalyavi et al.<sup>44</sup> observaram a presença de bandas moleculares no espectro de uma solução aquosa obtido por MIP OES (Figura 2).

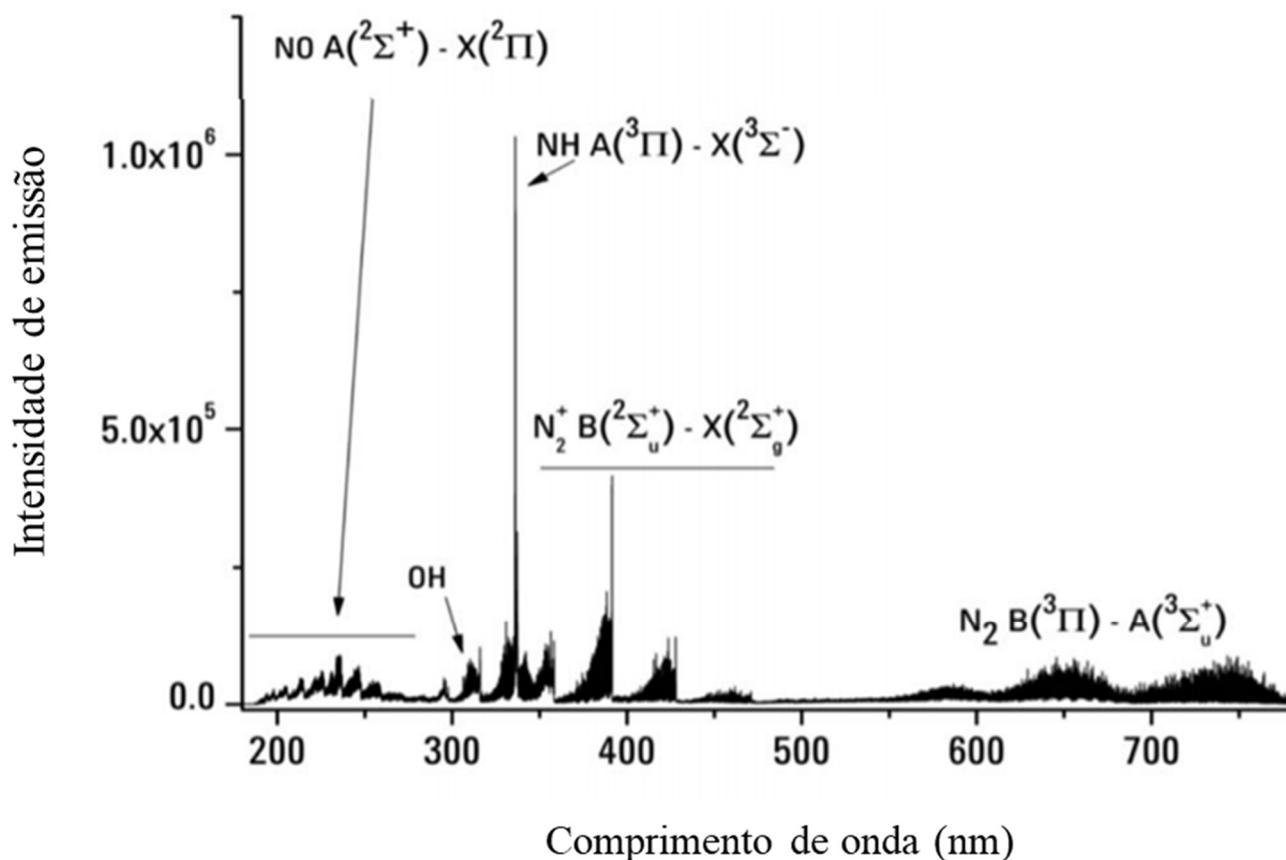


Figura 2. Espectro de emissão para uma solução aquosa obtida por MIP OES.<sup>44</sup>

Nesse contexto, Lowery et al.<sup>28</sup> propuseram o uso das espécies moleculares OH e N<sub>2</sub> para a correção de sinal em análise de biodiesel. Esse tipo de correção baseia-se nas flutuações que podem ocorrer no plasma durante a análise de uma matriz complexa. Nesse trabalho, as amostras foram apenas diluídas em ácido nítrico e 1-propanol e introduzidas no MIP OES. Foram determinados Ca, K, Mg e Na e o uso da correção com as espécies moleculares proporcionou aumento considerável da exatidão. O uso da correção do sinal pela espécie molecular N<sub>2</sub><sup>+</sup> também foi empregado para determinação de Al, Ca, Fe e Mg em amostras de unhas.<sup>34</sup>

Em outra interessante aplicação, o emprego das espécies moleculares foi investigado para o diagnóstico da robustez do plasma de MIP OES, em alternativa à razão de sinais de magnésio iônico e atômico (Mg II/Mg I), comumente usados para avaliações desse tipo em ICP OES.

Previamente, os autores exploraram a aplicabilidade de algumas espécies moleculares (CN, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup> e OH). O uso da razão N<sub>2</sub><sup>+</sup>/OH foi mais adequado devido a sua alta sensibilidade para mudanças no plasma. Ademais, foi verificado que essa razão pode ser empregada durante a otimização operacional do MIP OES para minimizar os efeitos de matriz. Por fim, nesse trabalho, foi evidenciada a eficácia da correção de sinal com espécies moleculares para matrizes contendo carbono, sódio, cálcio e ácido clorídrico.<sup>45</sup>

Tabela 2. Espécies moleculares presentes em um plasma de nitrogênio.

Espécies moleculares	Comprimento de onda (nm)	Transição
<b>NO</b>	205,2	$[A^2 \Sigma^+ - x^3 \pi]$ 2,0
	215,5	1,0
<b>OH</b>	281,1	$[^2 \Sigma^+ - ^2 \pi]$ 1,0
	287,5	2,1
	294,5	3,2
	306,4	0,0
<b>NH</b>	336,0	$[A^3 \pi - x^3 \Sigma^-]$ 0,01
	337,1	1,1
<b>N<sub>2</sub></b>	296,2	$[^3 P_u - B^3 P_g]$ 3,1
	311,7	3,2
	315,9	1,0
<b>N<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	391,1	$[B^2 \Sigma^+ - x^2 \pi]$ 0,0
<b>CO<sup>+</sup></b>	219,0	0,0
	221,5	1,1
	230,0	0,1
<b>CN</b>	358,6	$[B^2 \Sigma - x^2 \Sigma]$ 2,1
	359,0	1,0
	385,5	3,3
<b>CH</b>	431,4	$[A^2 \Delta - x^2 \pi]$ 0,0
<b>C<sub>2</sub></b>	473,7	$[A^3 \pi - x^2 \pi_u]$ 1,0
	512,9	1,1
	516,5	0,0

## ***Calibração multienergética (MEC)***

A calibração multi-energética (*multi-energy calibration*, MEC) foi proposta por Virgilio et al, 2015.<sup>25</sup> Esse método baseia-se na capacidade de um mesmo analito gerar diferentes sinais em diversos comprimentos de onda, efeito atribuído às energias de transição. Para essa calibração são requeridas duas soluções, sendo a solução A contendo amostra e branco (1:1 v v<sup>-1</sup>) e a solução B, amostra e padrão (1:1 v v<sup>-1</sup>). Em seguida, são realizadas medidas para as soluções em diversos comprimentos de ondas ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \dots, \lambda_n$ ). Para o tratamento de dados, constrói-se um gráfico das intensidades (Fig. 3) obtidas para vários comprimentos de onda obtidos para solução A (eixo y) e solução B (eixo x). O cálculo da concentração do analito (Eq. 1) é realizado de acordo com o valor do coeficiente angular (b).<sup>46</sup>

$$C_{amostra} = C_{padr\tilde{a}o} * b / (1 - b) \quad (1)$$

A vantagem dessa calibração é a compatibilização de matriz e o emprego de apenas duas soluções. Nesse sentido, uma menor quantidade de amostra é consumida, bem como uma maior frequência analítica. Em um recente trabalho, as faixas de trabalho para o MEC foram investigadas. Verificou-se que o coeficiente angular deve se situar entre 0,1 e 0,9 para obtenção de resultados com boa exatidão.<sup>47</sup>

O MEC foi empregado para determinação de As, Ba, Cr e Pb em fertilizantes por MIP OES. Ademais, outras calibrações como calibração externa e adição de analito foram investigadas. As recuperações obtidas para o MEC variaram de 98 a 101%. Essa estratégia mostrou um melhor desempenho quando comparada às outras calibrações.<sup>26</sup> Espinosa Cruz et al.<sup>48</sup> exploraram o uso do MEC para análise elementar de vinhos por MIP OES. Os resultados indicaram uma satisfatória exatidão, obtida quando essa calibração foi aplicada para os macroelementos.

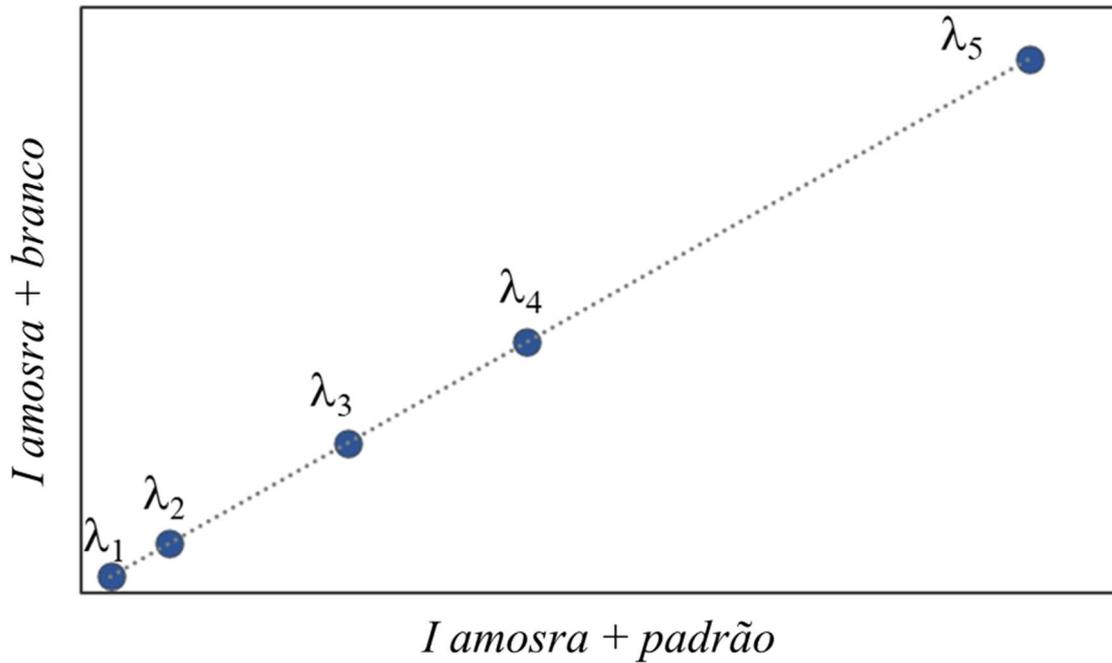


Figura 3. Representação gráfica da calibração multienergética (multi-energy calibration).

### Calibração de multi-vazões (MFC)

Uma nova calibração envolvendo a variação da vazão do gás de nebulização (Q) foi proposta por Willians et al.<sup>27</sup> Esse método consiste na aplicação de uma solução padrão e uma solução contendo amostra. Essas soluções são analisadas separadamente em diversas vazões do gás de nebulização. A partir da construção do gráfico das intensidades obtidas para amostra (*eixo y*) e para o padrão (*eixo x*) para cada Q (Fig. 4), é possível estimar a concentração presente na amostra por meio da equação 2. Sendo *b* o coeficiente angular obtido pela curva e  $C_{\text{padrão}}$  a concentração do analito na solução padrão. Os efeitos das flutuações do plasma são incorporados à calibração, pois a solução padrão e a amostra são submetidos a diferentes condições do plasma.

$$C_{\text{amostra}} = b * C_{\text{padrão}} \quad (2)$$

Os autores avaliaram a aplicabilidade da calibração de multivazões para a determinação de Cu, Cr, Fe e Mn em amostras de água, tecido vegetal e sedimentos. Os resultados obtidos apresentaram maior exatidão do que a calibração externa. Deve-se ressaltar que essa calibração não utiliza o princípio da compatibilização de matriz. No entanto, o seu princípio resulta na redução das flutuações instrumentais.<sup>27</sup>

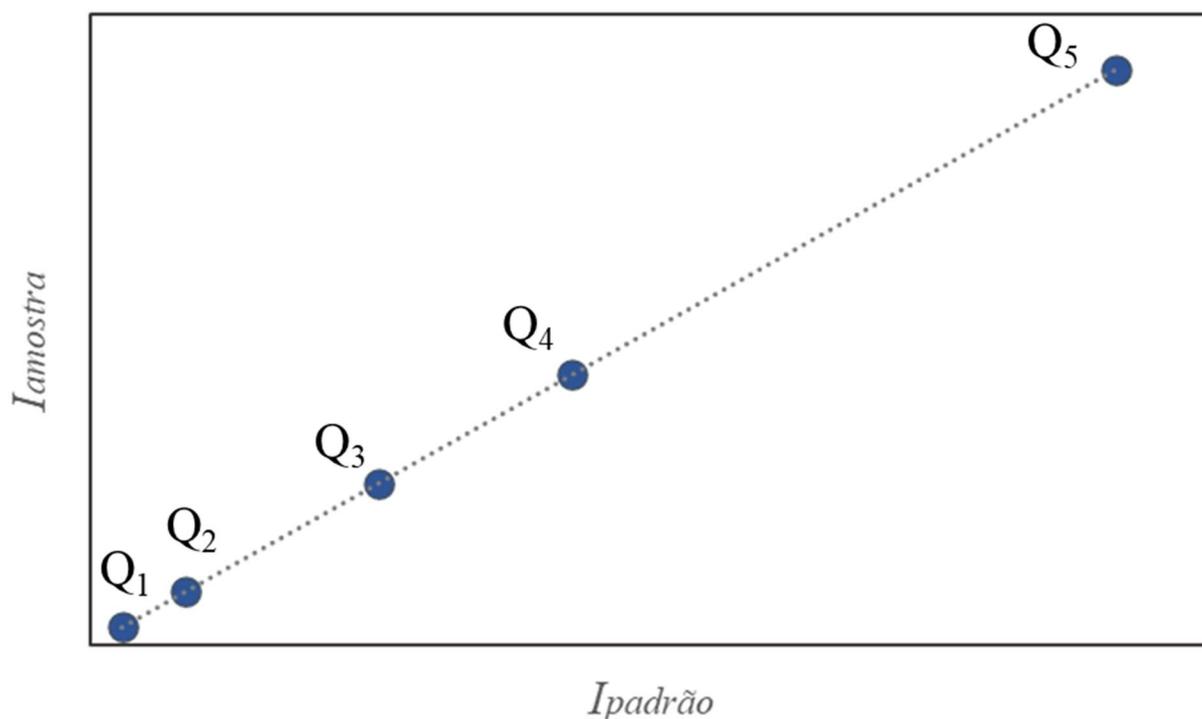


Figura 4. Representação gráfica da calibração de multi-vazões (*multi-flow calibration*)

## **Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com configuração tandem (ICP-MS/MS)**

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) apresenta um grande destaque para análise de traços devido à sua alta sensibilidade, ampla faixa linear e possibilidade de análise multielementar e isotópica.<sup>17,18</sup> Apesar das suas vantagens, essa técnica tem apresentado algumas limitações relacionadas às interferências espectrais. Essas interferências ocorrem devido a presença de íons poliatômicos ou concomitantes presentes na matriz, que possuem a mesma razão massa/carga ( $m/z$ ) do analito.<sup>20,49,50</sup> Por exemplo, o isótopo mais abundante do Cr ( $^{52}\text{Cr}$ ), pode ser afetado pelo  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ . Para o arsênio ( $m/z = 75$ ), interferências severas podem ocorrer devido à presença de espécies poliatômicas formadas pelos constituintes do plasma e reagentes, tais como  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ .<sup>51</sup> Como resultado, o sinal analítico pode ser suprimido ou aumentado e, dessa forma, a precisão e exatidão podem ser criticamente afetadas. Algumas estratégias permitem reduzir esse problema, como o uso de dessolvatores no sistema de introdução de amostra, equações matemáticas e cela de colisão por discriminação de energia cinética (KED).<sup>20,52-55</sup>

Nesse contexto, a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com configuração tandem (ICP-MS/MS) foi desenvolvida para reduzir as interferências espectrais. Para atingir esse objetivo, essa técnica possui dois quadrupolos ( $Q_1$  e  $Q_2$ ) e entre eles um octopolo (ORS) (Fig. 5). No modo MS/MS, o primeiro quadrupolo é configurado para selecionar  $m/z$ s específicas dos analitos e atua como um filtro de massa. Posteriormente, esses analitos e seus respectivos interferentes passam pelo sistema octopolar de reação. A ORS pode ser pressurizada com gases reativos ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{NH}_3$ ). Nesse caso, o gás pode

reagir com o analito, produzindo um novo produto de maior massa (modo *mass-shift*) ou com o interferente (modo *on-mass*). Também é possível o uso de gases não reativos como He, o qual irá minimizar as interferências espectrais dos íons poliatômicos por reações de troca de carga.<sup>49</sup>

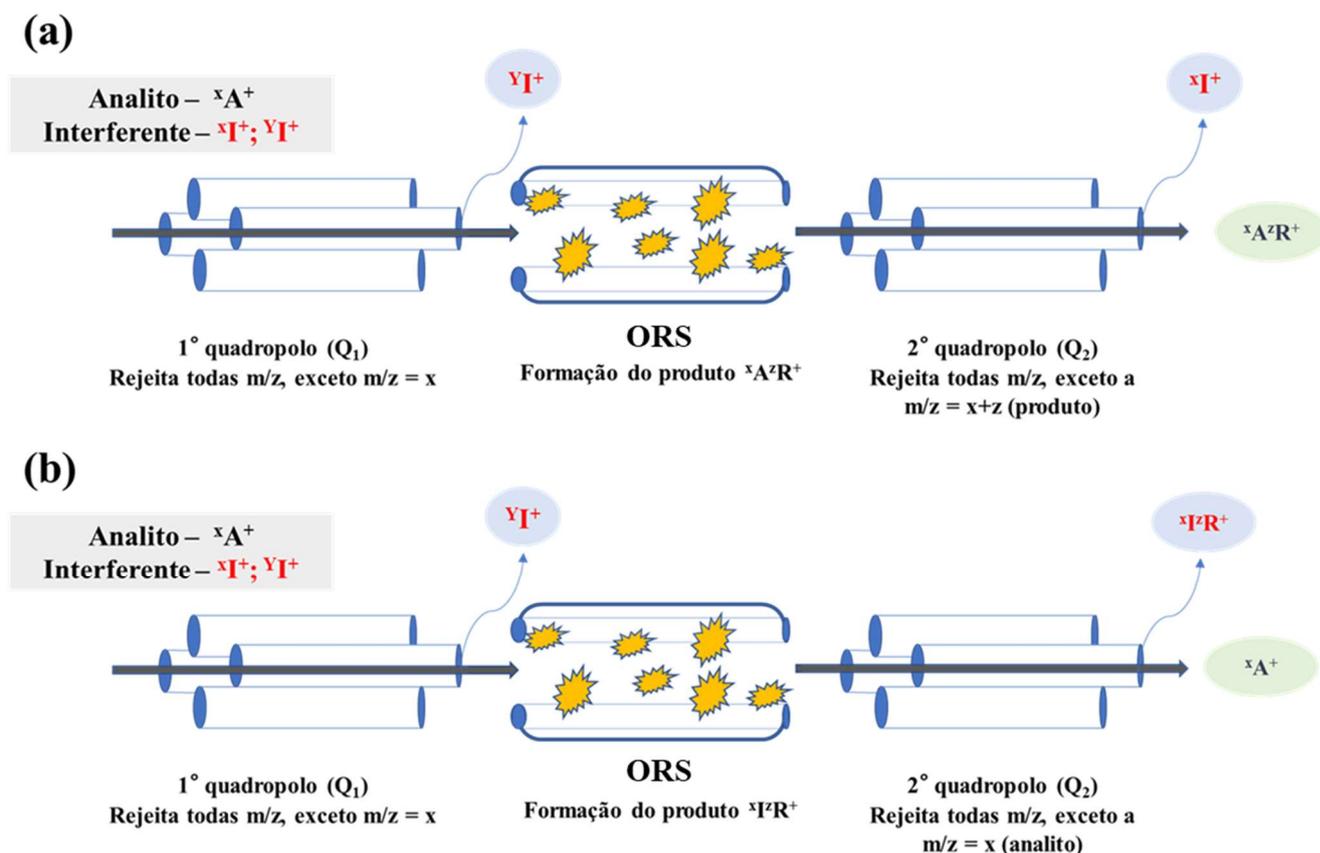


Figura 5. Representação da configuração do ICP-MS/MS. (a) modo *mass-shift* e (b) modo *on-mass*.

Atualmente essa técnica é considerada como o estado-da-arte para análise de traços e na literatura há um grande número de exemplos a respeito da aplicabilidade do ICP-MS/MS. Leśniewska et al.<sup>56</sup> desenvolveram um método para a determinação de Pd em amostras de águas salinas e residuárias. Primeiramente, as amostras passaram por um sistema de pré-concentração em fase sólida. Para a determinação do  $^{105}\text{Pd}$  por ICP-MS/MS, o uso do He e  $\text{NH}_3$  foi eficaz para eliminar a interferência do Sr. Ademais, a combinação da pré-concentração em estado sólido com ICP-

MS/MS resultou em aumento da capacidade de detecção, dessa forma sendo possível a quantificação em  $\text{pg L}^{-1}$ .

Devido à sua capacidade isotópica, o ICP-MS/MS tem sido extensivamente utilizado para análise de amostras nucleares. A determinação dos isótopos de urânio ( $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$  e  $^{233}\text{U}$ ) em lodo composto por fluoreto de cálcio foi realizada empregando o ICP-MS/MS. A etapa do preparo de amostra consistiu em uma fusão com metaborato de lítio e em seguida a solução resultante foi separada por uma coluna de troca iônica. Nesse estudo, o hélio foi utilizado no sistema de reação octopolar. Foi verificado que o seu uso possibilitou a redução de interferências espectrais, bem como, aumentou a sensibilidade.<sup>57</sup>

O uso do ICP-MS/MS tem sido descrito também para amostras alimentícias. Recentemente foi reportada sua aplicação para determinação de quatorze elementos em vinhos. Como preparo de amostra foi empregado apenas uma diluição simples da amostra com ácido nítrico. O uso dos gases como oxigênio, hidrogênio, amônia e hélio foi explorado para eliminação de interferências espectrais.<sup>58</sup> A Tabela 3 apresenta algumas aplicações do ICP-MS/MS e o uso dos gases na ORS para diversas matrizes.

**Tabela 3. Trabalhos descritos na literatura que empregaram o ICP-MS/MS como técnica de detecção**

<b>Amostra</b>	<b>Analitos</b>	<b>Gás empregado no ORS</b>	<b>Referência</b>
Sangue	Ti	NH <sub>3</sub> e O <sub>2</sub>	59
Biodiesel, diesel e óleo lubrificante	P, S e Si	O <sub>2</sub>	60
Água	As, Cr, Hg e V	O <sub>2</sub>	61
Leite	Cd	O <sub>2</sub>	62
Tecido vegetal	As e Se	O <sub>2</sub>	63
Solos e sedimentos	Eu, Nd e Sm	He e NH <sub>3</sub>	64
Sólidos suspensos	Cs e Pu	N <sub>2</sub> O	65
Sucos	As	O <sub>2</sub>	66
Planta	Mo	O <sub>2</sub>	67
Urina	Bi, Cs, Mo, Rb, Sb, Sn, Sr, V e Zn	He e H <sub>2</sub>	68

**Tabela 3. Trabalhos descritos na literatura que empregaram o ICP-MS/MS como técnica de detecção (Continuação)**

<b>Amostra</b>	<b>Analitos</b>	<b>Gás empregado no ORS</b>	<b>Referência</b>
Soro humano	As, Ca, Cd, Cu, Fe, I, Mg, Mo, Se e Zn	He, H <sub>2</sub> e O <sub>2</sub>	69
Água de mar	Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	O <sub>2</sub>	70
Amostras ambientais	I	O <sub>2</sub>	71
Óleo essencial	As, Cd, Cr, Hg, Ni e Zn	He e O <sub>2</sub>	72
Fluído folicular	As, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Mo, Se, Sr e Zn	He e O <sub>2</sub>	73
Amostras ambientais	Pu	CO <sub>2</sub>	74
Lodo	U	He	57
Material particulado	67 elementos	O <sub>2</sub> e He	75
Água de mar	Fe	NH <sub>3</sub>	76
Amostras ambientais	Pd	He e NH <sub>3</sub>	56

# Capítulo 1

---

*Espécies moleculares e padronização interna:  
Abordagens para correção de sinal na  
determinação do fósforo a partir do fosfolipídio  
em amostras de carne por MIP OES*

## 1.1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial para a saúde humana e pode ser encontrado em diversos alimentos. Esse nutriente pode estar presente como sais inorgânicos (aditivos) ou associado com moléculas orgânicas, as quais podem ser de origem animal ou vegetal. Nos tecidos animais, o fósforo pode ser encontrado como fosfoproteínas e fosfolipídios.<sup>77-79</sup> De acordo com Vervloet et al.<sup>80</sup>, aproximadamente 40 – 60% dessa fração de fósforo pode ser absorvida pelo organismo humano.

Os fosfolipídios são uma classe de lipídios polares que possuem uma estrutura de glicerol (3 carbonos na cadeia) esterificados com dois ácidos graxos nas primeira e segunda posições. Geralmente, esses dois grupos são chamados de cauda. Na terceira posição (comumente chamada de cabeça), há um grupo fosfato o qual é esterificado com um álcool.<sup>81</sup> A soja, sementes de girassol e gema de ovo apresentam altas concentrações desses fosfolipídios.<sup>82-85</sup>

Ao contrário dos glicerídeos, os fosfolipídios participam das reações de Maillard devido a sua miscibilidade.<sup>86</sup> Portanto, a presença dessas substâncias irá influenciar o aroma e o sabor da carne. Em um trabalho desenvolvido por Mottram e Edwards<sup>87,88</sup>, o efeito da presença de fosfolipídios na carne bovina foram investigados. Os autores promoveram a remoção de triglicerídeos e fosfolipídios previamente ao cozimento da carne. Os resultados mostraram que a ausência dos fosfolipídios, alteraram o perfil das espécies voláteis formadas durante o tratamento térmico. Adicionalmente, o aroma final foi caracterizado como “queimado”. Por outro lado, a remoção dos triglicerídeos não afetou as propriedades da carne no final do cozimento.

Nesse contexto, a presença dos fosfolipídios em carne tem um relevante impacto na qualidade do alimento. Há diversos métodos analíticos que focam na quantificação desses lipídios. As técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), são comumente aplicadas.<sup>89,90</sup> As técnicas espectroscópicas também têm sido utilizadas para esse fim. Entre elas pode-se citar a espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente, espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR CS GF MAS).<sup>77,91-93</sup>

Benini et al.<sup>77</sup> desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de fosfolipídios em carne. O método de Folch (clorofórmio/metanol) foi empregado para a extração de lipídios. Em seguida, o solvente do extrato foi evaporado e os lipídios foram digeridos com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio. A quantificação do fósforo a partir de fosfolipídios foi realizada por espectrofotometria UV-Vis pelo método do azul de molibdênio.

O uso da espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF MAS) foi descrito para a determinação de fosfolipídios em lecitina de soja. Nesse trabalho o fósforo foi monitorado via absorção molecular do monóxido de fósforo (PO) em 213,561 nm. As temperaturas de pirólise e volatilização foram 1300 e 2300°C, respectivamente, e o Mg foi utilizado como modificador químico. Os resultados obtidos por HR-CS GF MAS foram comparáveis ao ICP OES.<sup>93</sup>

## 1.2 OBJETIVO

O objetivo desse capítulo foi investigar a aplicação do MIP OES para a quantificação do fósforo a partir dos fosfolipídios em amostras de carne. Em virtude da introdução direta de solvente orgânico no plasma, a padronização interna e uso de espécies moleculares foram avaliadas como estratégias de correção de sinal.

## 1.3 EXPERIMENTAL

### 1.3.1 Equipamentos

Os experimentos foram realizados empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (4200 MP-AES, *Agilent Technologies*, Melbourne, Austrália). Em conjunto a esse equipamento, foi utilizado um gerador de nitrogênio (*Agilent Technologies*, model 4107). Os parâmetros operacionais utilizado para o MIP OES são apresentados na Tabela 1.1. A digestão das amostras para a determinação do fósforo na massa residual após a extração lipídica foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Itália).

Para o método de referência, foi utilizado um cromatógrafo iônico como detector condutimétrico (Compact IC Flex, Methrotm, Suíça). A fase móvel foi composta de solução de carbonato ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e bicarbonato de sódio ( $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e o vazão do eluente foi de aproximadamente  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O ácido sulfúrico ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi utilizado como supressor de ionização e a vazão utilizada foi  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . A coluna utilizada foi empacotada com álcool polivinílico com grupos de amônia quaternária (Metrosep A Supp 7–250/4.0). Essa coluna foi mantida em um forno a  $30^\circ\text{C}$ .

**Tabela 1.1. Parâmetros Instrumentais do MIP OES utilizados para determinação do P na fração lipídica da carne**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condição operacional</b>
Frequência de operação(MHz)	2450
Potência de operação (kW)	1,0
Vazão do gás de nebulização (mL min <sup>-1</sup> )	1,0
Posição de observação do plasma	20
Tempo de estabilização (s)	15
Tempo de integração (s)	3
Nebulizador	OneNeb series 1
EGCM	Médio (0,75 L min <sup>-1</sup> )
Câmara de nebulização	Ciclônica
<b>Analitos</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>
P (I)	213,62
Tb (OH)	308,96
Nb (N <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	391,47
Te (I)	214,28
Co (I)	340,51

### **I – Linhas atômicas**

#### ***1.3.2 Reagentes, soluções padrão e amostras***

Para extração dos analitos e diluição dos extratos foi utilizado metanol (grau HPLC, Tedia, São Paulo, SP, Brasil) e clorofórmio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). As soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm) obtidas de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Para a digestão ácida, empregou-se ácido nítrico (Synth) previamente purificado por

subdestilação (Milestone, Itália) e peróxido de hidrogênio 30 % m v<sup>-1</sup> (Synth).

As soluções padrão utilizadas para calibração foram preparadas pela diluição de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de P, Ge e Co (Fluka, Buchs St. Gallen, Suécia). Para as soluções padrão utilizadas no cromatógrafo iônico, utilizou-se uma solução estoque de 10 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Sigma Aldrich, Suécia).

As amostras de carne bovina, ovina, peixe e frango utilizadas foram adquiridas em mercado local na cidade de São Carlos, SP. Essas amostras foram liofilizadas e moídas em um moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, Brasil).

### ***1.3.3 Preparo de amostra***

#### ***1.3.3.1 Extração dos fosfolipídios***

##### **Cromatografia Iônica**

O método de Folch foi utilizado para a extração dos fosfolipídios. Para a cromatografia iônica, foi empregado 2 g de amostra e 20 mL de mistura extratora composta de 70% metanol e 30% clorofórmio (v/v) foi utilizada. Essa mistura foi agitada em um agitador do tipo vortex e posteriormente centrifugada. Posteriormente, uma solução contendo cloreto de sódio (0,6% m v<sup>-1</sup>) foi adicionada para a remoção de possíveis proteínas ou moléculas pequenas.<sup>94</sup> A mistura foi novamente centrifugada e a fase aquosa foi removida. O extrato contendo os fosfolipídios foi transferido para um cadinho de alumina e o solvente foi evaporado a 80 °C em uma chapa de aquecimento. Posteriormente, o cadinho foi levado a uma mufla com aquecimento induzido por micro-ondas a 500 °C para decomposição por via

seca dos lipídios. As cinzas foram diluídas em água e analisadas por cromatografia iônica.

## **MIP OES**

Para a extração lipídica, empregou-se o mesmo procedimento para a cromatografia iônica, no entanto, 10 mL de solução composta de 70% metanol ( $v v^{-1}$ ) e 30% clorofórmio ( $v v^{-1}$ ) e 1 g de amostra de carne foram utilizados. O extrato final foi diluído cinco vezes com metanol previamente à análise por MIP OES.

### ***1.3.4 Fósforo total e residual***

Para a determinação do fósforo total, 0,1 g de amostra de carne foi digerido em um forno de micro-ondas com cavidade com 8 mL de  $HNO_3$  ( $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 2 mL de  $H_2O_2$  (30%  $m v^{-1}$ ). O programa de aquecimento aplicado foi uma rampa de 5 min para atingir  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  e um patamar de 15 min a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, aplicou-se uma rampa de 10 min até  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  e um patamar de 25 min a  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a digestão, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e o volume final foi ajustado para 30 mL com água desionizada.

O fósforo foi determinado na massa residual obtida após a remoção dos lipídios. Nesse caso, após a extração, a massa residual foi seca a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  para a remoção do solvente. Em seguida, 100 mg dessa amostra foi digerida com 8 mL de  $HNO_3$  ( $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 2 mL de  $H_2O_2$  (30%  $m v^{-1}$ ). O programa de aquecimento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente.

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Cromatografia Iônica

A cromatografia iônica foi utilizada como método de referência por se tratar de técnica com princípios diferentes do MIP OES. Nesse caso, o fósforo foi monitorado como fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e, de acordo com o cromatograma obtido (Fig. 1.1), seu tempo de retenção foi de aproximadamente 23 min. Observa-se pelo cromatograma, um significativo pico de nitrato ( $t_R = 16$  min), o que pode ser proveniente de alguma possível contaminação. Em relação aos parâmetros analíticos, a faixa linear de trabalho empregada foi 1 - 5  $\text{mg L}^{-1}$ . O fígado bovino foi escolhido para o desenvolvimento dessa etapa. A sua escolha foi baseada na complexidade dessa matriz, além do seu alto teor lipídico ( $19 \pm 1,1$  %  $\text{m m}^{-1}$ ). O valor encontrado do fósforo a partir do fosfolipídio foi  $22,2 \pm 1,5$   $\text{mg}/100$  g de amostra.

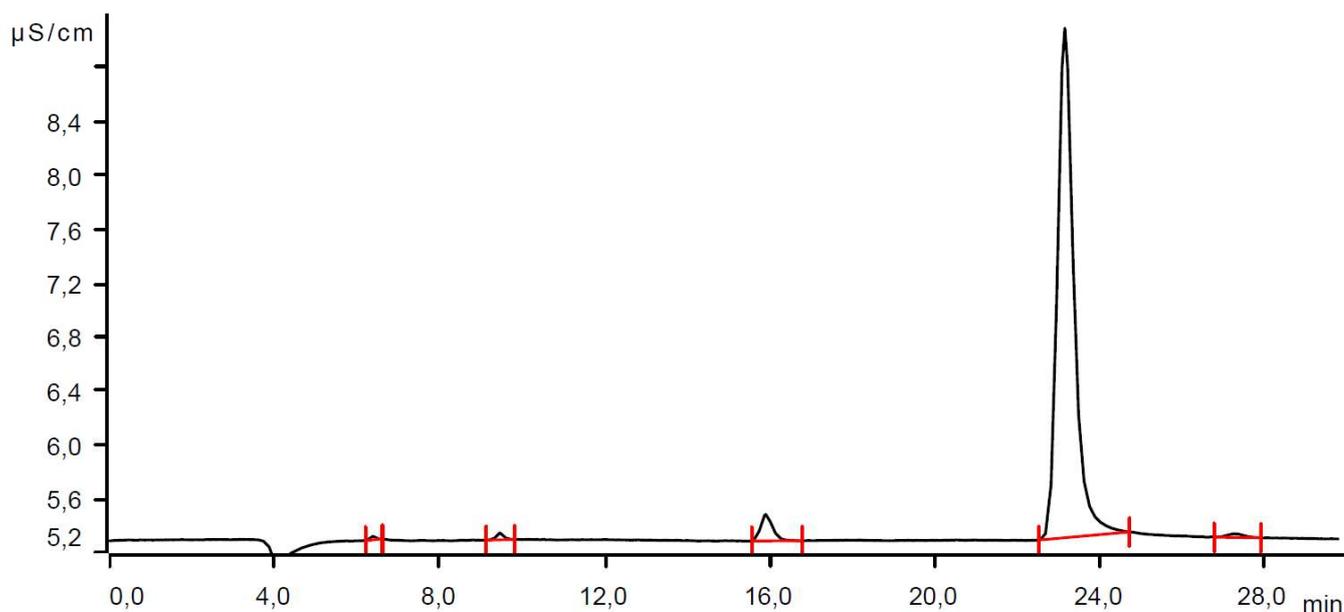


Figura 1.1. Cromatograma da fração lipídica obtido após a decomposição por via seca.

Para avaliar a exatidão do valor obtido por cromatografia iônica, um balanço de massa foi aplicado. Nesse caso utilizou-se a soma das massas de P determinadas nas frações lipídica ( $P_{lipídio}$ ) e residual ( $P_{residual}$ ) (Eq. 1.1). Em seguida, a exatidão foi estimada pela comparação entre o valor obtido com o somatório ( $11,8 \text{ g kg}^{-1}$ ) e o valor do P determinado via digestão total ( $12,1 \pm 0,8 \text{ g kg}^{-1}$ ). Nesse caso, foi obtida uma recuperação de 98%.

$$P_{total} = P_{lipídio} + P_{residual} \text{ (Eq 1.1)}$$

#### ***1.4.2 Correção de sinal***

A introdução direta de solventes orgânicos no plasma pode resultar em severos efeitos de matriz. Portanto, o desenvolvimento de estratégias que permitam minimizar esses efeitos é importante para alcançar resultados precisos e exatos. Na literatura não há trabalhos que avaliem os efeitos desses solventes no plasma de nitrogênio. No entanto em outras técnicas com fonte de plasma como ICP OES e ICP-MS, esses efeitos se apresentaram críticos. Wiltsche e Tirk<sup>95</sup> investigaram o efeito de metanol no plasma de argônio em ICP OES. Como resultado, a presença de  $\text{CH}_3\text{OH}$  aumentou a temperatura do plasma e reduziu seu tamanho. Além disso, verificou-se severos efeitos de matriz, como aumento do sinal para todos os analitos estudados, tais como o Se, S e Ta. Em ICP-MS, a introdução de amostras hidro-orgânicas também pode ocasionar a deposição de carbono no cone de amostragem e bloqueio do orifício de passagem dos íons.<sup>96,97</sup>

Em MIP OES, há uma possibilidade de utilizar um módulo de controle de gás externo (EGCM, *External gas control module*). Esse aparato permite a injeção de ar no plasma, o que confere maior estabilidade durante a análise e evita a deposição de carbono na tocha, portanto aumentando o seu tempo de vida útil.<sup>98,99</sup> O oxigênio presente no ar sob alta temperatura reage

com as espécies de carbono, produzindo CO<sub>2</sub> e CO.<sup>98</sup> O EGCM tem sido descrito em diversos trabalhos, especialmente para amostras com alto teor orgânico. A Tabela 1.2 descreve os principais trabalhos encontrados na literatura que empregaram esse módulo.

O módulo EGCM pode ser operado sob três vazões: baixa (0,5 L min<sup>-1</sup>), média (0,75 L min<sup>-1</sup>) e alta (1,0 L min<sup>-1</sup>). O fluxo alto foi inicialmente investigado. No entanto, não foi possível obter a linearidade nas curvas de calibração para o fósforo. Portanto, as análises foram conduzidas no fluxo médio.

**Tabela 1.2. Trabalhos reportados na literatura que utilizaram o EGCM durante a análise por MIP OES**

<b>Amostra</b>	<b>Analitos</b>	<b>EGCM (L min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
<b>Gasolina e etanol</b>	Cr, Ni, Pb e V	1,0	100
<b>Água</b>	Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn	0,5	101
<b>Diesel e biodiesel</b>	Si	0,75	98
<b>Tortilha de milho</b>	As	0,75	102
<b>Metanol</b>	Ca, K, Mg e Na	1,0	99
<b>Petróleo</b>	Ca, Fe, K, Na, Ni e V	0,5	103
<b>Queijo</b>	Ca, K e Mg	0,5 – 0,75	36
<b>Tecido vegetal e fertilizante</b>	Si	1,0	104
<b>Biodiesel</b>	Ca, K, Mg e Na	0,75	28

### 1.4.3 Padronização Interna

A utilização da padronização interna com Co e Te foi investigada para melhorar a exatidão. Essa seleção foi baseada nos comprimentos de onda e na energia de excitação similares ao do analito. Nesse caso, as energias de excitação são 7,21 eV (P), 5,78 eV (Te) e 4,07 (Co). Inicialmente, empregou-se uma solução composta de 1 mg L<sup>-1</sup> de fósforo, telúrio e cobalto em metanol para um teste de estabilidade por aproximadamente 1 h. Os sinais obtidos para o P foram corrigidos pelos padrões internos (Fig 1.2) e foram normalizados pelo maior valor obtido durante a análise.

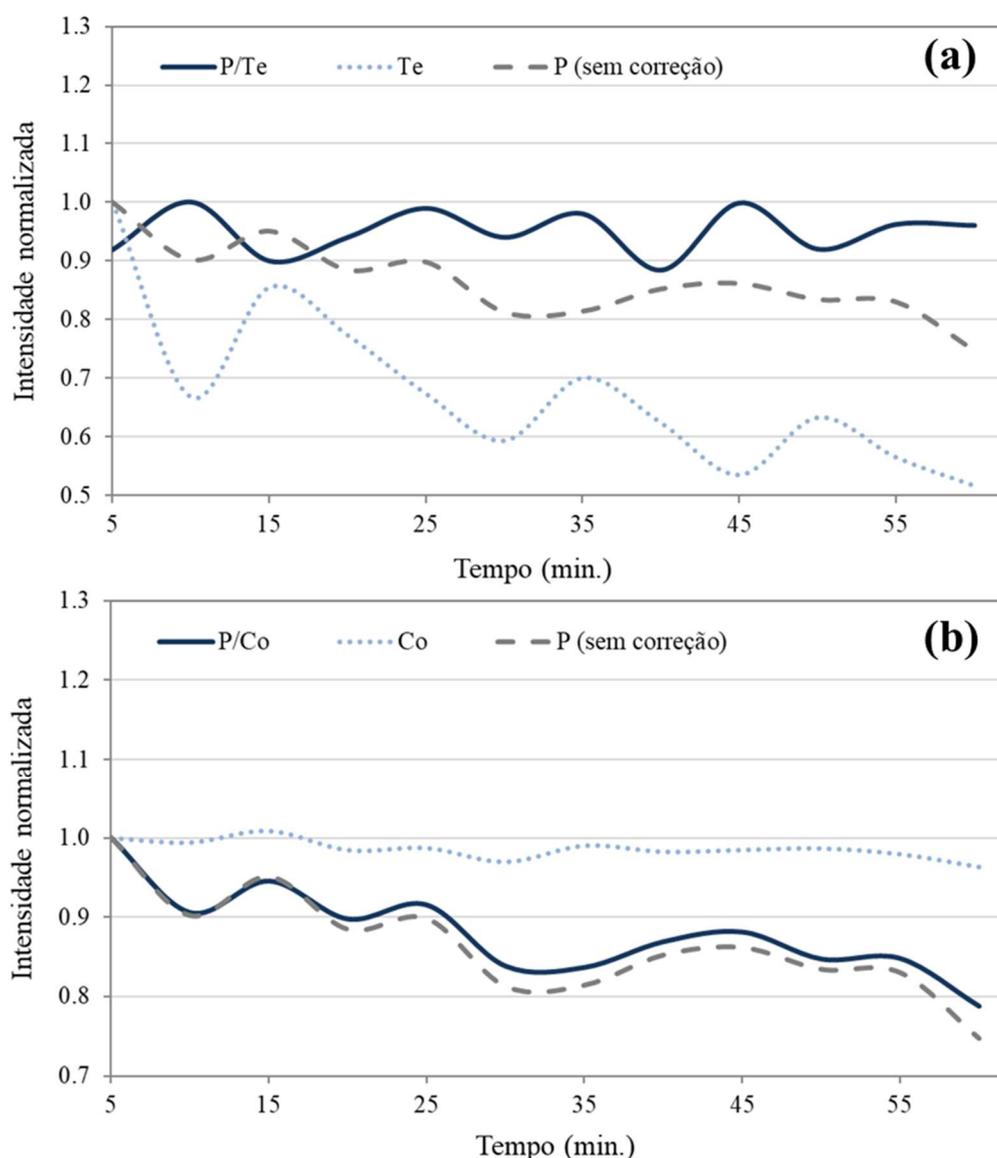


Figura 1.2. Gráficos de estabilidade (60 min) para o sinal de fósforo sem correção e corrigido pelo Te (a) e Co (b)

Observou-se que sem a correção do sinal, a variação para o fósforo foi de aproximadamente 25%, provavelmente devido às flutuações instrumentais. Por outro lado, houve uma minimização dos desvios com a correção pelo Te, sendo observadas variações até 9%). Adicionalmente, observou-se que o sinal do Co se manteve estável durante todo o período, portanto, sua correção não foi eficiente. Dessa forma, apenas o Te foi aplicado como padrão interno. Os resultados foram também comparados a calibrações convencionais como adição de analito (SA) e calibração externa (Tabela 1.3). Deve-se ressaltar que as soluções padrão para calibração externa foram preparadas em meio de metanol, com a finalidade de se compatibilizar a matriz.

**Tabela 1.3. Valores do P determinados na fração lipídica empregando a padronização interna, adição de analito e calibração externa.**

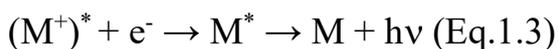
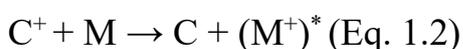
	<b>P<sub>lipídio</sub> (mg / 100 g amostra)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Padronização Interna (Te)</b>	21,1 ± 0,5	95
<b>Adição de Analito</b>	21,0 ± 0,6	95
<b>Calibração externa</b>	93,0 ± 4,9	420

**\*Valor de referência obtido por cromatografia iônica: 22,2 ± 1,5 mg / 100 g amostra**

Como previsto, a calibração externa apresentou uma recuperação insatisfatória. Isso pode ser explicado pela análise de uma amostra complexa, com alto teor de carbono, o que resulta em críticos efeitos de matriz e flutuações instrumentais. Esse fato pode ser confirmado por uma comparação dos coeficientes angulares obtidos para calibração externa e adição de analito. Aplicando-se uma razão entre os coeficientes angulares

dessas calibrações, observa-se um valor de 2,7, o que representa um aumento no sinal analítico devido a presença da matriz.

Alguns trabalhos investigaram o efeito do carbono no sinal analítico do fósforo. De acordo com Grindlay et al.<sup>105</sup>, o fósforo pode participar da reação de transferência de carga com espécies de carbono ( $C^+$ ,  $C_2^+$  e  $ArC^+$ ) no ICP-MS. Esse processo é caracterizado pelas reações descritas nas Eq. 1.2 e 1.3. Nesse sentido, devido à transferência de carga e o processo de recombinação íon-elétron, a população de átomos excitados aumenta.<sup>105,106</sup>

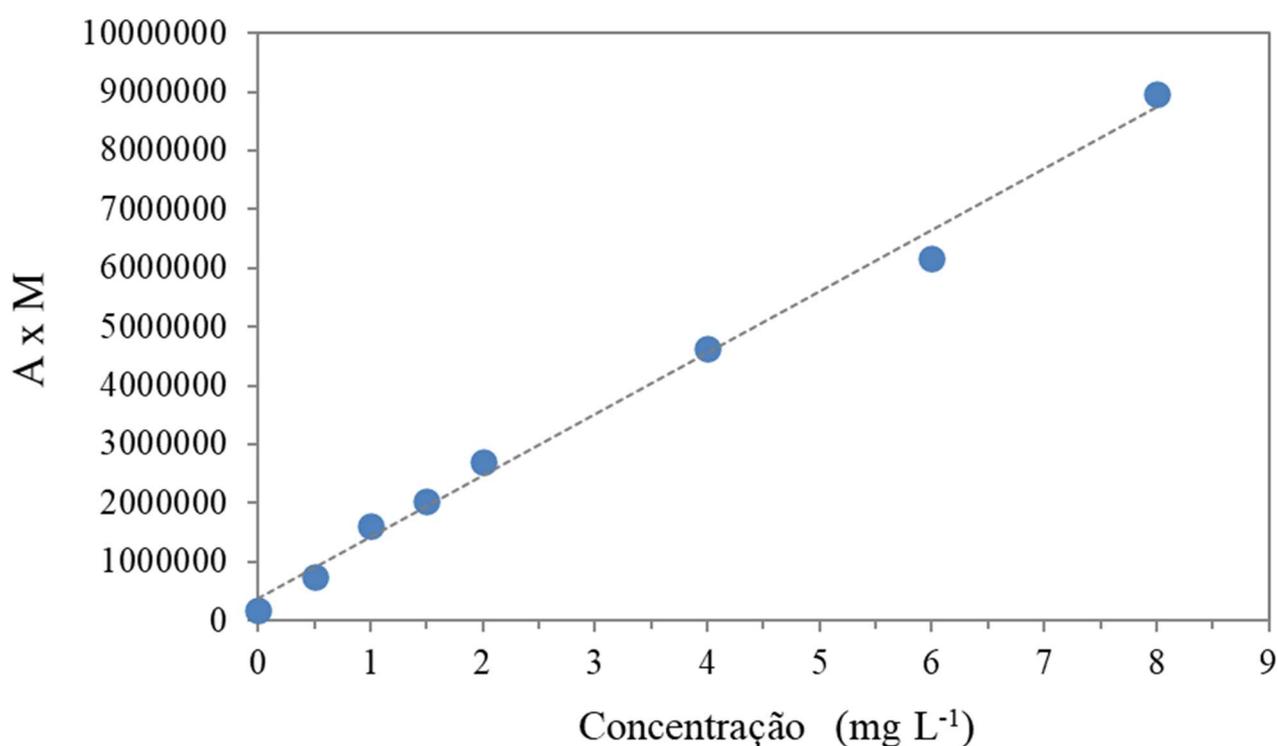


#### ***1.4.4 Espécies moleculares***

Conforme descrito anteriormente, bandas de espécies moleculares podem ser observadas em um espectro do MIP OES, devido à presença de moléculas neutras, iônicas ou radicalares.<sup>24,28,45</sup> Nesse trabalho, duas espécies moleculares foram avaliadas para correção de sinal, sendo elas  $N_2^+$  (0-0,  $B^2 \Sigma_u^+ \rightarrow X^2 \Sigma_g^+$ ) e OH (0-0,  $A^2 \Sigma^+ \rightarrow X^2 \pi_i$ ). Em MIP OES, essas espécies podem ser monitoradas em 391,4 e 309 nm, respectivamente. Nesse caso, durante a análise, selecionou-se os elementos térbio (Tb) e nióbio (Nb) e a intensidade do sinal máximo da banda foi ajustada manualmente.

Para a correção de sinal empregou-se dois tratamentos, o primeiro consiste na divisão do sinal do analito (A) pela espécie molecular (M), enquanto o segundo foi a multiplicação do sinal analítico (A) pela espécie molecular (M).<sup>28,45</sup> Esses dois tratamentos foram adotados com base

na premissa que os efeitos no plasma podem afetar diferentemente a espécie molecular e o analito. Ademais, a curva de calibração foi construída com os valores dos tratamentos A/M ou A x M no eixo  $y$  e as concentrações no eixo  $x$ . Da mesma forma que na calibração externa, as soluções padrão foram preparadas em meio de metanol. Na Fig 1.3 é representada uma curva de calibração utilizada para espécies moleculares.



**Figura 1.3. Curva de calibração obtida utilizando a correção de sinal com a espécie molecular**

As recuperações obtidas utilizando a correção de sinal com as espécies moleculares são apresentadas na Tabela 1.4. Observa-se que a melhor exatidão foi obtida por meio do emprego da espécie molecular OH e com o tratamento A x M. Nesse caso, a recuperação foi 94%. Essa correção possui vantagens quando comparada a outros métodos de calibração, pois não é requerido o preparo de novas soluções. Adicionalmente, não há necessidade de um estudo sistemático para a seleção de um elemento, como

ocorre com o padrão interno. Outra vantagem associada a essas espécies é que as mesmas podem ser monitoradas em tempo real durante a análise. Portanto, um diagnóstico do plasma pode ser obtido por meio da razão  $N_2^+/OH$  e interferências associadas ao sistema de introdução de amostra ou alguma interferência espectral serem facilmente corrigidas.

**Tabela 1.4. Determinação do P na fração lipídica empregando OH e  $N_2^+$  para a correção de sinal**

Espécie molecular	$P_{lipídeo}$ (mg / 100 g amostra)		Recuperação (%)	
	A x M	A / M	A x M	A / M
$N_2^+$	$28,0 \pm 3,1$	$189,1 \pm 4,0$	126	851
OH	$21,0 \pm 1,2$	$51,3 \pm 8,53$	94	231

\*Valor de referência obtido por cromatografia iônica:  $22,2 \pm 1,5$  mg / 100 g amostra

Para avaliar os efeitos do metanol na intensidade das bandas moleculares, foram analisadas soluções de  $HNO_3$  1% ( $m v^{-1}$ ) em meio aquoso e de metanol 10% e 100% ( $v v^{-1}$ ). Os espectros obtidos nessas regiões são apresentados na Fig. 1.4. Observa-se que a presença do metanol no plasma aumenta consideravelmente a intensidade do OH e  $N_2^+$ .

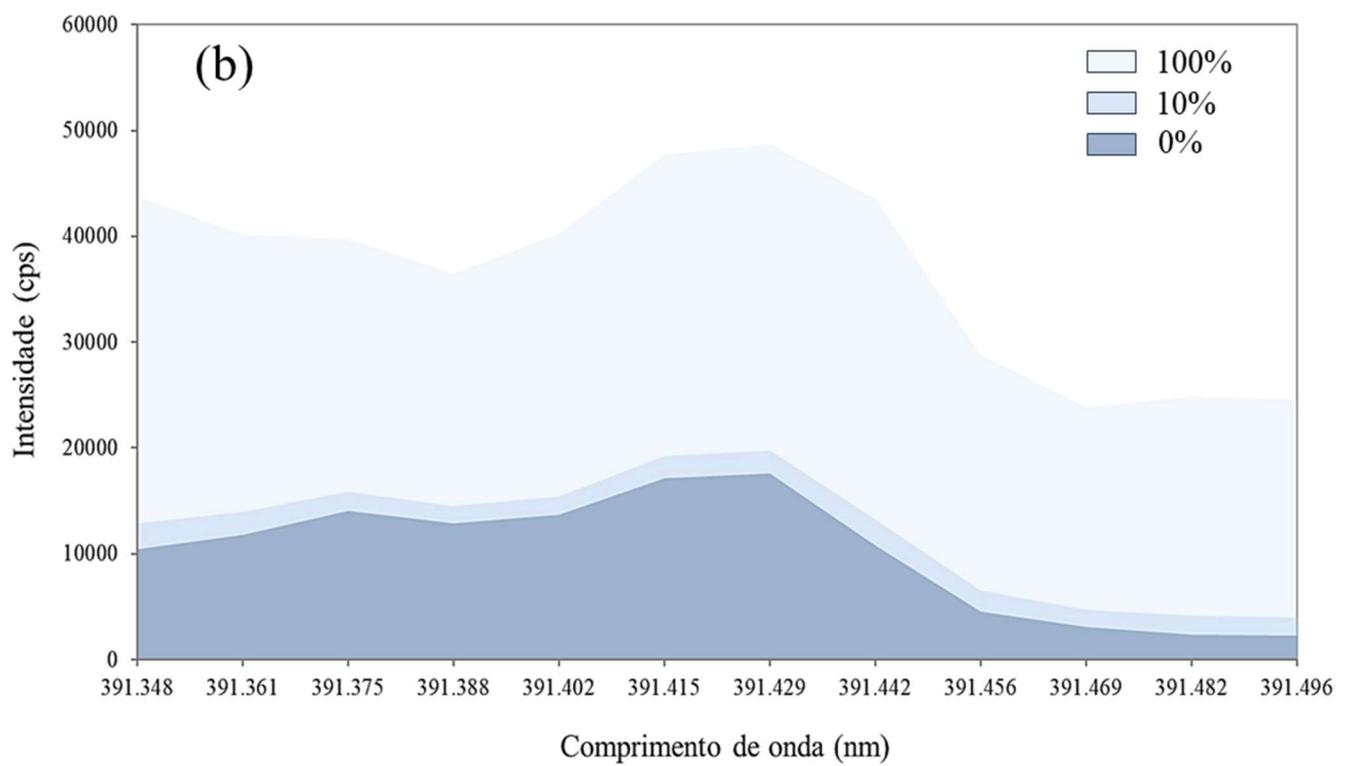
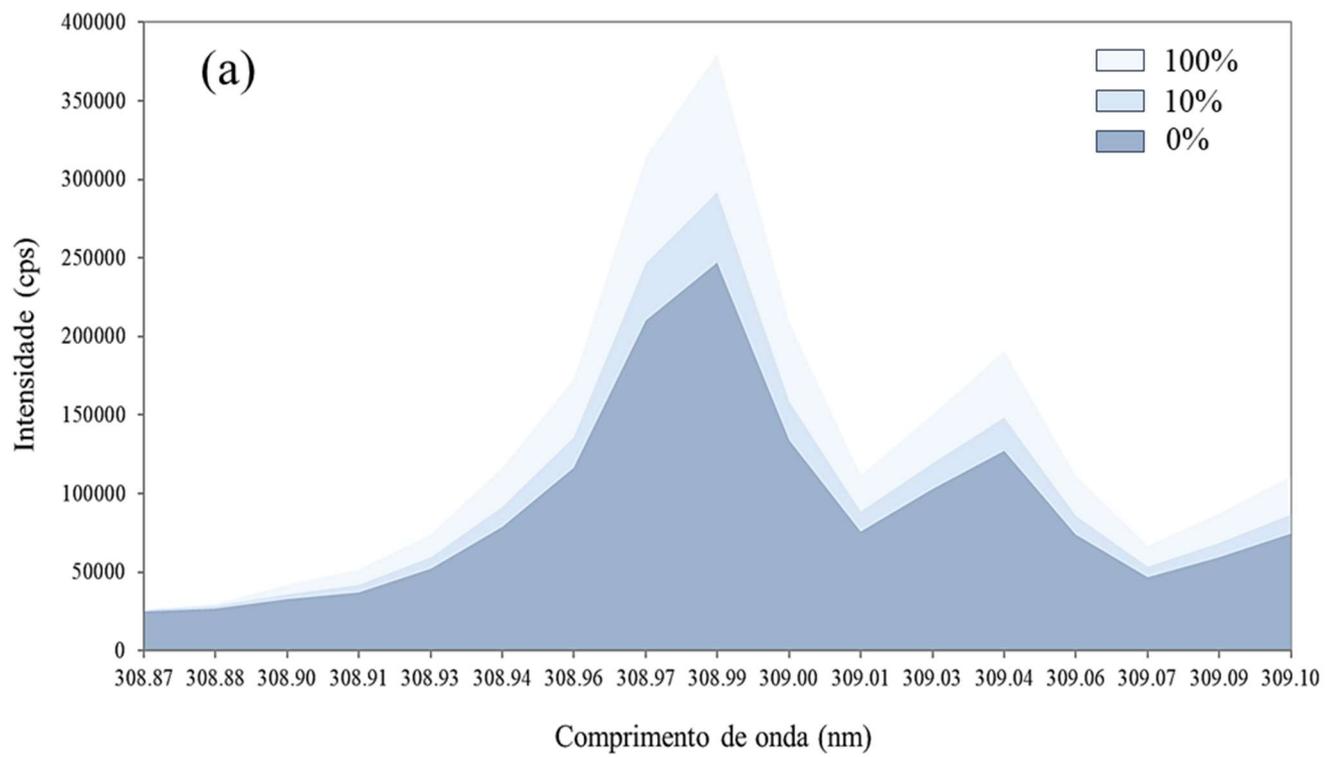


Figura 1.4. Efeito do metanol na emissão das bandas moleculares. (a) OH) e (b) N<sub>2</sub><sup>+</sup>

### **1.4.5 Aplicação a amostras reais e Limite de detecção**

A aplicação das correções de sinal foi avaliada em amostras de carne bovina, ovina, frango e peixe (Tabela 1.5). Nesse caso, os lipídios foram extraídos conforme o procedimento descrito anteriormente e o EGCM foi operado no valor médio de vazão. Os resultados obtidos para as duas estratégias são similares.

**Tabela 1.5. Determinação do P na fração lipídica em amostras de carne empregando OH e Te como corretores de sinal**

<b>Amostra</b>	<b>P<sub>lipídica</sub> (mg / 100 g amostra)</b>	
	<b>OH</b>	<b>Te</b>
<b>Frango</b>	28,7 ± 1,5	29,3 ± 2,5
<b>Bovino</b>	14,6 ± 0,6	15,3 ± 2,2
<b>Ovino</b>	24,8 ± 0,7	27,0 ± 1,5
<b>Ovino (Carcaça)</b>	11,3 ± 1,1	12,2 ± 1,4
<b>Peixe</b>	17,6 ± 0,9	19,5 ± 0,53

Os limites de detecção (LOD) foram estimados de acordo recomendado pela IUPAC. Nesse caso, o cálculo foi feito como três vezes o desvio padrão do branco dividido pela inclinação da curva (coeficiente angular da curva analítica). Os limites de detecção obtidos para as duas estratégias de correção de sinal são apresentados na Tabela 1.6. Os valores encontrados para padronização interna e espécies moleculares foram próximos.

**Tabela 4.6. Limites de detecção obtidos empregando OH e Te**

<b>Correção de sinal</b>	<b>Tratamento de dados</b>	<b>LOD (mg / 100 g Amostra)</b>
OH	$I_{\text{branco}} \times I_{\text{OH}}$	2,5
Te	$I_{\text{branco}} / I_{\text{Te}}$	2,7

## **1.5 Conclusões parciais**

A análise de fósforo a partir dos fosfolipídios por MIP OES foi possível por meio de uma diluição simples em metanol e aplicação de correção de sinal. Esses resultados indicam novas aplicações para essa técnica, além de torná-la como um método alternativo aos procedimentos cromatográficos. Nesse contexto, o uso da padronização interna (Te) e das espécies moleculares (OH) foi efetivo para minimizar os efeitos de matriz e as flutuações instrumentais e, dessa forma, aumentar a exatidão. Portanto, com essas estratégias foi possível aumentar a frequência analítica, pois após a extração dos lipídios, nenhuma etapa adicional é necessária. A aplicação das espécies moleculares possui vantagens em relação aos métodos tradicionais, como não ser requerido o preparo de novas soluções (adição de novos analitos à amostra). Ademais, como demonstrado por Williams et al.<sup>28</sup>, as espécies moleculares também podem ser empregadas para um diagnóstico do plasma durante uma análise.

## **Capítulo 2**

---

*Microextração líquido-líquido dispersiva  
como estratégia para determinação de  
molibdênio em carnes por MIP OES*

## 1.1 INTRODUÇÃO

O molibdênio (Mo) é um elemento essencial para saúde humana. De acordo com *US Food and Nutrition Board (FBN)* a ingestão diária recomendada desse elemento é 17 µg para crianças com idade entre 1 e 3 anos, 45 µg para adultos e 50 para gestantes e lactantes.<sup>107</sup> No organismo, o Mo atua como cofator de importantes enzimas, tais como nitrato redutase, xantina desidrogenase, aldeído oxidase e sulfito oxidase. Por outro lado, estudos realizados em animais verificaram que a alta concentração de molibdênio resulta em uma deficiência de cobre.<sup>11,108,109</sup> A ocorrência desse elemento está associada aos processos industriais, tais como indústria metalúrgica, pigmentos e lubrificantes. Ademais, o Mo é comumente adicionado em fertilizantes.<sup>108</sup>

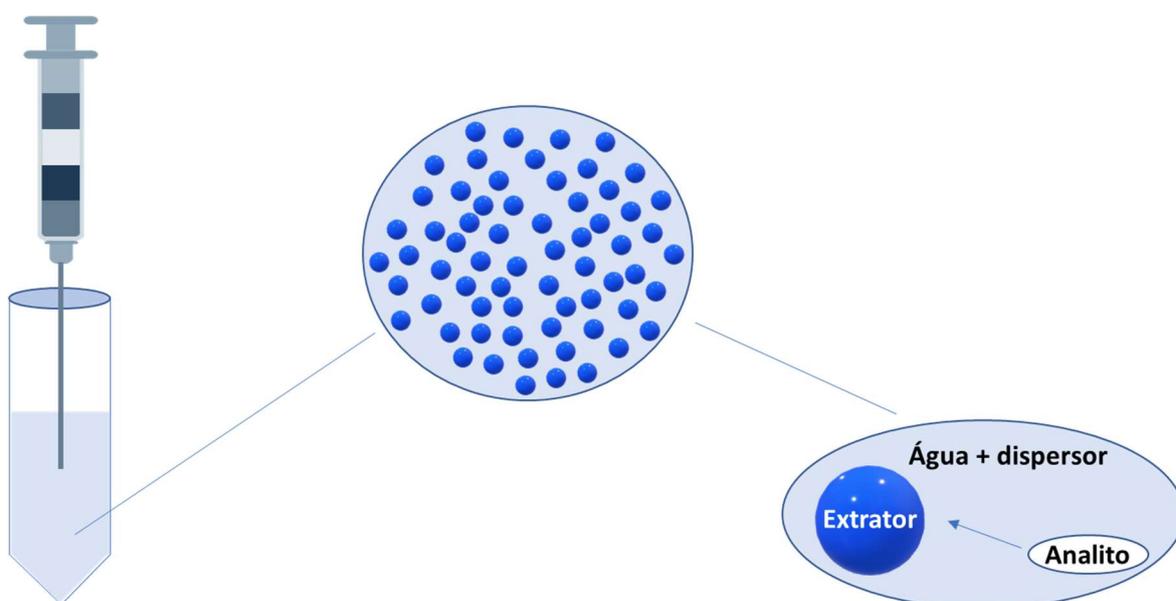
Nas carnes, apesar do Mo ser encontrado em baixas concentrações, esse alimento é considerado como fonte desse elemento. A quantidade de Mo que pode ser encontrado varia de acordo com a raça do animal, bem como o tipo de alimentação.<sup>110</sup> Nesse contexto, há vários estudos que objetivam o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de Mo em carne. A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é uma dessas técnicas.<sup>111</sup> Isso se deve principalmente à sua alta sensibilidade, no entanto, o seu elevado custo de aquisição e operação limita sua aplicação rotineira.<sup>17,49</sup>

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas opera com um plasma de nitrogênio. O uso do N<sub>2</sub> resulta em uma significativa redução de custo quando comparado ao argônio. Ademais, nessa técnica há a opção de se empregar um gerador de nitrogênio, o qual dispensa a aquisição de recargas de cilindro de gases.<sup>24</sup> Por outro lado, essa técnica é caracterizada por ser mais susceptível aos efeitos de matriz por causa da baixa temperatura do plasma (5000 K), o que adicionalmente, leva

a uma menor sensibilidade <sup>23,37</sup> Nesse contexto, muitos trabalhos têm investigado estratégias que permitam minimizar essas limitações e, dessa forma, ampliar a aplicabilidade do MIP OES. Sistemas alternativos de introdução de amostras como o vapor frio (CV) e a geração de hidretos (HG) foram propostos para aumentar a sensibilidade.<sup>40,112,113</sup>

Os métodos de pré-concentração também vêm sendo explorados para o aumento da sensibilidade no MIP OES. A extração líquido-líquido foi proposta para a determinação de Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn em água, com o emprego de um sistema bifásico composto por brometo de tetrahexilamônio. Os limites de detecção obtidos por esse método variaram de 0,06 (Cu) a 4,9 (Co)  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>101</sup> O uso da extração em fase sólida para a determinação de contaminantes em carne foi avaliado por Sá et al.<sup>21</sup>. Os autores utilizaram um material composto de sílica durante a etapa de preparo de amostras e os fatores de pré-concentração variaram de 6 (Hg) a 26 (Cu e Zn).Recentemente, Moreira et al.<sup>109</sup> aplicaram a co-precipitação com o hidróxido de magnésio para a determinação de As (V), Cd (II), Cr (III), Co (II), Cu (II), Mn(VII), Hg(II), Ni(II), V(V) em amostras de peixes e crustáceos.<sup>114</sup>

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma estratégia descrita na literatura e comumente utilizada para o aumento da sensibilidade.<sup>115,116</sup> Esse tipo de pré-concentração tem sido utilizado para diversas técnicas, como espectrometria de absorção atômica em chama e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.<sup>117,118</sup> A DLLME consiste na aplicação de um conjunto de solventes extrator, dispersor e complexante. Geralmente, o extrator é insolúvel no meio da amostra, portanto é requerido um complexante para tornar o analito solúvel. O solvente dispersor é utilizado para criar uma interface entre o extrator e a amostra. A Fig. 2.1 demonstra como um sistema de DLLME é composto.



**Figura 2.1. Representação da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)**

As vantagens da microextração líquido-líquido dispersiva consistem em ser um método simples e no baixo consumo de reagentes.<sup>116,119</sup> Serrano et al.<sup>120</sup> investigaram o uso do DLMME para análise de Cd em água por MIP OES. Os autores avaliaram o clorofórmio e solventes supramoleculares (1-decanol e tetraidrofurano) como solventes extratores. Adicionalmente, estudos fundamentais para avaliar os efeitos de matriz no plasma de nitrogênio foram realizados.

## **2.1 OBJETIVOS**

Esse capítulo teve como objetivo avaliar a combinação da microextração líquido-líquido dispersiva e o MIP OES para determinação de molibdênio em carne de ovinos. Para esse estudo, foi empregado o planejamento de misturas para a seleção dos solventes extrator e dispersor. Ademais, o uso do planejamento experimental Box-Behnken foi explorado para estabelecer as condições ótimas da DLLME.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Equipamentos

Os experimentos foram realizados empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (4200 MP-AES, *Agilent Technologies*, Melbourne, Austrália). Em conjunto a esse equipamento, foi utilizado um gerador de nitrogênio (*Agilent Technologies*, modelo 4107, Melbourne, Austrália). A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (IPC-MS) foi utilizada para obter resultados de referência. Um ICP-MS (Modelo 7800, *Agilent Technologies*, Melbourne, Austrália), equipado com uma cela pressurizada como Hélio 99.9% de pureza (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil). Os parâmetros instrumentais empregados para o MIP OES e ICP-MS são apresentados na Tabela 2.1. A digestão das amostras de carne foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Itália).

**Tabela 2.1. Parâmetros operacionais do MIP OES e ICP-MS para determinação de Mo em carne.**

<b>MIP OES</b>	<b>Condições operacionais</b>
Frequência de operação (MHz)	2450
Potência de operação	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,5
Posição de observação do plasma	-30
Tempo de estabilização (s)	10
Correção de fundo	Auto
Tempo de integração (s)	3
Nebulizador	OneNeb series 1
EGCM	Médio (0,75 L min <sup>-1</sup> )
Câmara de nebulização	Ciclônica, duplo passo
Comprimento de onda	379,8 nm
<b>ICP-MS</b>	<b>Condições operacionais</b>
Potência RF (kW)	1550
Profundidade de amostragem (mm)	10
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,42
Velocidade da bomba de nebulização (rps)	0,1
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de integração (s)	0,3
Gás makeup/diluição (L min <sup>-1</sup> )	0,6
Vazão do gás He (mL min <sup>-1</sup> )	4,5
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott, duplo passo
Razão m/z	98

### ***2.2.2 Amostras, soluções e reagentes***

Água desionizada obtida pelo sistema de purificação (resistividade > 18, Milli-Q™, Millipore, Bedford, MA, EUA) foi empregada para o preparo das soluções. Para a digestão ácida, empregou-se ácido nítrico (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) previamente purificado por subdestilação (Milestone, Itália) e peróxido de hidrogênio 30 % m v<sup>-1</sup> (Synth,).

Os seguintes solventes foram empregados nesse trabalho: Acetona (99,5%, Qhemis, Jundiaí, SP, Brasil), acetonitrila (99,8%, Merck, Darmstadt, Alemanha), metanol (99,8%, Quimex, São Paulo, SP Brasil), etanol (99,5%, Labsynth), tetracloreto de carbono (99,8%, Merck), tricloroetileno (99,5%, Neon, Suzano, SP, Brasil) e clorofórmio (99,8%, Labsynth). As soluções padrão de Mo foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Qhemis São Paulo, Brasil).

O material de referência certificado de fígado bovino (Bovine liver, 1577c, NIST, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA) foi utilizado para avaliar a exatidão do método. Seis amostras de carne ovina foram obtidas em mercados locais de São Carlos (São Paulo, Brasil). Essas amostras foram liofilizadas e moídas em um moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, Brasil).

### ***2.2.3 Preparo de amostra***

Massas de 100 mg de amostras de carne foram digeridas em meio 8 mL de ácido nítrico (4,2 mol L<sup>-1</sup>) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m v<sup>-1</sup>). A digestão foi realizada em um forno com cavidade assistido por radiação micro-ondas. O programa de aquecimento consistiu em uma rampa por 20 min até atingir 200 °C e um patamar de 20 min em 200 °C.

Após o resfriamento, as amostras foram transferidas para um tubo tipo Falcon e o volume foi ajustado para 30 mL com água.

#### ***2.2.4 Seleção dos solventes extrator e dispersor***

Para a escolha dos solventes extrator e dispersor foi realizado um experimento de mistura. Nesse caso, avaliou-se como solventes dispersores metanol, acetonitrila e acetona. Para solventes extratores, foram investigados clorofórmio, tetracloreto de carbono e tricloroetileno. Uma solução de Mo (10 µg/L) foi utilizada. Em todos os experimentos, o pH foi ajustado para 3,8 com 0,1 mL de tampão acetato (1,0 mol L<sup>-1</sup>). A 8-hidroxiquinolina (1% m v<sup>-1</sup>) foi utilizada como agente complexante e, nesse caso, foi adicionado 0,1 mL. Como resposta selecionou-se a intensidade de sinal do Mo no MIP OES. Os níveis estudados e os respectivos volumes para os solventes para esse planejamento são apresentados na Tabela 2.2.

#### ***2.2.5 Otimização dos parâmetros experimentais da DLLME***

Os parâmetros da microextração líquido-líquido dispersiva como pH, volume do solvente dispersor e extrator e concentração do agente complexante foram otimizados por meio de um planejamento Box-Behnken. Nesse caso, o planejamento foi construído em três níveis (-1, 0 e 1), dessa forma totalizando 27 experimentos (Tabela 2.3).

#### ***2.2.6 Microextração líquido-líquido dispersiva***

Para a extração do Mo, 10 mL da amostra digerida foram utilizados. Em seguida, o pH foi ajustado para 3,8 com tampão acetato e 0,1 mL de 8-hidroxiquinolina (1% m v<sup>-1</sup>) foi adicionado. Uma solução contendo o solvente extrator e dispersor foi rapidamente injetada por uma seringa. As fases foram separadas empregando centrifugação (3000 rpm) por 3 min. A fase orgânica contendo o analito foi coletada com uma micropipeta e o volume foi ajustado para 500 µL com metanol.

**Tabela 2.2. Níveis estudados e seus respectivos volumes utilizados nos planejamentos de mistura.**

	Níveis estudados			
Solvente extrator	0	0,3	0,5	1
Tetracloroeto de carbono ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100
Tricloroetileno ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100
Clorofórmio ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100
Solvente dispersor	0	0,3	0,5	1
Acetonitrila ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100
Metanol ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100
Acetona ( $\mu\text{L}$ )	0	33,33	50	100

**Tabela 2.3. Planejamento experimental Box-Behnken empregado para otimização da DLLME.**

Experimento	pH	Concentração de [8-HQ] (mmol L <sup>-1</sup> )	Dispersor (μL)	Extrator (μL)
1	2,5 (-1)	0,344 (-1)	500 (0)	125 (0)
2	2,5 (-1)	1,72 (1)	500 (0)	125 (0)
3	5,5 (1)	0,344 (-1)	500 (0)	125 (0)
4	5,5 (1)	1,72 (1)	500 (0)	125 (0)
5	4,0 (0)	1,03 (0)	250 (-1)	50 (-1)
6	4,0 (0)	1,03 (0)	250 (-1)	200 (1)
7	4,0 (0)	1,03 (0)	750 (1)	50 (-1)
8	4,0 (0)	1,03 (0)	750 (1)	200 (1)
9	2,5 (-1)	1,03 (0)	500 (0)	50 (-1)
10	2,5 (-1)	1,03 (0)	500 (0)	200 (1)
11	5,5 (1)	1,03 (0)	500 (0)	50 (-1)
12	5,5 (1)	1,03 (0)	500 (0)	200 (1)
13	4,0 (0)	0,344 (-1)	250 (-1)	125 (0)
14	4,0 (0)	0,344 (-1)	750 (1)	125 (0)
15	4,0 (0)	1,72 (1)	250 (-1)	125 (0)
16	4,0 (0)	1,72 (1)	750 (1)	125 (0)
17	2,5 (-1)	1,03 (0)	250 (-1)	125 (0)
18	2,5 (-1)	1,03 (0)	750 (1)	125 (0)
19	5,5 (1)	1,03 (0)	250 (-1)	125 (0)
20	5,5 (1)	1,03 (0)	750 (1)	125 (0)
21	4,0 (0)	0,344 (-1)	500 (0)	50 (-1)
22	4,0 (0)	0,344 (-1)	500 (0)	200 (1)
23	4,0 (0)	1,72 (1)	500 (0)	50 (-1)
24	4,0 (0)	1,72 (1)	500 (0)	200 (1)
25	4,0 (0)	1,03 (0)	500 (0)	125 (0)
26	4,0 (0)	1,03 (0)	500 (0)	125 (0)
27	4,0 (0)	1,03 (0)	500 (0)	125 (0)

## 2.3 RESULTADOS

### *2.3.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor e otimização do DLLME*

A escolha dos solventes dispersor e extrator na DLLME influenciam criticamente a etapa de microextração devido a suas propriedades físico-químicas. O solvente extrator ideal deve possuir uma alta afinidade com o complexo formado com o analito. Por outro lado, o solvente dispersor deve criar uma interface entre o solvente extrator e a fase aquosa contendo a amostra. Nesse contexto, a seleção dos solventes dispersor e extrator foi baseada nos resultados do planejamento de mistura. Os diagramas ternários apresentados nas Fig. 2.2 e 2.3 foram construídos a partir das respostas (intensidade de Mo). Os resultados obtidos indicaram que tetracloreto de carbono e o tricloroetileno, na forma pura, possuíram o melhor desempenho como solventes extratores. Para o solvente dispersor, observa-se que a maior intensidade foi encontrada com o metanol. Portanto, o tetracloreto de carbono e o metanol foram selecionados para os próximos experimentos.

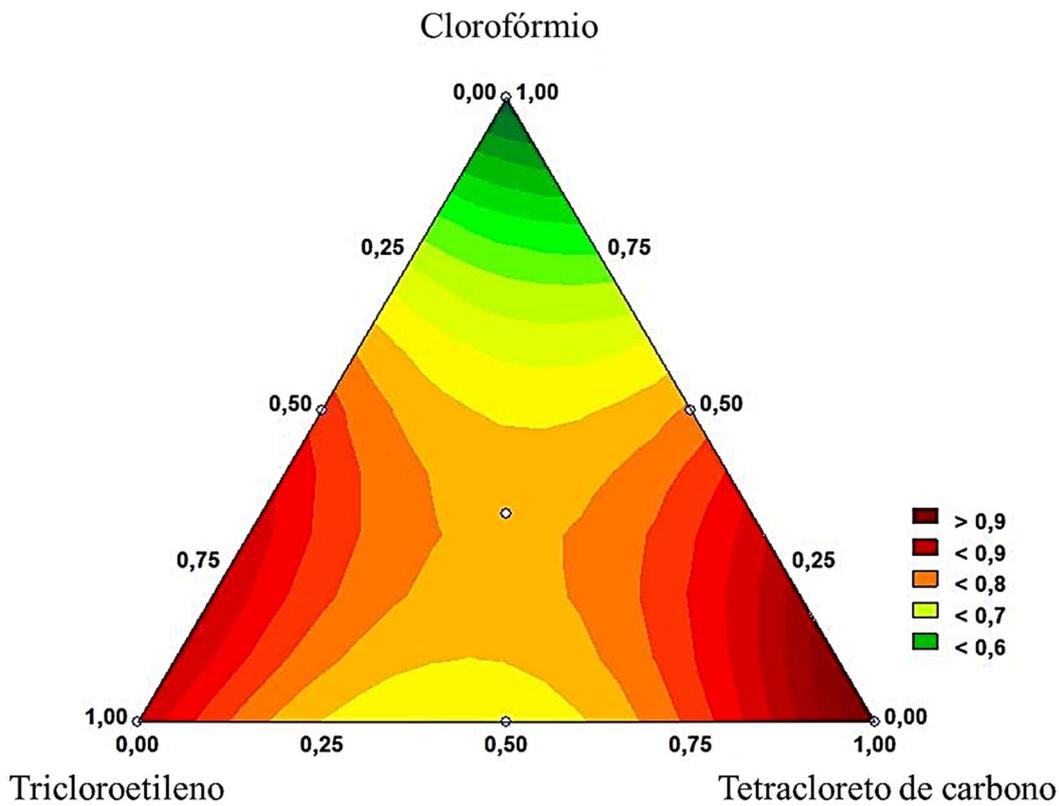


Figura 2.2. Superfície de resposta obtida para os planejamentos de mistura para seleção do solvente extrator.

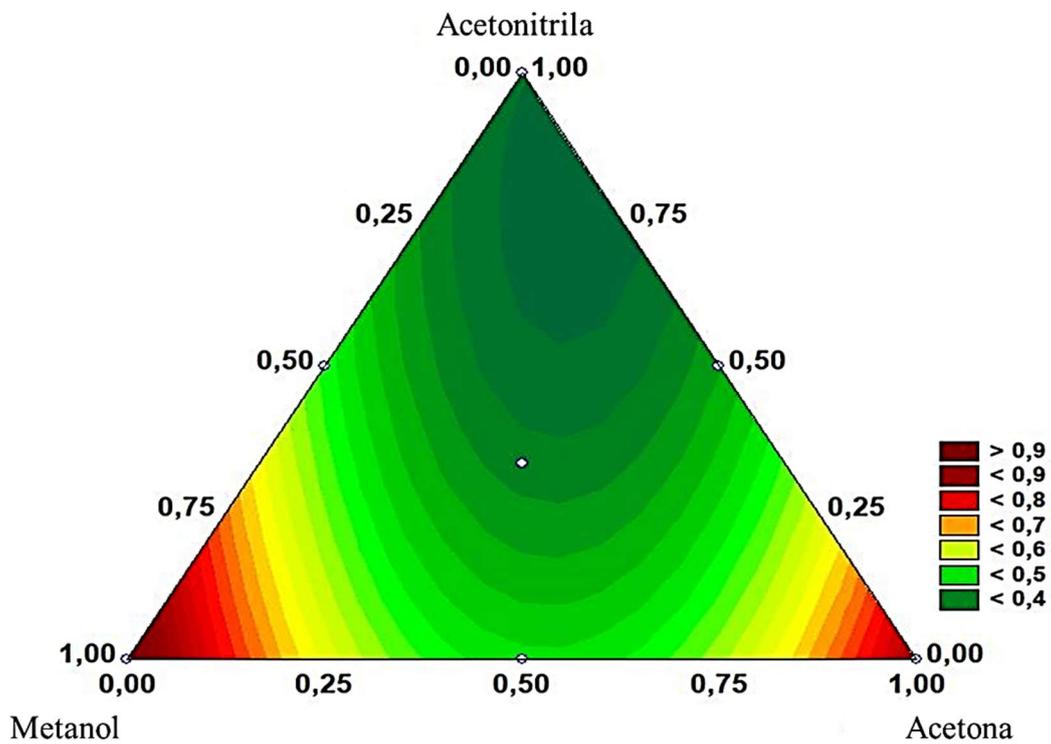


Figura 2.3. Superfície de resposta obtida para os planejamentos de mistura para seleção do solvente dispersor.

Os parâmetros (pH, concentração e volumes dos solventes dispersor e extrator) podem afetar o desempenho da DLLME, portanto uma otimização foi realizada aplicando o planejamento experimental Box-Behnken.<sup>115</sup> No ponto central foram realizadas três replicatas. Nesse sentido, a intensidade do Mo foi selecionada como resposta e um modelo matemático, descrito pela equação de segunda ordem (Eq. 2.1), foi obtido. Os parâmetros [8-HQ], DV e EV representam a concentração do complexante, o volume do solvente dispersor e o volume do extrator, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Intensidade} = & 6803,5 \pm 62,1 + 2284,7 \pm 33,8 (\text{pH}) - 3133,9 \pm 51,6 (\text{pH})^2 + 823,4 \pm \\ & 32,6 ([8\text{-HQ}]) + 2463,8 \pm 47,24 ([8\text{-HQ}])^2 + 624,7 \pm 47,2 (\text{DV})^2 + 2003,3 \pm 40,0 (\text{EV}) \\ & + 4996,2 \pm 52,1 (\text{EV})^2 - 587,4 \pm 56,5 (\text{pH} \times [8\text{-HQ}]) - 209,6 \pm 56,5 (\text{pH} \times \text{DV}) + \\ & 2243,8 \pm 89,3 (\text{pH} \times \text{EV}) - 552,67 \pm 56,5 ([8\text{-HQ}] \times \text{DV}) - 3546,7 \pm 56,5 ([8\text{-HQ}] \\ & \times \text{EV}) + 2035,6 \pm 56,5 (\text{DV} \times \text{EV}) \text{ (Eq. 2.1)} \end{aligned}$$

Por meio da análise do modelo, foi verificado que apenas o termo linear do volume do solvente dispersor não foi estatisticamente significativo. Adicionalmente, o sinal negativo em algumas interações dos parâmetros, por exemplo, pH e concentração do complexante, indicam que esses parâmetros devem ser aplicados em níveis opostos. A interação quadrática do pH também apresentou um sinal negativo, o que pode estar relacionado ao seu valor intermediário ser mais adequado para a formação do complexo Mo-8-HQ.

A análise de variância foi realizada a 95% de confiança e o coeficiente de correlação estimado foi 0,9. Portanto, isso indica uma satisfatória concordância entre os valores determinados e preditos pelo modelo. Ademais, os resíduos obtidos foram aleatórios e baixos. A resposta máxima foi determinada empregando o critério de Lagrange, sendo que a condição ótima estabelecida foi de pH igual a 3,8, 90 µL de tetracloreto de carbono, 480 µL de metanol e  $1,09 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do agente complexante.

### 2.3.2 Desempenho Analítico

Os parâmetros analíticos como fator de pré-concentração, coeficiente de determinação da curva analítica ( $R^2$ ), faixa linear e limite de detecção (LOD) do método proposto são apresentados na Tabela 2.4. O fator de enriquecimento foi calculado pela razão do coeficiente angular da curva com e sem pré-concentração. Adicionalmente, o limite de detecção foi calculado conforme recomendado pela IUPAC. Nesse caso, o desvio padrão ( $\sigma$ ) de dez réplicas autênticas do branco foi utilizado. O LOD foi calculado como três vezes o desvio padrão dividido pelo coeficiente angular da curva. A exatidão foi estimada empregando um material de referência de fígado bovino (NIST 1577c) com valor certificado de  $3,30 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$ . Nesse caso, o valor determinado foi  $3,03 \pm 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ , o que corresponde a uma recuperação de 92%.

Tabela 2.4. Parâmetros analíticos obtidos combinando DLLME e MIP OES.

Parâmetro	Valor
Curva de calibração	Intensidade = $174,74 [\text{Mo}, \mu\text{g L}^{-1}] + 191,78$
$R^2$	0,99
Faixa de trabalho	$0,6 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$
LOD	$0,20 \mu\text{g g}^{-1}$
Fator de enriquecimento	4,5

A tabela 2.5 mostra estudos descritos na literatura que empregaram a DLLME para análise de molibdênio. Verifica-se por comparação que o fator de pré-concentração obtido nesse trabalho (4,5), apesar de atingir o propósito estabelecido, foi inferior aos outros relatados na literatura. Isso pode estar associado ao uso de menor quantidade de amostra utilizada. Outra questão é o uso do módulo de controle de gás

externo (EGCM), o qual tem a função de introduzir ar no plasma. O uso do EGCM foi requerido devido a introdução direta de metanol no plasma. Nesse caso, esse módulo proporciona maior estabilidade ao plasma de nitrogênio, bem como o evita a deposição de carbono na tocha.<sup>98</sup> Por outro lado, a adição de outros gases no plasma, como o oxigênio, pode aumentar o sinal de fundo, devido a formação de espécies moleculares.<sup>121</sup> No entanto, deve-se ressaltar que com o emprego do EGCM não foi necessário realizar uma etapa adicional de preparo de amostra para a remoção do solvente orgânico, resultando em maior frequência analítica e menores riscos de perda, contaminação e erros experimentais. Outros autores chegaram a conclusões semelhantes. Santos et al.<sup>104</sup> utilizaram o EGCM como estratégia para minimizar os efeitos do sódio no plasma durante a determinação de Si em fertilizante. O valor do limite de detecção ( $0,40 \text{ g kg}^{-1}$ ) foi superior quando comparado a métodos que não utilizam a introdução de ar no MIP OES.

**Tabela 2.5. Procedimentos de pré-concentração descritos na literatura para a determinação de Mo**

<b>Amostra</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Fator de enriquecimento</b>	<b>LOD</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
<b>Carne e amostras agropecuárias</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva	200	0.03 <sup>a</sup>	ETAAS	122
<b>Bebida e alimento</b>	Microextração em Gota Orgânica Solidificada Assistida por Vórtex	133	0.01 <sup>b</sup>	GFAAS	123
<b>Planta</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva	246	17 <sup>a</sup>	ICP OES	124
<b>Água</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva	75	0.013 <sup>b</sup>	ETAAS	119
<b>Planta</b>	Microextração em Gota Orgânica Solidificada Assistida por Vórtex	67	4.9 <sup>b</sup>	FAAS	125
<b>Presente estudo</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva	4,5	200 <sup>a</sup>	MIP OES	-

a ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); b ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

**ETAAS** – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

**GFAAS** – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

**ICP OES** – Espectrometria de emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente

**FAAS** – Espectrometria de absorção atômica em chama

### ***2.3.3 Aplicações a amostras reais***

Seis amostras de carne ovina foram digeridas e analisadas pelo procedimento proposto de DLLME e MIP OES. Os resultados são apresentados na Tabela 5.7. Ademais, essas amostras também foram analisadas por ICP-MS. Aplicando um teste t, verifica-se que os resultados obtidos para as duas técnicas foram estatisticamente semelhantes. Portanto, isso também indica uma exatidão para o uso da microextração líquido-líquido dispersiva.

Nesse trabalho, as concentrações de molibdênio em amostras de carne ovina variaram de 1,66 a 2,37 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 2.6). MacLachan et al.<sup>111</sup> determinaram Mo em amostras de músculos de ovinos originários da Austrália. As concentrações encontradas situaram-se entre 0,006 – 0,20 mg kg<sup>-1</sup>. Marcano et al.<sup>5</sup> empregaram o ICP-MS e a estratégia de calibração multi-isotópica para a quantificação de Mo em carcaças de ovinos e os valores foram 0,58 mg kg<sup>-1</sup> e 0,30 mg kg<sup>-1</sup>. Machado e Tissot<sup>122</sup> determinaram Mo em amostras de carne bovina, sendo determinadas concentrações entre 8.7 - 14.2 µg kg<sup>-1</sup>. De acordo com os resultados obtidos e com os reportados na literatura, observa-se uma ampla faixa de concentração determinada. Isso pode ser explicado em razão de que os níveis de elementos na carne são diretamente influenciados pela produção animal. Portanto, fatores como dieta administrada, tipo de confinamento e grupos genéticos podem afetar os teores presentes de Mo na carne.

**Tabela 2.6. Teores de Mo determinados em amostras de carne de ovinos por DLLME-MIP OES e ICP-MS.**

<b>Amostra</b>	<b>DLLME - MIP OES (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>ICP-MS (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
<b>1</b>	2,37 $\pm$ 0,23	2,80 $\pm$ 0,21
<b>2</b>	2,08 $\pm$ 0,05	2,52 $\pm$ 0,01
<b>3</b>	1,69 $\pm$ 0,19	1,30 $\pm$ 0,02
<b>4</b>	1,92 $\pm$ 0,15	2,02 $\pm$ 0,13
<b>5</b>	2,10 $\pm$ 0,20	1,92 $\pm$ 0,09
<b>6</b>	1,66 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,24

## **2.4 Conclusões parciais**

O uso da microextração líquido-líquido dispersiva foi uma estratégia eficiente para aumentar a sensibilidade do método analítico. Nesse sentido, foi possível a determinação de molibdênio em amostras de carne. A combinação da DLLME e MIP OES resultou em um procedimento com exatidão satisfatória (recuperação 92%) e sensibilidade adequada para essa finalidade. Os resultados obtidos pela DLLME-MIP OES para amostras reais foram comparáveis ao ICP-MS. Adicionalmente, o uso do módulo de controle de gás externo (EGCM) possibilitou a introdução direta de solvente orgânico. O EGCM proporciona maior estabilidade ao plasma e evita a deposição de carbono na tocha. Portanto, etapas de preparo de amostra adicionais para a remoção do solvente não são necessárias, resultando em uma maior frequência analítica. Por outro lado, caso seja necessário alcançar um fator de pré-concentração maior, pode-se empregar alternativas como o aumento da massa da amostra e utilização de micronebulizadores para se evitar fatores de diluições altos.

## **Capítulo 3**

---

*Avaliação do desempenho de diferentes nebulizadores em espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas*

### 3.1 INTRODUÇÃO

O sistema de introdução de amostra pode afetar criticamente os parâmetros analíticos durante uma análise pelas técnicas com fonte de plasma. Outros fatores envolvendo as propriedades físicas e químicas da matriz, como a presença dos elementos facilmente ionizáveis, viscosidade, tensão superficial e teor de sólidos dissolvidos também podem influenciar o processo de nebulização. Nesse contexto, a escolha de um nebulizador apropriado é importante para a boa exatidão e precisão dos resultados.<sup>30,126–129</sup> Idealmente, um nebulizador deve possuir as seguintes características: (a) formar aerossóis finos e reproduzíveis; (b) operar em amplos intervalos de vazão; (c) ser quimicamente inerte à matriz, de forma que não afete o branco analítico.<sup>130</sup>

Atualmente, nebulizadores pneumáticos são comumente utilizados para técnicas espectroanalíticas com fonte de plasma. Nesses nebulizadores, o aerossol é formado por meio da colisão do gás de nebulização em alta velocidade com o fluxo de líquido da amostra. Como exemplo de nebulizadores pneumáticos, pode-se citar o concêntrico, fluxo cruzado (*cross-flow*), V-groove Babington, caminho paralelo aprimorado (*Enhanced Parallel Path*).<sup>130</sup>

Ślachciński<sup>131</sup> investigou o uso de um nebulizador com fluxo focado (*Flow Focusing Pneumatic Nebulizer*, FFPN) em MIP OES. Nesse estudo, o plasma era composto por argônio e hélio. Os resultados foram comparados a um nebulizador do tipo *V-groove Babington*. Em relação a reprodutibilidade, o FFPN apresentou desvios padrão relativos entre 5 e 8%. Os limites de detecção foram abaixo de 1 µg L<sup>-1</sup>. A exatidão desse nebulizador foi avaliada por meio de materiais de referência (sedimento de solo e fígado de peixe).<sup>132</sup> O uso de micronebulizadores pneumáticos foi avaliado para o MIP OES operado com um plasma de argônio e hélio. Os

micronebulizadores micro3, fluxo focado (*flow focusing*) (FFPN) e um microcapilar (NAR-1) foram comparáveis a um nebulizador concêntrico convencional.

Nebulizadores com tecnologia *Flow Blurring* têm sido utilizados para construção desses componentes. Esse princípio foi inicialmente proposto por Ganan-Cálvo<sup>133</sup> e atualmente são registrados com nome comercial *OneNeb* (*Agilent Technologies*). No MIP OES, esses nebulizadores são amplamente empregados para diversas matrizes, tais como alimentos, tecidos vegetais e fertilizantes. Ademais, há um número significativo de registros do uso do nebulizador OneNeb para amostras orgânicas. Donati et al.<sup>100</sup> determinaram Cr, Ni, Pb, e V em gasolina e etanol por MIP OES. Os autores empregaram uma diluição simples e o preparo de microemulsões como preparo de amostra. As recuperações obtidas variaram entre 84 e 123% e os limites de detecção foram de 0,3 a 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Amais et al.<sup>98</sup>, empregaram esse nebulizador para a determinação de Si em amostras de diesel e biodiesel. Os resultados indicaram um bom desempenho analítico, sendo a repetibilidade menor que 2%, com recuperações variando entre 80 e 103%. Os limites de detecção calculados foram entre 5 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Azcarate et al.<sup>134</sup> utilizaram esse nebulizador para análise de metais em óleos lubrificantes. As amostras foram introduzidas no MIP OES como emulsões compostas por xileno, Triton-114 e água.

Os nebulizadores ultrassônicos também foram descritos para o MIP OES. Nesse sistema de introdução, o líquido é transferido para uma superfície sólida vibratória, como um transdutor piezoelétrico. Dessa forma, um filme é gerado à medida que o líquido vai se posicionando na superfície. O aerossol é formado quando amplitude da vibração aumenta de forma que as cristas das ondas no líquido colapsam.<sup>130</sup> Matusiewicz et al.<sup>40</sup> empregaram um micronebulizador ultrassônico com sistema microcapilar combinado com a geração de hidretos para a determinação de As, Bi, Sb, Se

e Sn. Os limites de detecção obtidos foram de 1 a 2 ng L<sup>-1</sup> e a precisão foi de aproximadamente 2 - 3%.

## **3.2 OBJETIVO**

Esse capítulo teve como objetivo principal avaliar criticamente nebulizadores comerciais (Concêntrico, MiraMist, *Onebeb series 1 e 2*) em espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas. Para essa finalidade, os parâmetros fundamentais do plasma (temperatura e densidade eletrônica) e o desempenho analítico foram estimados.

## **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### ***3.3.1 Equipamentos***

Os experimentos foram realizados empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (4200 MP-AES, *Agilent Technologies*, Melbourne, Austrália). Em conjunto a esse equipamento, foi utilizado um gerador de nitrogênio (*Agilent Technologies*, modelo 4107). A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros operacionais para o MIP OES. A digestão dos materiais de referência foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Graz, Austria).

Quatro nebulizadores comerciais foram utilizados nesse trabalho: Concêntrico (Tipo A, Meinhard), Mira Mist (PEEK, Burgener Research Inc.), OneNeb series 1 e 2 (Agilent Technologies).

Tabela 3.1. Parâmetros operacionais do MIP OES utilizados para avaliação dos nebulizadores.

Parâmetros instrumentais	Condição operacional
Frequência de operação (MHz)	2450
Potência (kW)	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,5
Vazão do gás externo (L min <sup>-1</sup> )	19,5
Vazão do gás intermediário (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Posição de observação do plasma	-30
Tempo de estabilização (s)	15
Correção de fundo	Auto
Tempo de integração (s)	3
Replicatas	3
Câmara de nebulização	Ciclônica (50 mL de capacidade)
Analitos	Comprimento de onda (nm)
Al	396,40 (I)
Ca	393,37 (II)
Cr	425,43 (I)
Cu	324,75 (I)
Fe	248,33 (I) , 280,21 (I), 280,27 (I) , 285,10 (I), 344,10 (I), 358,12 (I), 371,99 (I), 373,49 (I), 373,71(I) , 374,95(I) , 382,08 (I), 382,59 (I), 385,99 (I), 388,63 (I), 404,58 (I), 438,35 (I)
Mg	280,27 (II), 285,21 (I)
Mn	403,08 (I)
Zn	213,86 (I)

I – Linha atômica; II – Linha iônica

### 3.3.2 Reagentes, soluções padrão e amostras

Todas as soluções foram preparadas utilizando água desionizada (Resistividade > 18.2 MΩ cm) obtida por um sistema Milli-Q de purificação de água (Millipore, Bedford, MA, EUA). O ácido nítrico (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi previamente purificado por um aparato subdestilador (Modelo BSB-939-IR, Distillacid, Berghof, Alemanha). O peróxido de hidrogênio 30 % m v<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, Suíça) foi utilizado durante a etapa de digestão. Etanol (Alphatec, São José dos Pinhais, Brasil),

ácido sulfúrico (Alphatec), e biftalato de potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram usados para o preparo de soluções. As soluções padrão de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn foram preparadas a partir da diluição das soluções estoques de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Fluka, Buchs St. Gallen, Suécia). As faixas de trabalho utilizadas foram 0,05 – 8,0 mg L<sup>-1</sup> para Cu, Cr, Mn e Zn e para Al, Ca, Fe variaram de 0,50 a 80 mg L<sup>-1</sup>.

Os materiais de referência utilizados nesse trabalho para avaliar a exatidão foram folhas de tomate (NIST 1570), fertilizante mineral (NIST 695), fígado de peixe (NRC DOLT-5) e hepatopâncreas de lagosta (NRC TORT-3). Uma amostra comercial de cachaça adquirida em São Carlos (São Paulo, Brasil) foi utilizada devido ao seu elevado teor alcoólico.

### 3.4 Resultados e Discussão

#### 3.4.1 Desenho dos nebulizadores

Os nebulizadores comerciais empregados nesses estudos foram o Concêntrico, MiraMist, OneNeb *series* 1 e 2. As principais características, como material, diâmetro do capilar da amostra e vazão são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Informações dos desenhos dos nebulizadores empregados.

<b>Nebulizador</b>	<b>Material</b>	<b>Diâmetro do capilar da amostra (mm)</b>	<b>Vazão da amostra (mL min<sup>-1</sup>)</b>
<b>OneNeb series 2</b>	ETFE	0,5	0,04 – 2,0
<b>OneNeb series 1</b>	High-tech PFA	0,5	0,04 – 2,0
<b>MiraMist</b>	PEEK	0,5	0,2 – 2,5
<b>Concêntrico</b>	Quartzo	0,5	0,1 – 1,0

O nebulizador concêntrico possui dois capilares, sendo um utilizado para passagem do líquido, enquanto o segundo é para o gás. Nesse nebulizador, emprega-se o efeito Venturi para a formação do aerossol. Nesse caso, o gás em alta velocidade entra em contato com o líquido tangencialmente. Esse nebulizador é comumente utilizado em espectrometria atômica e possui um custo de aquisição baixo. O material desse nebulizador é composto por quartzo, portanto seu uso é limitado em amostras que empreguem ácido fluorídrico. Como outras limitações devido a susceptibilidade a entupimentos também são descritas, o concêntrico é mais adequado para soluções com baixo teor de sólidos dissolvidos. Nesse trabalho, o nebulizador concêntrico utilizado foi o tipo A, no qual o capilar do líquido está alinhado com o orifício de saída.<sup>127,130,135</sup>

O nebulizador MiraMist possui dois capilares paralelos, dessa forma o líquido entra em contato com gás pela tensão superficial. O desenho empregado para esse nebulizador é chamado de caminho paralelo aprimorado (*enhanced parallel path*), o que resulta em uma melhor estabilidade e uma maior tolerância com sólidos dissolvidos. O material utilizado para produção desse nebulizador pode ser PEEK e o PTFE. Portanto, para o PEEK é permitida a introdução de soluções de ácidos e solventes orgânicos diluídos. Por outro lado, o PTFE não apresenta restrição a nenhuma matriz.<sup>127,130,136</sup>

O princípio *Flow Blurring*, o qual é empregado nos nebulizadores OneNeb series 1 e 2 é considerado um avanço do Fluxo focado (*flow focusing*). Cabe ressaltar que esses nebulizadores dependem de uma geometria específica (Fig. 3.1). Para que aconteça o mecanismo do Flow burring, a razão entre a distância entre o capilar do líquido e o orifício de saída (H) e o diâmetro (D) deve ser menor que 0,60. Caso contrário, se H/D for maior que 0,60, os mecanismos para o *flow focusing* são observados.

Nesse caso, o gás fica perpendicular ao eixo de simetria e o aerossol é gerado a partir do fluxo de gás que interage com o líquido de forma turbulenta.<sup>130,133</sup> O *Flow blurring* é caracterizado pela sua alta eficiência de formação de aerossol em relação aos outros nebulizadores pneumáticos.<sup>133</sup>

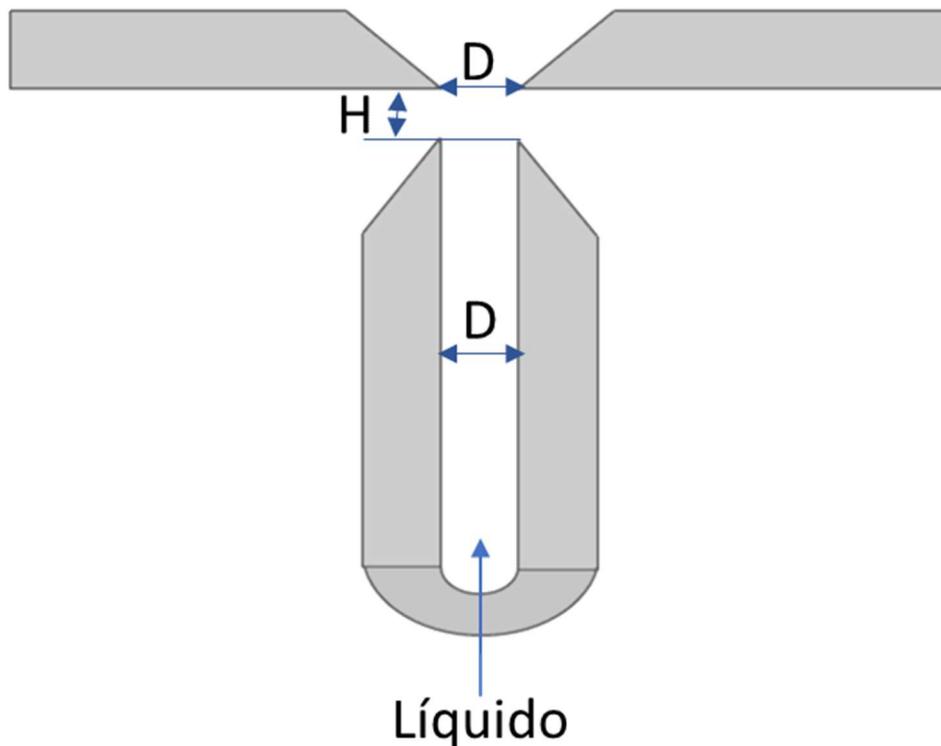
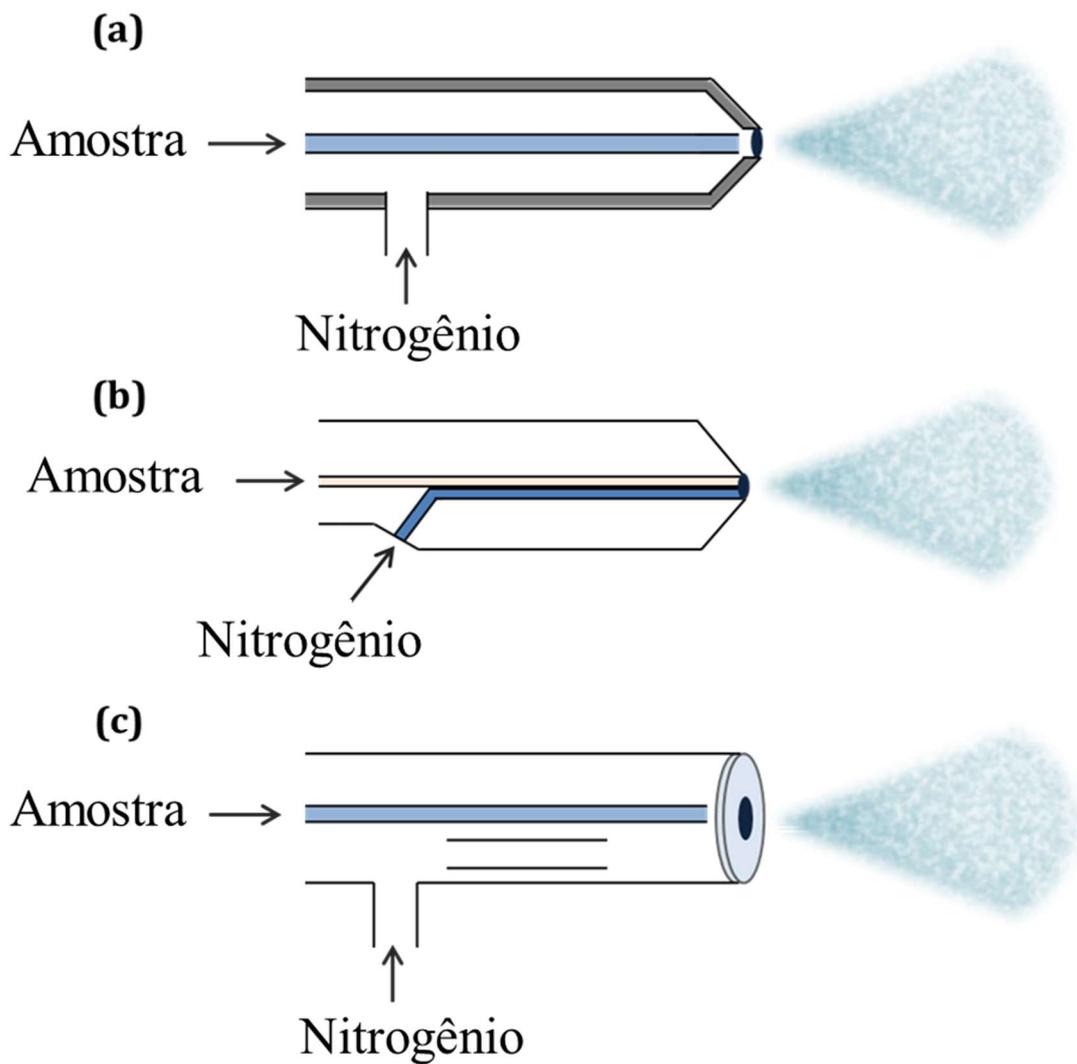


Figura 3.1. Desenho do nebulizador com tecnologia *flow blurring* e *flow focusing*

O material do nebulizador OneNeb *series 1* é composto por PFA e PEEK, portanto é possível a sua aplicação para soluções contendo solventes orgânicos e altas concentrações de ácidos, inclusive HF. Adicionalmente, a geometria desse nebulizador permite a introdução de soluções com altos teores de sólidos dissolvidos.<sup>130,137</sup> Recentemente, a *Agilent Technologies* lançou o OneNeb *series 2*, o qual possui as mesmas características do seu antecessor. As mudanças introduzidas foram o capilar da amostra removível, o que permite facilmente a sua troca quando

necessário. Adicionalmente, o OneNeb series 2 é fabricado a partir do etileno tetrafluoroetileno, o qual possui uma superfície mais lisa. Dessa forma, o desempenho durante a etapa de limpeza e a robustez são aumentados.<sup>138</sup> Os desenhos que representam os quatro nebulizadores utilizados nesse trabalho são apresentados na Fig. 3.2.



**Figura 3.2.** Desenho dos nebulizadores comerciais avaliados. (a) concêntrico; (b) MiraMist e (c) OneNeb series 1 e 2

### 3.4.2 Efeitos nos parâmetros fundamentais do plasma e eficiência de transporte

Na literatura, é descrito que o sistema de introdução influencia diretamente nos processos de vaporização e atomização. Portanto, avaliar a influência dos nebulizadores nos parâmetros fundamentais do plasma pode promover melhor desempenho analítico. A vazão do gás de nebulização para os experimentos foi estabelecida como  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  por ser uma condição intermediária. Inicialmente, a eficiência de transporte foi calculada por um balanço de massa.<sup>37</sup> Um tubo preenchido com sílica foi conectado na saída da câmara de nebulização. A solução foi nebulizada por 2 min e a eficiência de transporte foi calculada de acordo com a diferença de peso de água aspirada e coletada no dreno. Portanto, foram considerados o peso inicial da solução e a diferença do peso do tubo antes e após a coleta do aerossol terciário para o cálculo da eficiência do transporte.

Para o cálculo da temperatura do plasma e densidade eletrônica assumiu-se que o plasma está em um equilíbrio dinâmico, portanto a temperatura do elétron e do gás são aproximadamente equivalentes ( $T_e \approx T_g$ ).<sup>23</sup> Nesse sentido, uma transição eletrônica genérica de um nível  $k$  para  $i$  de um átomo neutro no seu estado excitado é representado pela Equação 3.1. Rearranjando a eq. 3.1 e aplicando o logaritmo natural nos dois lados, obtém-se a Equação 3.2.

$$I_{ki} = \frac{Fn g_k A_{ki}}{\lambda_{ki} Q} e^{-E_k/K_B T} \quad (3.1)$$

$$\ln \left( \frac{I_{ki} \lambda_{ki}}{g_k A_{ki}} \right) = - \frac{-E_k}{K_B T} + \ln \left( \frac{Fn}{Q} \right) \quad (3.2)$$

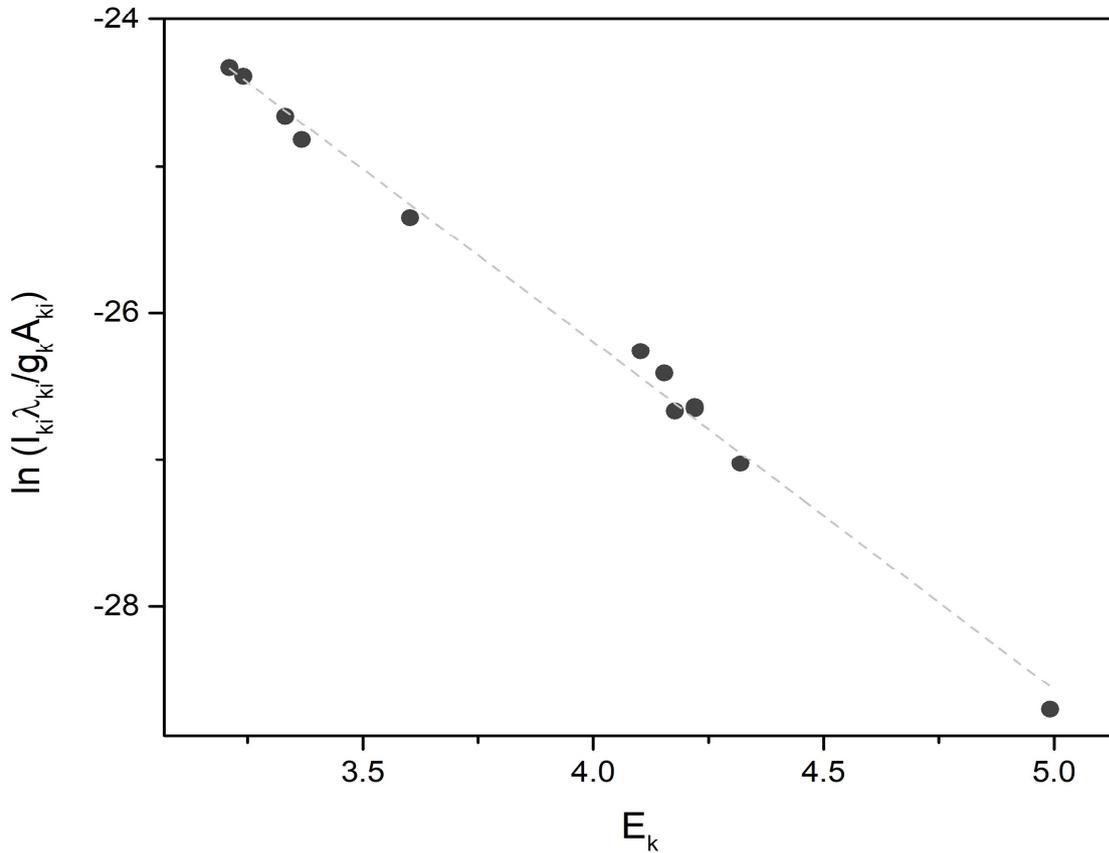
Sendo que  $F$  representa as dimensões do plasma,  $n$  a densidade dos átomos neutros,  $Q$  a função de partição,  $K_B$  a constante de Boltzmann, e  $T$  a temperatura. Adicionalmente,  $g_k$ ,  $E_k$ ,  $A_{ki}$ ,  $I_{ki}$ , e  $\lambda_{ki}$  são a degenerescência, energia, a probabilidade de transição, intensidade e o comprimento de onda. Os subíndices  $k$  e  $i$  representam os níveis. O gráfico de Boltzmann foi construído para cada nebulizador (Fig. 3.3), empregando-se os dados obtidos pela análise de uma solução de Fe ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Nesse caso, foram empregadas 10 linhas atômicas de Fe (248,2 – 438,35 nm). Os parâmetros utilizados para essas linhas são apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3. Parâmetros empregados para construção do gráfico de Boltzmann.**

<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b><math>E_k</math> (eV)</b>	<b><math>g_k A_{ki}</math> (<math>\times 10^8</math>) (<math>s^{-1}</math>)</b>
<b>248,33</b>	4,99	52,80
<b>344,06</b>	3,60	1,20
<b>358,12</b>	4,32	13,30
<b>371,99</b>	3,33	1,78
<b>373,49</b>	4,18	9,91
<b>373,71</b>	3,37	1,27
<b>374,95</b>	4,22	6,87
<b>374,95</b>	4,22	6,87
<b>382,04</b>	4,10	6,00
<b>382,59</b>	4,15	4,18
<b>385,99</b>	3,21	0,87
<b>388,63</b>	3,24	0,37
<b>404,58</b>	4,55	7,76
<b>248,33</b>	4,99	52,80

O  $\ln (I_{ki} \lambda_{ki} / g_k A_{ki})$  foi utilizado no eixo y, enquanto  $E_k$  no eixo x (Fig.3.3). Por fim, a temperatura de excitação foi estimada por meio

do valor do coeficiente angular ( $-1/K_B T$ ). Esse método de cálculo da temperatura tem sido amplamente empregado em estudos envolvendo o MIP OES.<sup>23,37</sup>



**Figura 3.3.** Exemplo do gráfico de Boltzmann empregado para o cálculo de temperatura do plasma.

Para a densidade eletrônica, a equação de Saha-Boltzmann foi utilizada (Eq. 3.3). Os dados obtidos para o Mg atômico e iônico foram empregados. As análises foram conduzidas com uma solução de Mg ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sendo  $E_{ip}$  a energia potencial e os sub-índices  $a$  e  $i$  correspondem às espécies atômicas e iônicas, respectivamente.

$$n_e = \frac{2I_a \lambda_a g_i A_i}{I_i \lambda_i g_a A_a} \times \left( \frac{2\pi m_e K_B T}{h^2} \right)^{3/2} \times e^{(E_a - E_i - E_{ip}/K_B T)} \quad (3.3)$$

A temperatura, a densidade eletrônica e a eficiência de transporte obtidas para cada nebulizador são apresentados na Tabela 20. Observa-se que os parâmetros avaliados foram influenciados pelos nebulizadores. O nebulizador MiraMist apresentou a maior temperatura, enquanto o OneNeb series 2, a menor. Também foi verificado que o OneNeb series 1 e o concêntrico apresentaram temperaturas similares. A partir desses resultados, foi verificada uma relação da temperatura com a eficiência de transporte. Por exemplo, o MiraMist apresentou a menor eficiência de transporte e a temperatura do plasma foi maior. Portanto, isso pode ser justificado pela quantidade de aerossol que chega ao plasma. De acordo com Jankowski and Reszke<sup>30</sup>, a presença de solventes aquosos ou orgânicos requerem uma grande quantidade de energia para a evaporação do solvente, dessa forma, reduzindo a temperatura.

**Tabela 3.4. Parâmetros fundamentais e a eficiência de transporte calculados para os nebulizadores comerciais.**

<b>Nebulizador</b>	<b>T (K)</b>	<b><math>n_e</math> (cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Eficiência do transporte de solvente (%)</b>
<b>Concêntrico</b>	4963 ± 9	1,2 x 10 <sup>13</sup>	14,0 ± 3
<b>Mira Mist</b>	5070 ± 162	2,3 x 10 <sup>13</sup>	12,3 ± 2
<b>OneNeb series 1</b>	4958 ± 70	8,7 x 10 <sup>12</sup>	23,6 ± 0,6
<b>OneNeb series 2</b>	4805 ± 12	3,9 x 10 <sup>12</sup>	28,1 ± 5

Em relação a densidade eletrônica, o nebulizador OneNeb series 2 apresentou o maior valor, enquanto o MiraMist o menor. Esses dados estão relacionados com a temperatura. Chalyavi et al.<sup>44</sup> desenvolveram um modelo computacional para o cálculo da fração de espécies moleculares, como NO<sup>+</sup>, N<sub>2</sub>, e OH em um plasma de nitrogênio contendo vapor de água.

Os autores verificaram que o aumento da densidade eletrônica é proporcional a temperatura.

Os dados dos parâmetros fundamentais do plasma obtidos para cada nebulizador são importantes para quando amostras complexas, especialmente aquelas com elevados teores de elementos facilmente ionizáveis, são analisadas. Gonçalves et al.<sup>23</sup> relacionaram que o plasma operado em condições de alta ou baixa densidade eletrônica pode afetar na exatidão e nos limites de detecção durante a análise de amostras complexas.

### ***3.4.3 Desempenho analítico dos nebulizadores***

#### ***3.4.3.1 Reprodutibilidade***

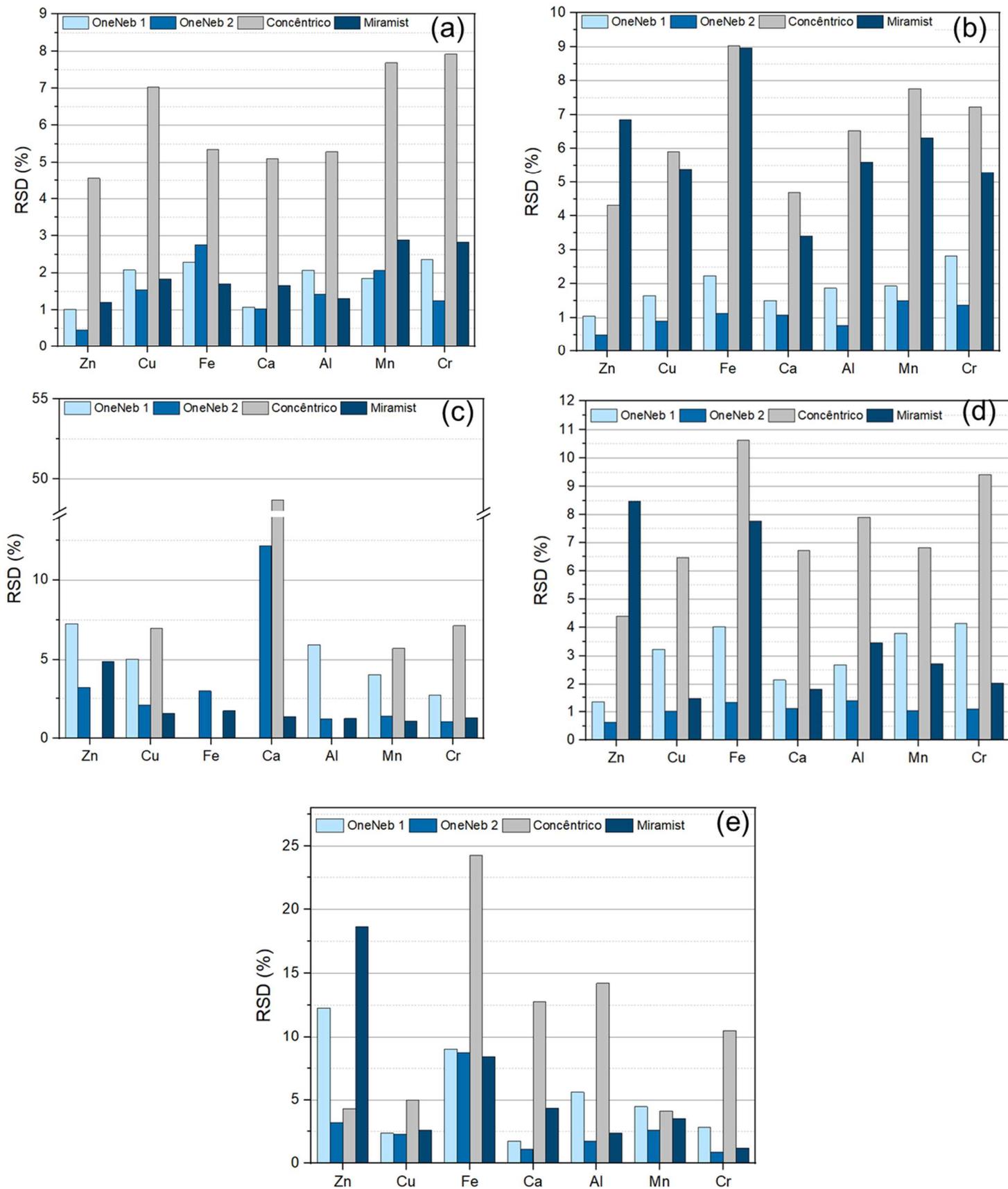
A precisão dos resultados foi avaliada por meio da análise de uma solução composta por 1 mg L<sup>-1</sup> de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn em diferentes matrizes, como HNO<sub>3</sub> (1% v v<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v v<sup>-1</sup>), elementos facilmente ionizáveis (100 mg L<sup>-1</sup> de Na, K e Ba), etanol (1% v v<sup>-1</sup>) e carbono (1000 mg L<sup>-1</sup>). Essas soluções foram analisadas dez vezes (n = 10). A seleção desses analitos foi baseada na soma (E<sub>sum</sub>) das suas energias de ionização (E<sub>ion.</sub>) e excitação (E<sub>exc.</sub>) (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5. Energias de ionização e excitação dos analitos avaliados.**

<b>Analito</b>	<b>Comprimento de</b>			
	<b>onda (nm)</b>	<b>E<sub>exc.</sub></b>	<b>E<sub>ion.</sub></b>	<b>E<sub>sum</sub></b>
<b>Al (I)</b>	396,40	3,14	5,98	3,14
<b>Ca (II)</b>	393,37	3,15	6,11	9,26
<b>Cr (I)</b>	425,43	2,91	6,76	2,91
<b>Cu (I)</b>	324,75	3,81	7,23	3,81
<b>Fe (I)</b>	371,99	3,33	7,90	3,33
<b>Mn (I)</b>	403,08	3,07	7,43	3,07
<b>Zn (I)</b>	213,86	5,79	9,39	5,79

**I – Linha atômica; II – Linha iônica**

Os valores dos desvios padrão relativos (RSD) para cada nebulizador nas respectivas matrizes são apresentados na Fig. 3.4. O nebulizador OneNeb series 2 apresentou a melhor precisão em todas as matrizes. Na solução de HNO<sub>3</sub> os valores de RSD variaram de 0,5% (Zn) a 2% (Fe). O nebulizador concêntrico apresentou altos valores de desvio padrão relativo para Ca, Fe, Al e Zn na matriz contendo elementos facilmente ionizáveis. O *OneNeb series 1* de modo geral apresentou boa precisão, no entanto, para na matriz contendo EIEs, altos valores de RSD foram encontrados para Ca, Fe e Zn. Para o MiraMist, os maiores valores de RSD foram obtidos nas matrizes contendo ácido sulfúrico e carbono. Por outro lado, na matriz com EIEs, esse nebulizador teve uma boa precisão para todos os analitos. O estudo de precisão para o OneNeb series 1 já foi descrito na literatura. Serrano et al.<sup>37</sup> verificaram que matrizes contendo altos teores de carbono, enxofre e cálcio não afetaram o processo de nebulização desse nebulizador.



**Figura 3.4.** Valores de RSD (%) obtidos para os quatro nebulizadores comerciais em diferentes matrizes. (a)  $HNO_3$  (1% v v<sup>-1</sup>), (b)  $H_2SO_4$  (1% v v<sup>-1</sup>), (c) EIEs (1000 mg L<sup>-1</sup>), (d) Etanol (1% v v<sup>-1</sup>) e (e) Carbono (1000 mg L<sup>-1</sup>).

### 3.4.3.2 Limites de detecção

Os limites de detecção (LOD) foram estimados de acordo com o proposto pela IUPAC. Nesse caso, dez replicatas do branco (n=10) foram analisadas e o desvio padrão dessas medidas foi calculado. Os LODs foram determinados para Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn (Tabela 3.6) e como branco foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 1% v v<sup>-1</sup>.

Tabela 3.6. Limites de detecção calculado para os nebulizadores comerciais.

Elemento	LOD (µg L <sup>-1</sup> )			
	Concêntrico	Mira Mist	OneNeb series 1	OneNeb series 2
Al	35,0	6,7	5,9	2,9
Ca	4,7	8,8	2,8	1,6
Cr	16,9	9,3	2,6	0,3
Cu	7,7	5,7	6,7	3,2
Fe	75,1	36,7	33,5	8,4
Mn	12,9	3,0	3,6	1,2
Zn	14,5	15,1	17,0	5,1

O nebulizador OneNeb series 2 apresentou os menores valores dos limites de detecção, especialmente para o Cr (0,3 µg L<sup>-1</sup>). Ademais, para esse nebulizador, o ganho de poder de detecção para o Fe foi aproximadamente três vezes. Os LODs para todos os analitos obtidos pelo nebulizador concêntrico foram maiores, principalmente para o Al (35 µg L<sup>-1</sup>). Cabe ressaltar que essas análises foram realizadas na mesma vazão do gás de nebulização. Esses valores podem ser melhorados por meio de uma otimização da vazão do gás de nebulização. Nesse caso, o programa computacional do MIP OES permite realizar facilmente essa otimização antes de iniciar uma análise. A Figura 3.5 apresenta um típico gráfico de

otimização da vazão do gás de nebulização para o Ca utilizando o OneNeb series 2.

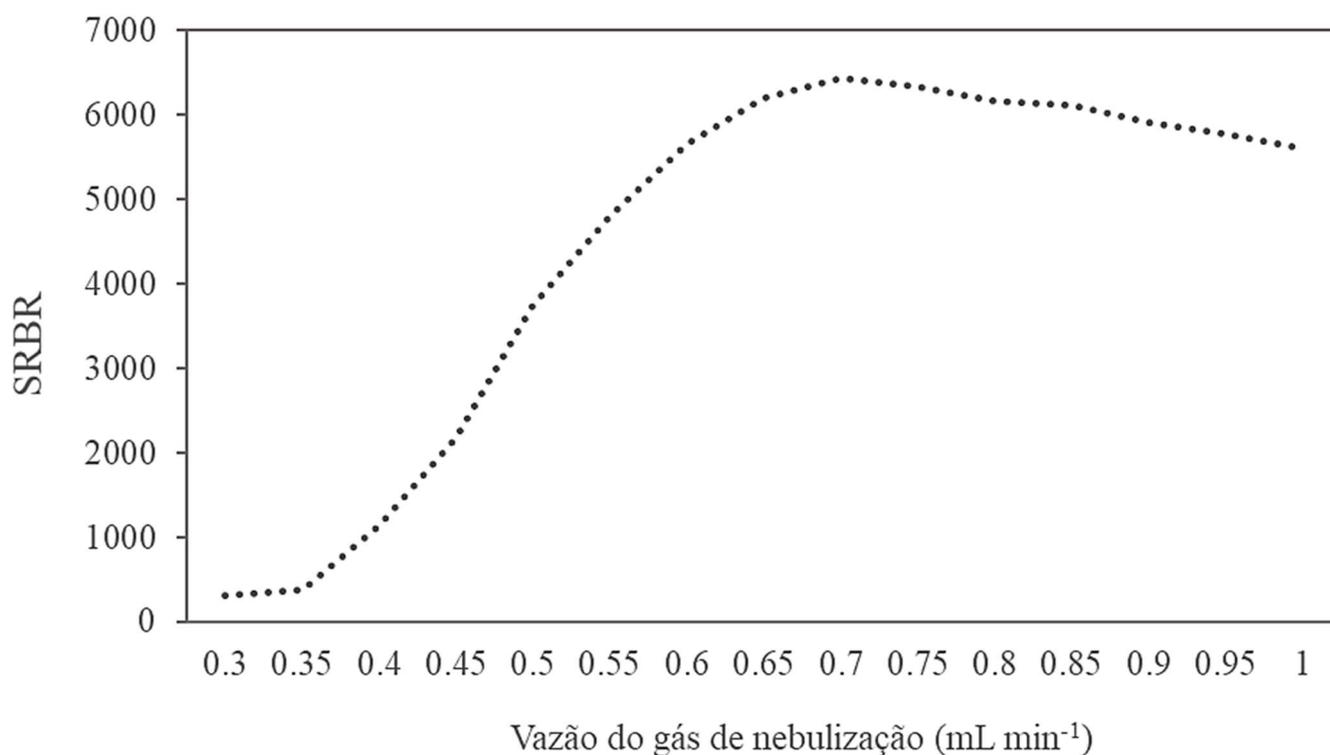


Figura 3.5. Otimização da vazão do gás de nebulização para o Ca utilizando o OneNeb series 2.

### 3.4.3.3 *Exatidão*

Para a avaliação da exatidão, materiais de referência de folha de tomate (NIST 1570), fertilizante mineral (NIST 695), fígado de peixe (NRC DOLT-5) e hepatopâncreas de lagosta (NRC TORT-3) foram digeridos e analisados. Esses CRMs foram escolhidos devido a composição da sua matriz, como alto teor de carbono (fígado de peixe) e elementos facilmente ionizáveis (fertilizante mineral). Nessas amostras foram determinados os analitos previamente usados para o estudo de reprodutibilidade e cálculo de LODs. Os valores obtidos experimentalmente e as recuperações são apresentados na Tabela 3.7.

As recuperações obtidas empregando o nebulizador *OneNeb series 2* de um modo geral foram satisfatórias, especialmente para os materiais de fígado de peixe (86 – 103%) e hepatopâncreas de lagosta (90 – 109%). Para o fertilizante mineral, os valores variaram de 87% (Ca) a 110% (Al). Para a folha de tomate, as recuperações foram de 78% (Zn) a 111% (Cr). A exatidão obtida para o *OneNeb series 1* para os materiais de referência foram de 87 – 103% para o hepatopâncreas de lagosta, 77 – 119% para a folha de tomate, 84 – 122% para o fertilizante e 77 – 103% para o fígado de peixe. O concêntrico apresentou recuperações entre 75 – 110% (folha de tomate), 84 – 110% (fígado de peixe), 75 – 103% (hepatopâncreas de lagosta) e 82 – 114 % (fertilizante). Por fim, para o *MiraMist* os valores foram 81 a 110% (folha de tomate), 79 – 110% (fígado de peixe), 90 – 118% (hepatopâncreas de lagosta) e 83 – 111% (fertilizante). Deve-se ressaltar que devido à baixa concentração do Cr (1,988 mg kg<sup>-1</sup>), a sua determinação apenas possível com uso dos nebulizadores *OneNeb series 1 e 2*.

As recuperações obtidas abaixo de 80%, como a determinação de Zn com o *OneNeb series 1 e 2* na folha de tomate, podem estar relacionadas com o efeito de matriz. Os materiais analisados são considerados como matrizes complexas e quantificação foi realizada utilizando calibração externa. Portanto, as exatidões podem ser melhoradas empregando novos métodos de calibração como a calibração multi-energética (MEC) ou multivazões (MFC).<sup>25-27</sup> Adicionalmente, os métodos convencionais como adição de analitos e padronização interna podem ser aplicadas. Outra hipótese é que os experimentos foram executados tomando como condição de compromisso a não otimização das condições instrumentais para cada nebulizador, para que fosse possível a avaliação individual dos nebulizadores. Caso houvesse uma otimização, muito provavelmente, as recuperações se apresentariam mais adequadas.

Para avaliar o desempenho desses nebulizadores em um meio com solvente orgânico, foi realizado um ensaio de adição e recuperação em amostra de cachaça. Nesse caso, o teor de etanol informado pelo fabricante foi de 40% v v<sup>-1</sup>. Portanto, as amostras foram diluídas 40 vezes e adição de 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn foram realizadas. As recuperações obtidas para os quatro nebulizadores foram satisfatórias (Tabela 3.8). Sendo 89 – 102 % para o OneNeb series 1, 94 – 114% para OneNeb series 2, 94 - 109 % para o concêntrico e 95-106 % para o MiraMist. Também se observou que o OneNeb series 2 apresentou os menores desvios durante essas análises, portanto indicando a melhor precisão durante a análise de uma amostra hidro-orgânica.

Tabela 3.7. Valores determinados e recuperações obtidas para os materiais de referência certificados empregando os diferentes nebulizadores comerciais.

CRM	Elementos	Valor certificado	OneNeb series 1		OneNeb series 2		Concêntrico		Mira Mist	
			Valor determinado	Rec. (%)						
NIST 1573 a	Al (mg kg <sup>-1</sup> )	598,4 ± 7,1	571,9 ± 8,1	96	595,3 ± 9,1	99	513,0 ± 26,3	86	602,4 ± 12,5	101
	Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	50450 ± 550	52469 ± 2150	104	53213,6 ± 1820	105	55375 ± 2785	110	55740 ± 3106	110
	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	1,988 ± 0,034	1,7 ± 0,1	86	2,2 ± 0,2	111	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	4,70 ± 0,14	5,6 ± 0,2	119	4,3 ± 0,2	92	4,3 ± 0,4	92	4,1 ± 0,10	87
	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	367,5 ± 4,3	345,9 ± 9,6	94	351,2 ± 6,5	96	348,8 ± 17,3	95	342,6 ± 10,6	93
	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	246,3 ± 7,1	207,8 ± 6,1	84	204,9 ± 6,3	83	183,9 ± 13,6	75	199,8 ± 6,6	81
	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	30,94 ± 0,55	23,9 ± 0,1	77	24,0 ± 0,5	78	25,7 ± 1,3	83	27,6 ± 0,5	89
NRC-DOLT-5	Al (mg kg <sup>-1</sup> )	31,7 ± 4,2	32,5 ± 0,7	103	32,5 ± 0,7	103	27,5 ± 0,5	87	24,916 ± 0,003	79
	Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	550 ± 80	555,3 ± 6,9	101	560,9 ± 7,20	102	528,5 ± 14,0	96	547,1 ± 13,0	99
	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	2,35 ± 0,58	1,8 ± 0,1	77	2,2 ± 0,2	94	2,36 ± 0,03	100	2,44 ± 0,05	104
	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	35,0 ± 2,4	33,7 ± 0,1	96	32,9 ± 0,2	94	29,8 ± 0,9	85	30,8 ± 0,5	88
	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	1070 ± 80	1025,1 ± 11,7	96	1085,9 ± 0,8	101	966,3 ± 51,5	90	1055,9 ± 1,3	99
	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	8,91 ± 0,70	9,2 ± 0,2	103	8,1 ± 0,8	91	7,8 ± 0,3	88	9,79 ± 0,03	110
	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	105,3 ± 5,4	90,9 ± 1,6	86	90,9 ± 0,3	86	88,3 ± 0,4	84	90,3 ± 1,8	86
NRC-TORT-3	Al (mg kg <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	1,95 ± 0,24	1,7 ± 0,1	87	2,0 ± 0,1	103	2,0 ± 0,3	103	2,3 ± 0,2	118
	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	497 ± 22	465,1 ± 0,8	94	459,7 ± 0,8	92	432,7 ± 17,3	87	452,7 ± 0,9	91
	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	179 ± 8	183,6 ± 4,1	103	195,7 ± 1,2	109	173,4 ± 3,1	97	189,7 ± 2,1	106
	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	15,6 ± 1,0	15,0 ± 0,3	96	14,7 ± 0,2	94	11,7 ± 0,3	75	15,5 ± 0,10	99
	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	136 ± 6	124,5 ± 0,5	92	121,8 ± 0,2	90	117,0 ± 4,0	86	121,8 ± 0,9	90
NIST 695	Al (% m m <sup>-1</sup> )	0,61 ± 0,03	0,59 ± 0,02	97	0,529 ± 0,005	87	0,50 ± 0,01	82	0,53 ± 0,01	87
	Ca (% m m <sup>-1</sup> )	2,26 ± 0,04	2,48 ± 0,04	110	2,5 ± 0,1	110	2,3 ± 0,1	102	2,28 ± 0,06	101
	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	244 ± 6	203,8 ± 12,2	84	258,40 ± 6,93	106	265,2 ± 21,4	109	221,3 ± 17,5	91
	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	1225 ± 9	1499,3 ± 11,2	122	1307,90 ± 60,98	107	1237,7 ± 17,7	101	1268,6 ± 49,8	104
	Fe (% m m <sup>-1</sup> )	3,99 ± 0,08	3,44 ± 0,19	86	3,3 ± 0,1	83	3,34 ± 0,03	84	3,31 ± 0,02	83
	Mn (% m m <sup>-1</sup> )	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,01	95	0,29 ± 0,01	95	0,250 ± 0,002	82	0,272 ± 0,004	89
	Zn (% m m <sup>-1</sup> )	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,0025	98	0,30 ± 0,01	92	0,37 ± 0,02	114	0,36 ± 0,01	111

**Tabela 3.8. Ensaios de adição e recuperação para amostra de cachaça.**

Elemento	Concêntrico		Mira Mist				OneNeb series 1				OneNeb series 2					
	Valor determinado		Recuperação (%)		Valor determinado		Recuperação (%)		Valor determinado		Recuperação (%)		Valor determinado		Recuperação (%)	
	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2
<b>Al</b>	4,70 ± 0,08	9,59 ± 0,15	94	96	4,74 ± 0,03	9,67 ± 0,04	95	97	4,68 ± 0,33	8,85 ± 0,32	94	89	4,74 ± 0,04	9,71 ± 0,08	95	97
<b>Ca</b>	5,06 ± 0,20	10,22 ± 0,20	101	102	5,21 ± 0,06	10,60 ± 0,16	104	106	5,11 ± 0,23	9,97 ± 0,12	102	100	5,35 ± 0,07	10,61 ± 0,19	107	106
<b>Cu</b>	5,25 ± 0,09	10,94 ± 0,61	105	109	5,05 ± 0,03	10,14 ± 0,09	101	101	4,95 ± 0,23	9,57 ± 0,18	99	96	5,28 ± 0,03	10,19 ± 0,06	106	102
<b>Cr</b>	4,71 ± 0,17	9,74 ± 0,40	94	97	4,86 ± 0,04	9,93 ± 0,18	97	99	4,61 ± 0,17	9,21 ± 0,32	92	92	4,92 ± 0,04	10,01 ± 0,06	98	100
<b>Fe</b>	5,43 ± 0,23	10,88 ± 0,21	109	109	4,92 ± 0,07	9,93 ± 0,23	98	99	4,79 ± 0,48	9,34 ± 0,33	96	93	5,03 ± 0,04	9,96 ± 0,07	101	100
<b>Mn</b>	5,06 ± 0,19	9,87 ± 0,47	101	99	4,89 ± 0,10	10,07 ± 0,04	98	101	4,60 ± 0,38	8,86 ± 0,07	92	89	4,98 ± 0,04	9,96 ± 0,07	100	100
<b>Zn</b>	5,35 ± 0,07	10,56 ± 0,17	107	106	5,02 ± 0,02	10,23 ± 0,05	100	102	5,04 ± 0,01	9,78 ± 0,39	101	98	5,71 ± 0,05	10,65 ± 0,90	114	106

#### ***3.4.4 Aplicações dos nebulizadores na literatura***

De acordo com o que foi discutido anteriormente, na Tabela 3.9 são descritas as principais características mencionadas para os nebulizadores comerciais estudados. Adicionalmente, um levantamento bibliográfico foi feito para trabalhos envolvendo o MIP OES para análises elementares. Observa-se que a maioria dos trabalhos utilizam o *OneNeb series 1*. Isso pode ter ocorrido devido a que este modelo de nebulizador era o comercializado pelo fabricante junto ao equipamento. Além disso, esse nebulizador é considerado compatível para todas as matrizes, inclusive para solventes orgânicos e ácido fluorídrico. Adicionalmente, a sua alta tolerância para o teor de sólidos dissolvidos é um atrativo.

Como o *OneNeb series 2* foi lançado recentemente, apenas um trabalho foi registrado. Deve-se ressaltar que o trabalho que empregou esse nebulizador envolveu o uso do ácido tetrafluorbórico ( $\text{HBF}_4$ ) durante o preparo de amostra para determinação de Si em plantas por MIP OES. Como demonstrado pelos autores, durante a digestão pode ocorrer a formação de ácido fluorídrico, sendo recomendado o uso de um sistema de introdução de amostra inerte (nebulizador e câmara de nebulização) para evitar danos ao equipamento e possíveis contaminações do branco.<sup>104</sup>

**Tabela 3.9. Características e aplicações dos nebulizadores comerciais avaliados.**

<b>Nebulizador</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicações</b>
Concêntrico	Mais facilidade para entupimento Não é compatível com HF Não é adequado para matrizes complexas Menor sensibilidade	Tecido vegetal, ração animal e amostras geológicas <sup>33,139,140</sup>
Mira Mist	Boa precisão para matrizes com EIEs Baixo risco de entupimento Compatível com HF Não é adequado para amostras com ácido sulfúrico Baixa eficiência de transporte	Cabelo, tecido de peixe, alga e farinha, vinho <sup>48,141</sup>
OneNeb series 1	Boa precisão para matrizes complexas Compatível com HF e solventes orgânicos Alta tolerância para sólidos dissolvidos Boa eficiência de transporte	Vinho, arroz, queijo, café, chá, energético, cerveja, pão, tecido de peixe, cereal infantil, sopas instantâneas, solventes orgânicos, biodiesel, gasolina e fertilizante mineral <sup>21,25,26,28,36,41,98,100,142-144</sup>
OneNeb series 2	Boa precisão para matrizes complexas Alta eficiência de transporte Aumento da sensibilidade Compatível com HF e solventes orgânicos Alta tolerância para sólidos dissolvidos	Tecido vegetal <sup>104</sup>

### 3.5 Conclusões parciais

Os estudos envolvendo os nebulizadores comerciais (concêntrico, MiraMist, OneNeb series 1 e 2) indicaram que esses podem influenciar os parâmetros fundamentais do plasma como temperatura (T) e densidade eletrônica ( $n_e$ ). Esses resultados são importantes para análise de amostras complexas. Ademais, as informações referentes às características de cada nebulizador poderão ser relevantes dependendo da etapa de preparo de amostras e o tipo de amostra.

O OneNeb series 2 apresentou a maior eficiência de transporte, e menor temperatura e densidade eletrônica. Por outro lado, o MiraMist obteve a menor eficiência de transporte e maiores temperatura e densidade eletrônica. Pode-se justificar esses dados, a quantidade de solvente que é levada para o plasma e a energia requerida para evaporação. O OneNeb 2 apresentou a melhor precisão em todas as matrizes estudadas em comparação aos outros nebulizadores e o aumento da sensibilidade.

## **Capítulo 4**

---

*Avaliação dos modos operacionais para a determinação multielementar de elementos tóxicos e essenciais por ICP-MS/MS*

## 4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em carne são importantes para garantir a qualidade do alimento e a segurança alimentar. Para a determinação elementar de carne, os métodos espectroanalíticos como ICP OES, MIP OES, FAAS e LIBS são descritos na literatura.<sup>7,114,145</sup> A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) também tem sido explorada para essa finalidade, especialmente para elementos em baixas concentrações.<sup>7,19</sup> No entanto, quando amostras complexas são analisadas por essa técnica, severas interferências espectrais podem ocorrer. Essas interferências ocorrem pela presença de concomitantes de mesma razão massa/carga que a do analito, bem como, pela combinação de espécies que formam íons poliatômicos. Como resultado, essas interferências espectrais podem ocasionar a sobreposição de sinais.<sup>20</sup> Há diversos tipos de estratégias que são utilizadas para minimizar esses efeitos, tais como uso de correção matemática, instrumentos de alta resolução, operação do plasma na condição robusta, plasma frio e a cela de colisão e discriminação por energia cinética, cela dinâmica de reação (DRC).<sup>53–55,65,146–148</sup>

Nesse contexto, a espectrometria de massas com plasma acoplado e configuração tandem foi desenvolvida para a determinação de elementos traço livres de interferência. Essa técnica, atualmente, é considerada como estado-da-arte e é caracterizada pela sua alta sensibilidade e maior eficiência de correção de interferências.<sup>149</sup> Na literatura, essa técnica tem sido aplicada para diversas áreas de estudo.<sup>49</sup> No ICP-MS/MS, dois quadrupolos ( $Q_1$  e  $Q_2$ ) são utilizados. Entre  $Q_1$  e  $Q_2$ , há um sistema de reação octopolar (ORS) que pode ser pressurizado com um gás inerte ou reativo. O modo *single-quad* corresponde apenas a operação do segundo quadrupolo, portanto o  $Q_1$  opera em modo de

guia de íons, permitindo a passagem das razões  $m/z$  para os analitos, interferentes e concomitantes da amostra.<sup>49,149</sup>

No modo MS/MS, o primeiro quadrupolo funciona como um filtro de massa. Em seguida, os íons chegam ao ORS, onde novas espécies poderão ser formadas a partir do analito (*mass-shift*) ou do o interferente (*on-mass*). Por fim, o segundo quadrupolo selecionará a massa/carga relacionada ao analito. Os gases reativos mais comuns empregados para utilização no sistema de reação octopolar são o hidrogênio ( $H_2$ ), metano ( $CH_4$ ), amônia ( $NH_3$ ) e oxigênio ( $O_2$ ).<sup>49,150</sup> Deve-se destacar que para que ocorra a reação desses gases com o analito ou interferente, as reações devem ser termodinamicamente favoráveis e não necessitar de energia adicional. Portanto, energia de Gibbs e a entalpia da reação devem ser negativas ( $\Delta G < 0$  e  $\Delta H_r < 0$ ).<sup>49,149</sup> Adicionalmente, o uso de gases inertes, como o He, também são explorados e as interferências são minimizadas por colisões.<sup>53,149</sup> Muitos trabalhos descrevem o uso desses gases para análise de amostras biológicas, ambientais e nucleares.<sup>56,68,151</sup> A Tabela 3 apresentada na seção de Revisão bibliográfica descreve alguns trabalhos que utilizaram o ICP-MS/MS como técnica de detecção e os respectivos gases utilizados no ORS.

## 4.2 OBJETIVOS

O objetivo desse capítulo foi explorar o uso da espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem (ICP-MS/MS) para determinação de elementos essenciais e tóxicos em carne. Nesse caso, foram quantificados 10 analitos (As, Cd, Cr, Co, Mn, Mo, Pb, Se, Sr e V) e o uso de três gases ( $O_2$ ,  $H_2$  e He) foi avaliado.

## **4.3 Material e Métodos**

### ***4.3.1 Equipamentos***

Um ICP-MS com configuração tandem (8800 ICP-MS/MS, Agilent, Tóquio, Japão) foi empregado para as determinações elementares nas amostras de carne. Os parâmetros instrumentais são descritos na Tabela 4.1. O instrumento foi ajustado diariamente a fim de se obter a melhor condição. Para a digestão das amostras foi empregado um forno com cavidade assistido por radiação micro-ondas (ETHOS UP, Milestone, Itália)

### ***4.3.2 Reagentes, soluções e amostras***

Todas as soluções foram preparadas utilizando água desionizada (18,2 M $\Omega$  cm, Purelab Option-Q, Elga, Woodridge IL, EUA). Ácido nítrico (Fisher, Pittsburgh, PA, EUA) e peróxido de hidrogênio (Veritas, Columbus, OH, EUA) foram empregados para digestão das amostras. Soluções padrão de As, Cd, Co, Cr, Mo, Mn, Pb, Sr e V 1000 mg L<sup>-1</sup> (SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, EUA) foram utilizadas para o preparo das soluções de calibração. Os intervalos lineares das curvas de calibração variaram de 0,01 a 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup>.

Para avaliação da exatidão, foi empregado um material de referência certificado de fígado bovino (*bovine liver*, 1577b, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA). As amostras de carne foram obtidas em mercados locais da cidade de São Carlos, SP. As amostras foram liofilizadas e moídas em um moinho criogênico.

**Tabela 4.1. Parâmetros instrumentais empregado para determinação dos elementos essenciais e potencialmente tóxicos em carne por ICP-MS/MS.**

<b>Parâmetro</b>				
<b>Potência da radio-frequência (W)</b>		1550		
<b>Profundidade de amostragem (mm)</b>		10		
<b>Vazão do gás de arraste (L min<sup>-1</sup>)</b>		1,05		
<b>Velocidade da bomba peristáltica (rps)</b>		0,3		
<b>Nebulizador</b>		Micromist		
<b>Câmara de nebulização</b>		Tipo Scott, duplo passo		
		O <sub>2</sub> (shift-mass		
	<i>Single-quad</i>	H <sub>2</sub> (on-mass)	Q <sub>1</sub> → Q <sub>2</sub> )	He (MS/MS)
<b>As</b>	75	75	91	75
<b>Cd</b>	111	111	-	111
<b>Co</b>	59	59	-	59
<b>Cr</b>	53	53	-	53
<b>Mn</b>	55	55	-	55
<b>Mo</b>	98	98	-	98
<b>Pb</b>	208	208	-	208
<b>Sr</b>	88	88	-	88
<b>V</b>	51	51	-	51

### ***4.3.3 Preparo de amostra***

200 mg de amostra foi digerida com uma mistura ácida composta de 6 mL de ácido nítrico (7 mol L<sup>-1</sup>) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um forno com cavidade assistido por radiação micro-ondas. O programa de aquecimento empregado

consistiu em uma rampa de 15 min para atingir 200 °C e um patamar de 15 min em 200 °C.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Seleção dos gases utilizados no sistema octopolar de reação (ORS)

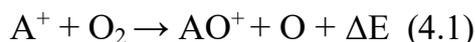
Algumas interferências espectrais e não-espectrais podem ocorrer durante a análise de carne por ICP-MS devido à complexidade das amostras de carne, devido ao alto teor de carbono, cloreto e elementos facilmente ionizáveis (K, Na e Mg). Os possíveis íons poliatômicos e espécies interferentes para os analitos analisados são apresentados na Tabela 4.2.

Observa-se que espécies presentes no plasma como argônio, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio podem formar íons poliatômicos interferentes. Nesse sentido, o arsênio, cromo, cobalto e vanádio são os analitos mais susceptíveis as interferências compostas por Ar, como  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^{1}\text{H}^+$  e  $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$ ,  $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$  e  $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$ . A presença do carbono residual e cloreto presente nos digeridos pode afetar principalmente o  $^{75}\text{As}$  ( $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$  e  $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$ ) e o  $^{51}\text{V}$  ( $^{38}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ ,  $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$  e  $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}^+$ ). Também deve-se ressaltar que o isótopo selecionado para o Cr foi o 53. O  $^{52}\text{Cr}$  é o isótopo mais abundante, porém não foi selecionado devido à alta interferência ocasionada pelas interferências poliatômicas, principalmente  $^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$ .<sup>152</sup>

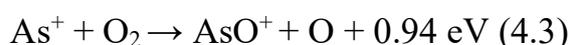
**Tabela 4.2. Possíveis interferências espectrais para os analitos investigados.**

<b>Analito</b>	<b>Interferência espectral</b>
<b><sup>75</sup>As</b>	<sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>39</sup> K, <sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sub>2</sub> , <sup>23</sup> Na <sup>12</sup> C <sup>40</sup> Ar, <sup>12</sup> C <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<b><sup>111</sup>Cd</b>	<sup>95</sup> Mo <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>94</sup> Zr <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>39</sup> K <sub>2</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<b><sup>59</sup>Co</b>	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>42</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>24</sup> Mg <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>23</sup> Na <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<b><sup>53</sup>Cr</b>	<sup>36</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<b><sup>55</sup>Mn</b>	<sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O, <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> OH, <sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> OH, <sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> NH, <sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N, <sup>36</sup> Ar <sup>19</sup> F, <sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> OH, <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O, <sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> OH, <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O
<b><sup>98</sup>Mo</b>	<sup>81</sup> Br <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>41</sup> K <sub>2</sub> <sup>16</sup> O
<b><sup>208</sup>Pb</b>	<sup>192</sup> Pt <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<b><sup>88</sup>Sr</b>	<sup>176</sup> Lu <sup>2+</sup> , <sup>176</sup> Yb <sup>2+</sup>
<b><sup>51</sup>V</b>	<sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>13</sup> C <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>36</sup> S <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>17</sup> O <sup>+</sup>

O uso do oxigênio no sistema de reação octopolar foi investigado para a determinação apenas do arsênio, devido à sua alta afinidade com o átomo de O. Quando o O<sub>2</sub> é empregado no ORS dois mecanismos são possíveis. O primeiro tipo de reação é denominado como transferência de oxigênio, o que consiste na transferência de um átomo de O para o analito (Eq 4.1). Nesse caso, a variação da massa do produto é representada por  $\Delta m = m + 16$ . A segunda reação é chamada de transferência de carga assimétrica (Eq. 4.2). Esse mecanismo é caracterizado pela transferência de carga do oxigênio para o interferente, de forma que esse se torne neutro.<sup>49,149</sup>



Para o As, o uso do O<sub>2</sub> foi explorado no modo *shift-mass* e o mecanismo assumido foi de transferência de oxigênio (Eq 4.3). Como produto monitorado foi o <sup>75</sup>As<sup>16</sup>O<sup>+</sup> (m/z = 91), o primeiro quadrupolo selecionou a m/z = 75, enquanto o segundo selecionou a m/z = 91.<sup>153</sup>



O hidrogênio foi empregado no modo *on-mass*, de modo que os interferentes poliatômicos especialmente compostos por argônio reagissem diretamente com H<sub>2</sub>. Por outro lado, o hélio também foi avaliado, porém, como esse gás é inerte, apenas processos de colisão são obtidos.<sup>49,150</sup> Os interferentes poliatômicos apresentam uma maior probabilidade de colisões com He do que os analitos, devido a seu tamanho. Portanto, esses íons sofrerão alteração na sua energia cinética devido as suas colisões e por meio de uma barreira de potencial esses interferentes não passam para o segundo quadrupolo.<sup>53</sup> Um material de referência certificado de fígado bovino foi analisado e as exatidões obtidas foram utilizadas para verificar qual é o melhor modo de operação (Tabela 4.3). Devido ao Cr não possuir valor certificado nesse CRM, ensaios de adição e recuperação (Tabela 4.4) foram realizados em três níveis: 8, 16 e 32 µg L<sup>-1</sup>. Esses valores foram baseados no teor de Cr na amostra de fígado bovino (625 µg kg<sup>-1</sup>).

Os resultados indicam que para o Cd, Co, Mo, Pb e V não foi necessário o uso de gases na ORS. Nesse caso as recuperações foram: 105% (Cd), 85% (Co), 97% (Mo), 95% (Pb) e 87% (V). Para o As e Cr, o uso do hélio com gás de reação apresentou as melhores exatidões. O emprego do H<sub>2</sub>

apresentou o menor erro para a determinação do Sr sendo obtida recuperação de 104%. No entanto, o uso do He e *single-quad* apresentaram valores próximos. Um teste *t* foi aplicado a 95% de confiança. Apenas para o V e Co foram encontradas diferenças significativas entre os valores determinados e certificados. Esses elementos também apresentaram as recuperações mais baixas, sendo 85% para o Co e 84% para o V. Isso pode estar associado aos efeitos de matriz que não são corrigidos pelo uso do sistema octopolar de reação. Portanto, algumas estratégias como a calibração multi-isotópica, calibração multi-espécies, adição de analito e uso de padronização interna podem ser exploradas para aumentar a exatidão. Os experimentos seguintes foram realizados nas condições que obtiveram menores erros e estão destacados na Tabela 4.3. No entanto, levando em conta que há um tempo para pressurização do sistema octopolar de reação, a determinação de todos os elementos também pode ser realizada empregando o H<sub>2</sub>. Essa alternativa pode ser considerada quando se deseja aumentar a frequência analítica.

**Tabela 4.3. Valores determinados e recuperações obtidos da análise do CRM (1577 b NIST).**

Analito	O <sub>2</sub>				H <sub>2</sub>			He			<i>Single-quad</i>		
	Valor certificado (µg g <sup>-1</sup> )	Valor determinado (µg g <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Valor t	Valor determinado (µg g <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Valor t	Valor determinado (µg g <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Valor t	Valor determinado (µg g <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Valor t
<b>As</b>	0,05*	0,056 ± 0,003	113	3,56	0,057 ± 0,006	113	2,07	0,054 ± 0,006	<b>109</b>	1,22	0,067 ± 0,007	134	3,89
<b>Cd</b>	0,50 ± 0,03	-	-	-	0,52 ± 0,01	105	1,87	0,52 ± 0,003	105	1,87	0,51 ± 0,012	<b>102</b>	1,43
<b>Co</b>	0,25*	-	-	-	0,212 ± 0,01	85	0,01	0,209 ± 0,01	84	4,66	0,213 ± 0,014	<b>85</b>	4,53
<b>Mo</b>	3,5 ± 0,3	-	-	-	3,39 ± 0,27	97	0,27	3,37 ± 0,30	96	0,75	3,38 ± 0,29	<b>97</b>	0,68
<b>Mn</b>	10,5 ± 1,7	-	-	-	10,60 ± 0,40	101	0,12	10,78 ± 0,26	103	1,83	10,48 ± 0,20	<b>100</b>	0,59
<b>Pb</b>	0,129 ± 0,004	-	-	-	0,123 ± 0,002	95	0,02	0,123 ± 0,001	95	0,61	0,123 ± 0,001	<b>95</b>	0,66
<b>Sr</b>	0,136 ± 0,001	-	-	-	0,142 ± 0,009	<b>104</b>	2,52	0,142 ± 0,009	105	2,72	0,145 ± 0,008	107	3,23
<b>V</b>	0,123*	-	-	-	0,100 ± 0,009	81	18,66	0,094 ± 0,007	76	20,48	0,1038 ± 0,01	<b>84</b>	17,91

***Tabela 4.4. Valores determinados e recuperações dos ensaios de adição e recuperação para o Cr.***

Concentração adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<i>Single-quad</i>		He		H <sub>2</sub>	
	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Rec. (%)
8,00	7,49 ± 0,49	94	7,75 ± 0,39	97	9,04 ± 0,10	113
16,0	17,43 ± 0,31	109	17,03 ± 0,38	106	18,76 ± 2,14	117
32,0	32,84 ± 1,35	103	32,48 ± 0,95	102	37,70 ± 1,43	118

#### 4.4.2 Limites de detecção e aplicação

Os limites de detecção foram estimados de acordo com as normativas da IUPAC nos modos operacionais que obtiveram as melhores exatidões (Tabela 4.5). Nesse caso, o LOD foi calculado como três vezes o desvio padrão de dez medidas do branco analítico dividido pela inclinação da curva (coeficiente angular da curva analítica). Os valores variaram de 0,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (As e Cd) a 15,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Mo)

Tabela 4.5. Valores de limites de detecção obtidos empregando o ICP-MS/MS.

Element	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Modo de operação
As	0,1	He
Cd	0,1	<i>Single-quad</i>
Cr	0,8	He
Co	2	<i>Single-quad</i>
Mn	0,2	<i>Single-quad</i>
Mo	16	<i>Single-quad</i>
Pb	0,5	<i>Single-quad</i>
Sr	0,3	H <sub>2</sub>
V	0,4	<i>Single-quad</i>

Seis amostras de carne bovina, ovina e fígado bovino foram digeridas e analisadas por ICP-MS/MS nas condições estabelecidas previamente (Tabela 4.6). Os intervalos de concentração obtidos foram 6,0 – 25,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para As, 0,5 – 86  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Cd, 8,2 – 33  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para V e 150 –

232  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Sr, 4,7 – 81  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o Pb, 4,0 – 16,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Cr e 61,1 – 268  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Mn.

Adicionalmente, o cobalto foi detectado apenas no fígado bovino. A alta concentração de Cd determinado no fígado relaciona-se com a interação desse elemento com metaloproteínas. Adicionalmente, os teores dos contaminantes (As, Cd e Pb) foram abaixo dos limites estabelecidos pela RDC n.42 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os teores reportados na literatura para esses analitos em amostras de carne são apresentados na Tabela 4.7 e observa-se uma boa concordância entre esses valores e os obtidos nesse estudo. A correlação desses elementos foi avaliada empregando 42 amostras de carne bovina. O gráfico de contorno (Fig. 19) apresenta uma alta correlação entre o Cd e o Pb ( $R = 0,8$ ) e entre o Sr e o Cd ( $R = 0,75$ ). Ruby et al.<sup>158</sup> investigaram as correlações entre Cd, Pb e Hg em amostras de fígado e carne de bovinos. Os autores também verificaram uma alta correlação entre o Cd e Pb.

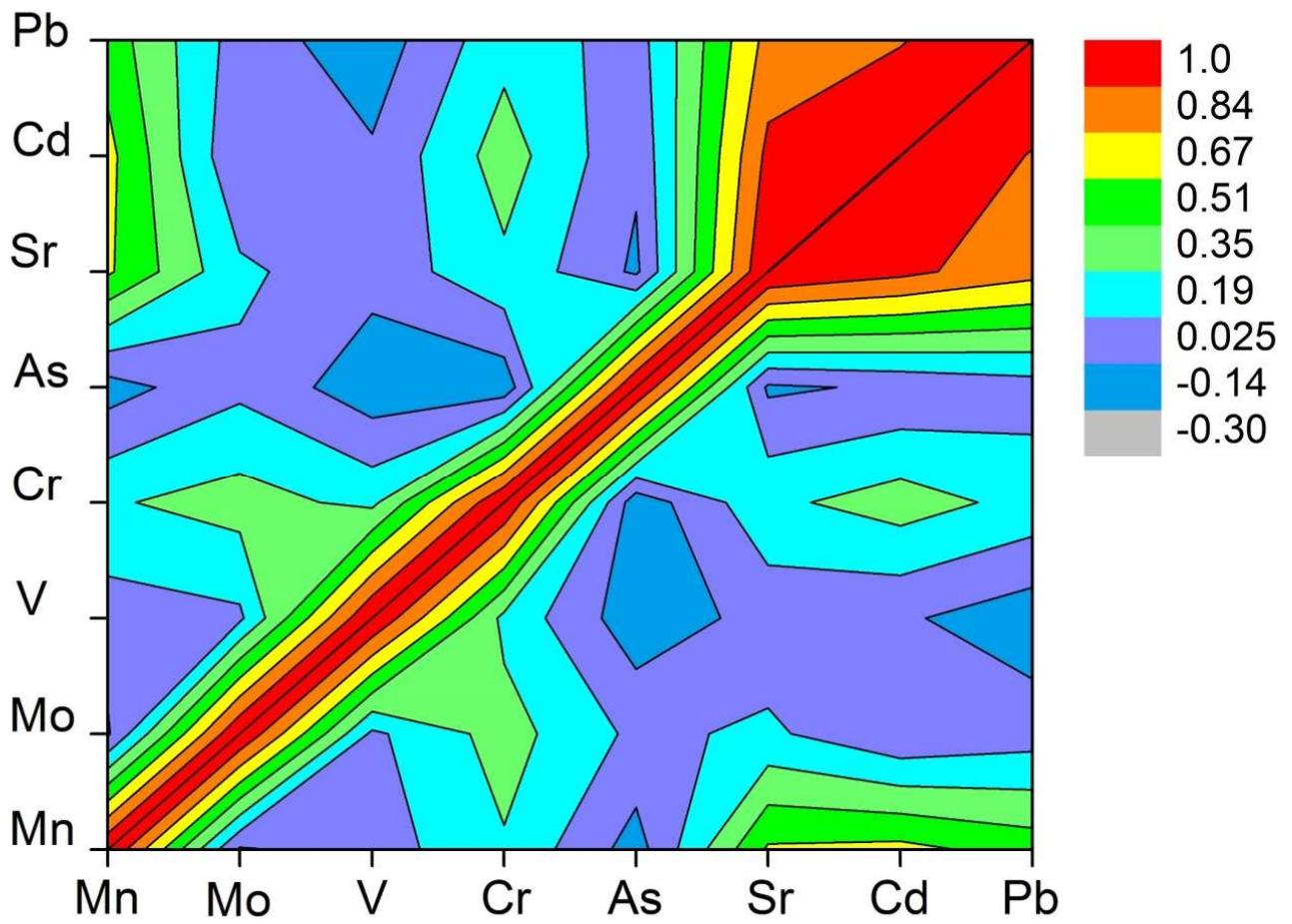


Figura 4.1. Gráfico de correlação para os analitos determinados em amostras de carne bovina (n=42).

Tabela 4.6. Teores dos elementos essenciais e tóxicos em amostras de carne de bovino e ovino.

Amostra	Analitos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )								
	As	Cd	V	Mo	Co	Sr	Pb	Cr	Mn
<b>Fígado bovino</b>	9,5 ± 1,9	86,2 ± 1,1	33,0 ± 0,3	3140,7 ± 39,3	270,4 ± 5,8	232,0 ± 33,1	81,0 ± 16,0	7,8 ± 0,4	61,1 ± 6,8
<b>Músculo bovino 1</b>	10,5 ± 0,4	0,6 ± 0,01	14,5 ± 0,7	41,7 ± 2,9	<LOD	187,5 ± 13,6	4,9 ± 0,4	13,4 ± 0,1	161,4 ± 4,0
<b>Músculo bovino 2</b>	25,2 ± 4,2	0,5 ± 0,01	8,2 ± 0,3	22,2 ± 1,3	<LOD	179,6 ± 19,1	4,9 ± 0,3	5,1 ± 0,1	194,6 ± 4,7
<b>Músculo bovino 3</b>	22,4 ± 0,7	<LOD	8,6 ± 0,90	42,0 ± 4,5	<LOD	161,7 ± 9,0	4,7 ± 0,6	6,7 ± 0,8	235,0 ± 0,4
<b>Músculo bovino 4</b>	16,9 ± 0,4	9,2 ± 0,7	11,1 ± 0,4	52,1 ± 6,5	<LOD	217,2 ± 39,4	8,1 ± 0,2	4,0 ± 0,1	195,7 ± 2,8
<b>Músculo ovino</b>	6,0 ± 1,0	0,90 ± 0,04	8,3 ± 0,90	37,9 ± 4,7	<LOD	149,9 ± 10,5	<LOD	16,8 ± 0,5	268,6 ± 2,1

Tabela 4.7. Teores dos elementos essenciais e tóxicos em amostras de carne reportados na literatura.

Amostra	As (mg kg <sup>-1</sup> )	Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	V (mg kg <sup>-1</sup> )	Sr (mg kg <sup>-1</sup> )	Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Referência
Ovino	-	0,030 ± 0,001	-	-	-	0,19 ± 0,01	0,58 ± 0,03	-	-	5
Bovino	-	0,027 ± 0,002	-	-	-	0,12 ± 0,01	0,30 ± 0,010	-	-	5
Ovino	0,0028 ± 0,0002	<0,00006	-	-	-	0,0026 ± 0,001	0,0051 ± 0,0001	<0,10	-	154
Bovino	0,0050 ± 0,0011	< 0,002	-	-	-	3,530 ± 0,059	-	-	0,179 ± 0,05	21
Bovino	0,0035 ± 0,0009	0,0036 ± 0,0008	-	-	-	0,774 ± 0,043	-	-	0,061 ± 0,008	21
Fígado bovino	-	0,1 – 0,9	-	-	0,05 – 0,08	0,1 – 1,4	0,1 – 5,3	-	0,1 – 22,3	155
Bovino	-	-	0,002 – 0,003	0,007 – 2,88	-	-	-	-	-	156
Ovino	0,078 – 0,0157	0,005 – 0,033	-	-	0,010 – 0,018	-	0,006 – 0,2	-	0,006 – 0,2	111
Bovino	-	-	-	-	-	-	-	0,50 ± 0,16	-	157

## 4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O uso da espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem foi eficiente para determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de carne. O método analítico desenvolvido empregando o ICP-MS/MS apresentou uma exatidão satisfatória com recuperações entre 84 – 109% e uma sensibilidade adequada. Adicionalmente, o uso do He como gás de colisão proporcionou uma melhora da exatidão para o arsênio e cromo. O emprego do H<sub>2</sub> no sistema octopolar de reação apresentou o menor erro durante a quantificação do Sr. Por outro lado, para a determinação dos outros analitos, como Cd, Co, Mo, Mn, Pb e V, não foi necessário o uso de gases na ORS. Os limites de detecção obtidos nos melhores modos de operação variaram de 0,1 µg kg<sup>-1</sup> (Cd e As) a 15,8 µg kg<sup>-1</sup> (Mo). Amostras de carne bovinas foram analisadas e foi observada uma alta correlação para o Cd - Sr e Cd - Pb.

## ***Conclusões Finais***

---

## CONCLUSÕES FINAIS

De um modo geral, o MIP OES apresentou um bom desempenho analítico para análise elementar de carne. Nesse caso, as estratégias exploradas possibilitaram novas aplicações, portanto, perspectivas poderão ser abordadas a partir desses resultados. Também foi observado como o sistema de introdução de amostra, pode influenciar significativamente durante a análise. Nesse contexto, a aplicação da correção de sinal foi necessária para a quantificação de fósforo na fração lipídica, pois a recuperação obtida pela calibração externa foi insatisfatória e um severo efeito de matriz foi observado. O uso da correção de sinal com a espécie molecular OH e padrão interno apresentou-se como alternativa para melhorar a exatidão dessas análises. Os limites de detecção obtidos nesses métodos foram 2,5 e 2,7 mg 100 g<sup>-1</sup> de amostra com o uso do OH e Te, respectivamente, como padrões internos. Também deve-se ressaltar a necessidade do emprego do módulo de controle de gás externo (EGCM), o qual possibilitou a introdução direta de solventes orgânicos no plasma de nitrogênio.

O procedimento combinando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e o MIP OES apresentou um bom desempenho analítico para a determinação de Mo em carnes. Nesse estudo, o planejamento de mistura permitiu a adequada seleção do solvente extrator e dispersor, os quais foram o tetracloreto de carbono e o metanol, respectivamente. Adicionalmente, os parâmetros da DLLME foram otimizados por meio de um planejamento Box-Behnken. Esse procedimento apresentou exatidão e sensibilidade satisfatórias. O uso do EGCM também foi requerido nessas análises devido a introdução de metanol. Adicionalmente, esse acessório possibilitou a elevação da frequência analítica, pois nenhuma etapa adicional é requerida para eliminação do solvente.

Os efeitos dos nebulizadores comerciais no plasma de nitrogênio foram avaliados em função dos parâmetros fundamentais no plasma, tais como precisão, exatidão e sensibilidade. Observa-se que o tipo de nebulizador afeta a temperatura e a densidade eletrônica. Adicionalmente, esses dados se relacionaram com a eficiência de transporte de solvente. O nebulizador OneNeb series 2 apresentou uma boa precisão para a maioria das matrizes analisadas, enquanto o nebulizador concêntrico teve os maiores valores de desvios padrão relativos. Considerando a aplicação desses nebulizadores, observa-se que OneNeb series 1 é o nebulizador mais comumente utilizado para diversas amostras (alimentos, ambientais e com solventes orgânicos) para MIP OES.

Para a análise de carne por ICP-MS/MS, inicialmente, foi realizado um estudo para avaliar o melhor modo de operação. Nesse caso, para a maioria dos analitos (Cd, Co, Mo, Pb e V) o modo *single-quad* apresentou recuperações satisfatórias. Para o As e o Cr, o He empregado no sistema octopolar de reação resultou em aumento da exatidão e a pressurização com H<sub>2</sub> apresentou menores erros. Adicionalmente, o procedimento envolvendo o ICP-MS/MS apresentou uma sensibilidade adequada.

## Referências

---

## REFERÊNCIAS

1. VAHMANI, P.; PONNAMPALAM, E. N.; KRAFT, J.; et al. Bioactivity and health effects of ruminant meat lipids. Invited Review. *Meat Science*, 165, 108 - 114, 2020.
2. SULEMAN, R.; WANG, Z.; MUHAMMAD, R.; HUI, T.; HOPKINS, D. L. Effect of cooking on the nutritive quality, sensory properties and safety of lamb meat: Current challenges and future prospects. *Meat Science*, 167 (1), 2020.
3. OECD, Meat consumption (indicator), 2020. doi: 10.1787/fa290fd0-en
4. ABIEC, Beef report, 2019. Disponível em <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>
5. HIGUERA, J.M.; SILVA, A. B. S. D.; DE OLIVEIRA, A. F.; DE ARAUJO NOGUEIRA, A. R. Multi-elemental determination in meat samples using multi-isotope calibration strategy by ICP-MS. *Food Chemistry*, 303, 2020.
6. PICARD, B., GAGAOUA M. Current Advances in Meat Nutritional, Sensory and Physical Quality Improvement. *Foods*, 9, 2020.
7. LÓPEZ-ALONSO, M.; MIRANDA, M.; CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-VAQUERO, M.; BENEDITO, J. L. Toxic and essential metals in liver, kidney, and muscle of pigs at slaughter in Galicia, north-west Spain. *Food Additives and Contaminants*, 24, 943–954, 2007.
8. MENEZES, E. A.; OLIVEIRA, A. F.; FRANÇA, C. J.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. *Food Chemistry*, 240, 75–83, 2018.
9. WESSELS, I., MAYWALD, M., RINK, L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function, *Nutrients*, 9, 9–12, 2017.

10. MERTZ, W. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, 1986.
11. SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 460, 839–847, 2009.
12. ANGELOVA, M.; ASENOVA, S.; NEDKOVA, V.; KOLEVA-KOLAROVA, R. Copper in the human organism. *Trakia Journal of Sciences*, 9 (1), 88–98, 2011.
13. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013.
14. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/11537.html>
15. HIGUERA, J. M.; SILVA, A. B. S.; NOGUEIRA, A. R. A. Multi-energy calibration: A practical method for determination of macro and micronutrients in meat by ICP OES. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12, 2575-2581 2019.
16. SOUZA, B. R., PESTANA I. A., CALDAS, D., AZEVEDO, L. S., ALMEIDA, M. G., SOUZA, C. M. M. Exposure to toxic and essential trace elements through the intake of processed and meat cuts (beef and chicken) in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191 (8), 477-485, 2019.
17. MEERMANN, B.; NISCHWITZ, V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale-a tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (9), 1432–1468, 2018.
18. GROTTI, M.; TODOLÍ, J. L. Nitric acid effect in inductively coupled plasma mass spectrometry: new insights on possible causes and correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35, 1959-1968, 2020.

19. GERBER, N., BROGIOLI, R., HATTENDORF, B., SCHEEDER, M., WENK, C., & GÜNTHER, D. Variability of selected trace elements of different meat cuts determined by ICP-MS and DRC-ICPMS. *Animal*, 3 (1), 166–172, 2009.
20. LUM, T. S.; SZE-YIN LEUNG, K. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31 (5), 1078–1088, 2016.
21. SÁ, I. P.; HIGUERA, J. M.; COSTA, V. C.; COSTA, J. A. S., SILVA, C. M. P., NOGUEIRA, A. R. A. Determination of Trace Elements in Meat and Fish Samples by MIP OES Using Solid-Phase Extraction. *Food Analytical Methods*, 13, 238–248, 2020.
22. PINTO, A. M. T. P.; BOEIRA, A. C. S.; LISBOA, M. T.; MEDINA, A., RIBEIRO, A. S., VIEIRA, M. A. Development of an Analytical Method for the Determination of Metals in Chicken Breast by Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP-OES). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 30 (11), 2395–2403, 2019.
23. GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, 1097–1104, 2016.
24. WILLIAMS, C. B.; AMAIS, R. S.; FONTOURA, B. M.; JONES, B. T.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 116, 151–157, 2019.
25. VIRGILIO, A.; GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 982, 31–36, 2017.

26. MACHADO, R. C.; SILVA, A. B. S.; DONATI, G. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Multi-energy calibration as a strategy for elemental analysis of fertilizers by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (7), 1168–1172, 2018.
27. WILLIAMS, C. B.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Multi-flow calibration applied to microwave- induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34, 1191–1197, 2019.
28. LOWERY, K. L.; MCSWEENEY, T.; ADHIKARI, S. P.; LACHGAR, A.; DONATI, G. L. Signal correction using molecular species to improve biodiesel analysis by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 129, 58–62, 2016.
29. COBINE, J. D.; WILBUR, D. A. The Electronic Torch and Related High Frequency Phenomena. *Journal of Applied Physics*, 22 (6), 835 - 841, 1951.
30. JAKUBOWSKI, K., RESZKE, E. Microwave induced plasma optical emission spectrometry, *RSC Analytical Spectroscopy*, 2011.
31. BEENAKKER, C. I. M. A cavity for microwave-induced plasmas operated in helium and argon at atmospheric pressure. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 31, 483–486, 1976.
32. MÜLLER, A., POZEBON, D., V. L. DRESSLER. Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*
33. NIEDZIELSKI, P., KOZAK, L., WACHELKA, M., JAKUBOWSKI, K. E WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP–OES) in 23 elements determination in geological samples, *Talanta*, 132, 591–599, 2015.

34. CARTER, J. A.; LONG, C. S.; SMITH, B. P.; SMITH, T. L.; DONATI, G. L. Combining elemental analysis of toenails and machine learning techniques as a non-invasive diagnostic tool for the robust classification of type-2 diabetes. *Expert Systems with Applications*, 115, 245–255, 2019.
35. WILLIAMS, C. B., WITTMANN, T. G., MCSWEENEY, T., ELLIOTT, P., JONES, B. T., DONATI, G. L. Dry ashing and microwave-induced plasma optical emission spectrometry as a fast and cost-effective strategy for trace element analysis, *Microchemical Journal*, 132, 15–19, 2017.
36. OZBEK, N.; AKMAN, S. Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties, *Food Chemistry*, 192, 295–298, 2016.
37. SERRANO, R.; GRINDLAY, G.; GRAS, L.; MORA, J. Evaluation of calcium, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: comparison with ICP-OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34, 1611–1617, 2019.
38. CARTER, J.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Frontiers in Chemistry*, 6, 1–25, 2018.
39. PIRES, L. N.; DIAS, F. D. S.; TEIXEIRA, L. S. G. *Analytica Chimica Acta* Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1090, 31–38, 2019.

40. MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se and Sn by microwave induced plasma spectrometry using a quadruple-mode microflow ultrasonic nebulizer for in situ hydride generation with internal standardization. *Microchemical Journal*, 131, 70–78, 2017.
41. GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 909, 24–29, 2016.
42. OLIVEIRA, A. F.; GONZALEZ, M. H.; NOGUEIRA, A. R. A. Use of multiple lines for improving accuracy, minimizing systematic errors from spectral interferences, and reducing matrix effects in MIP OES measurements. *Microchemical Journal*, 143, 326–330, 2018.
43. ALTHOFF, A. G.; WILLIAMS, C. B.; MCSWEENEY, T.; GONÇALVES, D. A.; DONATI, G. L. Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES) and Standard Dilution Analysis to Determine Trace Elements in Pharmaceutical Samples, 71 (12), 2692–2698, 2017.
44. CHALYAVI, N.; DOIDGE, P. S.; MORRISON, R. J. S.; PARTRIDGE, G. B. Fundamental studies of an atmospheric-pressure microwave plasma sustained in nitrogen for atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32 (10), 1988–2002, 2017
45. WILLIAMS, C. B.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Naturally occurring molecular species used for plasma diagnostics and signal correction in microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33, 1224–1232, 2018.

46. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. Fundamentals and new approaches to calibration in atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34, 2353–2369, 2019.
47. VIRGILIO, A.; SILVA, A. B. S.; NOGUEIRA, R. A.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Calculating limits of detection and defining working ranges for multi-signal calibration methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35, 1614–1620, 2020.
48. LIZETH, T.; CRUZ, E.; ESPERANZA, M. G.; WROBEL, K. K.; BARRIENTOS, E. Y.; JAVIER, F.; AGUILAR, A.; WROBEL, K. K. Determination of major and minor elements in Mexican red wines by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, evaluating different calibration methods and exploring potential of the obtained data in the assessment of wine provenance. *Spectrochimica Acta Part B*, 164, 105754, 2020.
49. BALCAEN, L.; BOLEA-FERNANDEZ, E.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. *Analytica Chimica Acta* Inductively coupled plasma e Tandem mass spectrometry (ICP-MS / MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra) trace elements: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 894, 7–19, 2015.
50. MACHADO, R. C.; AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; ARAUJO NOGUEIRA, A. R. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (23), 4839–4842, 2017.

51. KOMOROWICZ, I.; SAJNÓG, A.; BARAŁKIEWICZ, D. Total Arsenic and Arsenic Species Determination in Freshwater Fish by ICP-DRC-MS and HPLC/ICP-DRC-MS Techniques, *Molecules*, 24, 607, 2019.
52. ALIAGA-CAMPUZANO, M. P.; BERNAL, J. P.; BRICEÑO-PRIETO, S. B.; PÉREZ-ARVIZU, O.; LOUNEJEVA, E. Direct analysis of lanthanides by ICPMS in calcium-rich water samples using a modular high-efficiency sample introduction system-membrane desolvator. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (7), 1102–1109, 2013.
53. YAMADA, N. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 110, 31–44, 2015.
54. AMARAL, C. D. B.; MACHADO, R. C.; BARROS, J. A. V. A.; VIRGILIO, A., SCHIAVO, D., NOGUEIRA, A. R. A., NOBREGA, J. A. Determination of rare earth elements in geological samples by ICP-OES. *Spectroscopy*, 32 (10), 32–36, 2017.
55. CHERVIAKOUSKI, K. I. A New Method of Mathematical Correction of the Results of Analysis, Obtained by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Ensuring the Elimination of the Interference of Doubly Charged Ions. *Journal of Analytical Chemistry*, 72 (14), 1434–1440, 2017.
56. LEŚNIEWSKA, B.; ARCISZEWSKA, Ż.; WAWRZYŃCZAK, A.; JARMOLIŃSKA, S., NOWAK, I., GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B. Method development for determination of trace amounts of palladium in environmental water samples by ICP-MS/MS after pre-concentration on thiol-functionalized MCM-41 materials. *Talanta*, 217, 2020.

57. XING, S.; LUO, M.; WU, Y.; LIU, D.; DAI, X. Rapid determination of uranium isotopes in calcium fluoride sludge by tandem quadrupole ICP-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34 (10), 2027–2034, 2019.
58. FU, L.; SHI, S. A novel strategy to determine the compositions of inorganic elements in fruit wines using ICP-MS / MS. *Food Chemistry*, 299, 125172, 2019.
59. BALCAEN, L.; BOLEA-FERNANDEZ, E.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. *Analytica Chimica Acta* Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS / MS. *Analytica Chimica Acta*, 809, 1–8, 2014.
60. AMAIS, R. S.; AMARAL, C. D. B.; FIALHO, L. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of P, S and Si in biodiesel, diesel and lubricating oil using ICP-MS/MS. *Analytical Methods*, 6 (13), 4516–4520, 2014.
61. AMARAL, C. D. B.; AMAIS, R. S.; FIALHO, L. L.; SCHIAVO, D.; AMORIM, T.; NOGUEIRA, A. R. A.; ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. A novel strategy to determine As, Cr, Hg and v in drinking water by ICP-MS/MS. *Analytical Methods*, 7 (3), 1215–1220, 2015.
62. AMAIS, R. S.; VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS) for overcoming molybdenum oxide interferences on Cd determination in milk. *Microchemical Journal*, 120, 64–68, 2015.
63. HU, X.; CAO, Z.; SUN, W.; YANG, H.; XU, P.; ZHU, Z. Accurate determination of arsenic and selenium in plant food samples by using ICP-MS/MS. *Analytical Methods*, 8 (32), 6150–6157, 2016.
64. LABRECQUE, C.; LEBED, P. J.; LARIVIÈRE, D. Isotopic signature of selected lanthanides for nuclear activities profiling using cloud point extraction and ICP-MS/MS. *Journal of Environmental Radioactivity*, 155–156, 15–22, 2016.

65. CAO, L.; ZHENG, J.; TSUKADA, H.; PAN, S.; WANG, Z.; TAGAMI, K.; UCHIDA, S. Simultaneous determination of radiocesium ( $^{135}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ) and plutonium ( $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{240}\text{Pu}$ ) isotopes in river suspended particles by ICP-MS/MS and SF-ICP-MS. *Talanta*, 159, 55-63, 2016.
66. PINHEIRO, F. C.; AMARAL, C. D. B.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of Arsenic in Fruit Juices Using Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry (ICP-MS/MS). *Food Analytical Methods*, 10 (4), 992–998, 2017.
67. BARROS, J. A. V. A.; VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of ultra-trace levels of Mo in plants by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). *Microchemical Journal*, 133, 567–571, 2017.
68. SUBASHCHANDRABOSE, S.; PEREIRA-FILHO, E. R.; DONATI, G. L. Trace element analysis of urine by ICP-MS/MS to identify urinary tract infection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32 (8), 1590–1594, 2017.
69. MEYER, S.; MARKOVA, M.; POHL, G.; MARSCHALL, T. A.; PIVOVAROVA, O.; PFEIFFER, A. F. H.; SCHWERDTLE, T. Development, validation and application of an ICP-MS/MS method to quantify minerals and (ultra-)trace elements in human serum. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 157–163, 2018.
70. JACKSON, S. L.; SPENCE, J.; JANSSEN, D. J.; ROSS, A. R. S.; CULLEN, J. T. Determination of Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in seawater using offline extraction and triple quadrupole ICP-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (2), 304–313, 2018.

71. YANG, G.; TAZOE, H.; YAMADA, M. Improved approach for routine monitoring of  $^{129}\text{I}$  activity and  $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$  atom ratio in environmental samples using TMAH extraction and ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 1008, 66–73, 2018.
72. FU, L.; XIE, H.; SHI, S. Multielement analysis of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. essential oil using ICP-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (16), 3769–3778, 2018.
73. GALUSHA, A. L.; HAIG, A. C.; BLOOM, M. S.; KRUGER, P. C.; MCGOUGH, A.; LENHART, N.; WONG, R.; FUJIMOTO, V. Y.; MOK-LIN, E.; PARSONS, P. J. Ultra-trace element analysis of human follicular fluid by ICP-MS/MS: pre-analytical challenges, contamination control, and matrix effects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34 (4), 741–752, 2019.
74. HOU, X.; ZHANG, W.; WANG, Y. Determination of Femtogram-Level Plutonium Isotopes in Environmental and Forensic Samples with High-Level Uranium Using Chemical Separation and ICP-MS/MS Measurement. *Analytical Chemistry*, 91 (18), 11553–11561, 2019.
75. ARI, A.; ARI, P. E.; GAGA, E. O. Chemical characterization of size-segregated particulate matter (PM) by inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). *Talanta*, 208, 120350, 2020.
76. ARI, B.; CAN, S. Z.; BAKIRDERE, S. Traceable and accurate quantification of iron in seawater using isotope dilution calibration strategies by triple quadrupole ICP-MS/MS: Characterization measurements of iron in a candidate seawater CRM. *Talanta*, 209, 120503, 2020.
77. BENINI, O.; SABA, A.; FERRETTI, V.; GIANFALDONI, D.; KALANTAR-ZADEH, K. Development and Analytical Evaluation of a Spectrophotometric

Procedure for the Quantification of Different Types of Phosphorus in Meat Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (6), 1247–1253, 2014.

78. VORLAND, C. J.; STREMKER, E. R.; MOORTHY, R. N.; HILL GALLANT, K. M. Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health. *Current Osteoporosis Reports*, 15 (5), 473–482, 2017.

79. SZŁYK, E.; HRYNCZYSZYN, P. Phosphate additives determination in meat products by <sup>31</sup>-phosphorus nuclear magnetic resonance using new internal reference standard: Hexamethylphosphoramide. *Talanta*, 84 (1), 199–203, 2011.

80. VERVLOET, M. G.; SEZER, S.; MASSY, Z. A. The role of phosphate in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13 (1), 27–38, 2017.

81. SINGH, R. P.; GANGADHARAPPA, H. V.; MRUTHUNJAYA, K. Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39, 166–179, 2017.

82. BUSZEWSKI, B.; WALCZAK, J.; ŽUVELA, P.; LIU, J. J. Non-target analysis of phospholipid and sphingolipid species in egg yolk using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1487, 179–186, 2017.

83. SHRIVAS, K.; TAPADIA, K. Ionic liquid matrix-based dispersive liquid-liquid microextraction for enhanced MALDI-MS analysis of phospholipids in soybean. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1001, 124–130, 2015.

84. BAÜMLER, E. R.; CARRÍN, M. E.; CARELLI, A. A. Diffusion of tocopherols, phospholipids and sugars during oil extraction from sunflower collets using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 194, 1–8, 2017.
85. BARRY, K. M.; DINAN, T. G.; MURRAY, B. A.; KELLY, P. M. Comparison of dairy phospholipid preparative extraction protocols in combination with analysis by high performance liquid chromatography coupled to a charged aerosol detector. *International Dairy Journal*, 56, 179–185, 2016.
86. NEETHLING, J.; HOFFMAN, L. C.; MULLER, M. Factors influencing the flavour of game meat: A review. *Meat Science*, 113, 139–153, 2016.
87. DONALD S. M. Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62 (4) 415–424, 1998.
88. MOTTRAM, D. S.; EDWARDS, R. A. The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34 (5), 517-522, 1983.
89. FIORI, M.; SCINTU, M. F.; ADDIS, M. Characterization of the Lipid Fraction in Lamb Meat: Comparison of Different Lipid Extraction Methods. *Food Analytical Methods*, 6 (6), 1648–1656, 2013.
90. WANG, T.; ZHOU, D. Advances in phospholipid quantification methods. *Current Opinion in Food Science*, 16, 15–20, 2017.
91. SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A. MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process. *Food Chemistry*, 105, 1179–1187, 2007.
92. SOTIRHOS, N.; HERSLÖF, B.; KENNE, L. Quantitative analysis of phospholipids by <sup>31</sup>P-NMR. *Journal of Lipid Research*, 27 (4), 386–92, 1986.

93. PIRES, L. N.; BRANDÃO, G. C.; TEIXEIRA, L. S. G. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 225, 162–166, 2017.
94. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), 497-509, 1957.
95. WILTSCHE, H.; WINKLER, M.; TIRK, P. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, 2223–2234, 2015.
96. LECLERCQ, A.; NONELL, A.; TODOLÍ, J. L.; BRESSON, C.; VIO, L.; VERCOUTER, T.; CHARTIER, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations, *Analytica Chimica Acta*, 885, 33–56, 2015.
97. LECLERCQ, A.; NONELL, A.; TODOLÍ, J. L.; BRESSON, C.; VIO, L.; VERCOUTER, T.; CHARTIER, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations, *Analytica Chimica Acta*, , 885, 57–91. 2015
98. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (5), 755, 2013.

99. KULIKOV, E. Determination of major elements in methanol using the Agilent 4200 MP - AES with External Gas Control Module. Application note.
100. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (5), 755, 2013.
101. SMIRNOVA, S. V.; SAMARINA, T. O.; ILIN, D. V.; PLETNEV, I. V. Multielement Determination of Trace Heavy Metals in Water by Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry after Extraction in Unconventional Single-Salt Aqueous Biphasic System. *Analytical Chemistry*, 90 (10), 6323–6331, 2018.
102. GUERRERO ESPERANZA, M.; YANEZ BARRIENTOS, E.; WROBEL, KAZIMIERZ; AGUILAR, F. J. A., ESCOBOSA, A. R., C., WROBEL, K. Determination of total arsenic and speciation analysis in Mexican maize tortillas by hydride generation – microwave plasma atomic emission spectrometry and high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9 (13), 2059–2068, 2017.
103. NELSON, J.; GILLELAND, G.; POIRIER, L.; LEONG, D.; HAJDU, P.; LOPEZ-LINARES, F. Elemental Analysis of Crude Oils Using Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Energy & Fuels*, 29 (9), 5587–5594, 2015.

104. SANTOS, M. A.; SILVA, A. B. S.; MACHADO, R. C.; DIAS, E. A.; BARROS, J. A.V. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Silicon determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry: Considerations and strategies for the use of tetrafluorboric acid and sodium hydroxide in sample preparation procedures. *Spectrochimica Acta Part B*, 167, 105842, 2020.
105. GRINDLAY, G.; GRAS, L.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. DE. Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 115, 8–15, 2016.
106. GRINDLAY, G.; MORA, J.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma – mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 42–49, 2013.
107. TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S; POOS, M. Dietary reference intakes: Vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*; 101, 294-301, 2001.
108. SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. Molybdenum in natural waters: A review of occurrence, distributions and controls. *Applied Geochemistry*, 84, 387–432, 2017.
109. PICHLER, T.; KOOPMANN, S. Should Monitoring of Molybdenum (Mo) in Groundwater, Drinking Water and Well Permitting Made Mandatory? *Environmental Science and Technology*, 54, 1–2, 2019.

110. MERTZ, W. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, 1986.
111. MACLACHLAN, D. J.; BUDD, K.; CONNOLLY, J.; DERRICK, J.; PENROSE, L.; TOBIN, T. Arsenic, cadmium, cobalt, copper, lead, mercury, molybdenum, selenium and zinc concentrations in liver, kidney and muscle in Australian sheep. *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 97–107, 2016.
112. MACHADO, R. C.; AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; ARAUJO NOGUEIRA, A. R. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (23), 4839–4842, 2017.
113. LIMA, A. F.; COSTA, M. C. DA; FERREIRA, D. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Fast ultrasound-assisted treatment of inorganic fertilizers for mercury determination by atomic absorption spectrometry and microwave-induced plasma spectrometry with the aid of the cold-vapor technique. *Microchemical Journal*, 118, 40–44, 2015.
114. MOREIRA, L. S.; SÁ, I. P.; MACHADO, R. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; SILVA, E. G. P.; AMARAL, C. D. B. Coprecipitation magnesium(II) hydroxide as a strategy of pre-concentration for trace elemental determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 169, 105899, 2020.
115. MOUSAVI, L.; TAMIJI, Z.; KHOSHAYAND, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta*, 190, 335–356, 2018.

116. SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid Microextraction Techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2027–2066, 2014.
117. SIXTO, A.; MOLLO, A.; KNOCHEN, M. Fast and simple method using DLLME and FAAS for the determination of trace cadmium in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103229, 2019.
118. LOURENÇO, E. C.; EYNG, E.; BITTENCOURT, P. R. S.; DUARTE, F. A., PICOLOTO, R. S., FLORES, E. L. M. A simple, rapid and low cost reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel. *Talanta*, 199, 1–7, 2019.
119. MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. *Talanta*, 170, 22–35, 2017.
120. SERRANO, R.; GRINDLAY LLEDÓ, G.; NIEDZIELSKI, P.; GRAS, L.; MORA, J. Evaluation of MIP-OES as a detector in DLLME procedures. Application to the Cd determination in water samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35, 1351-1359, 2020.
121. OHATA, M.; OTA, H.; FUSHIMI, M.; FURUTA, N. Effect of adding oxygen gas to a high power nitrogen microwave-induced plasma for atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 55, 1551–1564, 2000.
122. MACHADO, I.; TISSOT, F. Dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration alternative to increase ETAAS sensitivity in the analysis of molybdenum in bovine meat and pasture samples. *Talanta*, 12, 120783, 2020.

123. TUZEN, M.; SHEMSI, A. M.; BUKHARI, A. A. Vortex-Assisted Solidified Floating Organic Drop Microextraction of Molybdenum in Beverages and Food Samples Coupled with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 219–226, 2017.
124. BARROS, J. A. V. A.; VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of ultra-trace levels of Mo in plants by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). *Microchemical Journal*, 133, 567–571, 2017.
125. OVIEDO, J. A.; FIALHO, L. L.; NÓBREGA, J. A. Determination of molybdenum in plants by vortex-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction and flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 86, 142–145, 2013.
126. MONTIEL, J.; GRINDLAY, G.; GRAS, L.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. DE; MORA, J. The influence of the sample introduction system on signals of different tin compounds in inductively coupled plasma-based techniques. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 81, 36–42, 2013.
127. BINGS, N. H.; ORLANDINI VON NIESSEN, J. O.; SCHAPER, J. N. Liquid sample introduction in inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry - Critical review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 100, 14–37, 2014.
128. ALMAGRO, B.; GAÑÁN-CALVO, A. M.; CANALS, A. Preliminary characterization and fundamental properties of aerosols generated by a flow focusing pneumatic nebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 1340–1346, 2004.

129. ALMAGRO, B.; GAÑÁN-CALVO, A. M.; HIDALGO, M.; CANALS, A. Behaviour of a flow focusing pneumatic nebulizer with high total dissolved solids solution on radially- and axially-viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 1072–1075, 2006.
130. CANALS, A., AGUIRRE, M. A. Roles of Nebulizers in Analytical Chemistry - Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation. John Wiley & Sons, 2015.
131. MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M.; HIDALGO, M.; CANALS, A. Evaluation of various nebulizers for use in microwave induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (9), 1174–1178, 2007.
132. ŚLACHCIŃSKI, M. Slurry micro-sampling technique for use in argon-helium microwave induced plasma optical emission spectrometry, *Talanta*, 161, 812–818, 2016.
133. GAÑÁN-CALVO, A. M. Enhanced liquid atomization: From flow-focusing to flow-blurring. *Applied Physics Letters*, 86, 21, 1–3, 2005.
134. AZCARATE, S. M.; LANGHOFF, L. P.; CAMIÑA, J. M.; SAVIO, M. A green single-tube sample preparation method for wear metal determination in lubricating oil by microwave induced plasma with optical emission spectrometry. *Talanta*, 195, 573–579, 2019.
135. TODOLI, J. L., MERMET, J. M. *Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry*. Elsevier Science, 2018.
136. Enhanced Parallel Path Method, Burgener Research Inc. Disponível em: <http://burgenerresearch.com/MiraMistManual.html>

137. OneNeb series 1, Agilent Technologies. Disponível:  
<https://www.agilent.com/en/promotions/oneneb>.
138. OneNeb series 2, Agilent Technologies. Disponível:  
<https://www.agilent.com/en/products/icp-oes/icp-oes-supplies/nebulizers/icp-oes-oneneb-series-2-nebulizer>
139. LI, W.; SIMMONS, P.; SHRADER, D.; HERRMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, 112, 43–48, 2013.
140. KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). *Talanta*, 135, 124–132, 2015.
141. MATUSIEWICZ, H; ALMAGRO, B; CANALS, A. Evaluation of Various Types of Micronebulizers and Spray Chamber Configurations for Microsamples Analysis by Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. *Chemia Analityczna*, 54, 1219 - 1244, 2007.
142. GALLEGO RÍOS, S. E.; PEÑUELA, G. A.; RAMÍREZ BOTERO, C. M. Method Validation for the Determination of Mercury, Cadmium, Lead, Arsenic, Copper, Iron, and Zinc in Fish Through Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES). *Food Analytical Methods*, 10, 3407–3414, 2017.
143. SILVA, A. B. S.; HIGUERA, J. M.; NOGUEIRA, A. R. A. Internal standardization and plasma molecular species: signal correction approaches for determination of phosphorus from phospholipids in meat by MIP OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34 (4), 782–787, 2019.

144. OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 200, 245–248, 2016
145. LEME, F. O.; SILVESTRE, D. M.; NASCIMENTO, A. N.; NOMURA, C. S. Feasibility of using laser induced breakdown spectroscopy for quantitative measurement of calcium, magnesium, potassium and sodium in meat. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (8), 1322–1329, 2018.
146. XIAO, G.; LIU, Y.; JONES, R. L. Determination of  $^{237}\text{Np}$  and  $^{239}\text{Pu}$  in urine using sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (SF-ICP-MS). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 324 (2), 887–896, 2020.
147. PATTERSON, K. Y. Measurement of calcium stable isotope tracers using cool plasma ICP-MS. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 14 (11), 1673–1677, 1999.
148. CIAVARDELLI, D.; CONSALVO, A.; CALDARALO, V.; DI VACRI, M. L.; NISI, S.; CORONA, C.; FRAZZINI, V.; SACCHETTA, P.; URBANI, A.; DI ILIO, C.; SENSI, S. L. Characterisation of element profile changes induced by long-term dietary supplementation of zinc in the brain and cerebellum of 3xTg-AD mice by alternated cool and normal plasma ICP-MS. *Metallomics*, 12, 1321–1332, 2012.
149. BOLEA-FERNANDEZ, E.; BALCAEN, L.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Overcoming spectral overlap: Via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 32, 1660-1679, 2017.

150. SUGIYAMA, N.; NAKANO, K. Reaction data for 70 elements using O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub> gases with the Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS. Agilent Technologies - Technical note.
151. PETROV, P., RUSSELL, B., DOUGLAS, D. N., GOENAGA-INFANTE, H. Interference-free determination of sub ng kg<sup>-1</sup> levels of long-lived <sup>93</sup>Zr in the presence of high concentrations (µg kg<sup>-1</sup>) of <sup>93</sup>Mo and <sup>93</sup>Nb using ICP-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (3), 1029–1037, 2018.
152. MAY, T. W., WIEDMEYER, R. H. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 19 (5), 150 – 155, 1998.
153. NARUKAWA, T.; CHIBA, K. Suppression of the incoherent molecular formation effect by oxygen gas in arsenic analysis by ICP-MS. *Analytical Sciences*, 30 (5), 609–612, 2014.
154. VIEIRA, A. L.; MIRANDA, K.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of an improved closed-vessel conductively heated digestion system for the analysis of raw meat samples by ICP techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (8), 1354–1362, 2018.
155. COUNOTTE, G., HOLZHAUER, M., DIJKEN, S. C., MUSKENS, J., MERWE, D. V. Levels of trace elements and potential toxic elements in bovine livers: A trend analysis from 2007 to 2018. *PLoS ONE*, 14(4), 1-11, 2019.
156. MILLOUR, S., NOËL, L., CHEKRI, R., VASTEL, C., KADAR, A., SIROT, V., LEBLANC, J. C., GUÉRIN, T. Strontium, silver, tin, iron, tellurium, gallium, germanium, barium and vanadium levels in foodstuffs from the Second French Total Diet Study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25 (2), 108–129, 2012.
157. NUNES, A. M., SOUSA, R. A., SILVA, C. S., PEIXOTO, R. R. A., VIEIRA, M. A., RIBEIRO, A. S., CADORE, S. Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn

in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32 (1), 1–5, 2013.

158. RUDY, M. Correlation of lead, cadmium and mercury levels in tissue and liver samples with age in cattle. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26(6), 847-853, 2009.