

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

**AVALIAÇÃO DE POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES DE
ESPECTRÔMETROS COM PLASMA ACOPLADO
INDUTIVAMENTE EM ANÁLISES QUÍMICAS**

Edivan Carvalho Vieira*

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

Orientadora: Dra Ana Rita de Araujo Nogueira

***Bolsista CNPq 140530/2003-7 e CAPES (BEX: 0126/06-3)**

**São Carlos - SP
2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

V657ap

Vieira, Edivan Carvalho.

Avaliação de potencialidades e aplicações de espectrômetros com plasma acoplado indutivamente em análises químicas / Edivan Carvalho Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

112 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Espectrometria de massa - métodos. 2. Biodisponibilidade. 3. ICP-OES. 4. ICP-MS. 5. Solos. 6. Plantas. I. Título.

CDD: 543.0873 (20^a)

“A conquista de hoje é fruto de um sonho de ontem pelo qual se lutou com dignidade e, como tudo na vida é relativo, essa conquista também é relativamente igual ao tamanho desse sonho e da intensidade da luta para alcançá-lo”

Edivan Vieira

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo:

meus amados pais Francisca e Adelino,
pela vida, amor, sacrifícios e oportunidades;

Lucelina, minha esposa, que com muito amor, carinho e paciência
contribuiu para a conclusão deste trabalho;

meus irmãos Acelina, Jucelino, Lina e Carmina, pela amizade,
dedicação e apoio;

minha filha Beatriz;

minhas tias Izabel e Lindalva, pelo amor e oportunidade de estudar;

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Ana Rita pela orientação, incentivo, paciência e acima de tudo pela amizade demonstrada durante todo o período de desenvolvimento desse trabalho na Embrapa Pecuária Sudeste;
- Ao professor Joaquim pelos ensinamentos, críticas, sugestões e amizade;
- Ao professor Jörg Feldmann pela orientação, paciência, sugestões e amizade;
- À Dra Andrea Raab pelo apoio no desenvolvimento experimental do trabalho e pelas sugestões para a condução do mesmo;
- À Dra Luciana Regitano pelo apoio e disposição em ajudar;
- À Lilian pelas discussões e ajuda durante todo o trabalho
- Aos grandes amigos que passaram pela “Família Gaia”: Andréa, Barrinha, Carla, Cíntia, Clésia, Dani, Edilene, Edivaldo, Elma, Fernando, Flavia, Geórgia, Gisele, Júlio, Kelly, Letícia, Marcos, Mirian, Poliana, Sandro, Sílvia e Sherlan;
- Aos amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada: Adriana Alice, Adriana Nori, Alexandra, Allen, Caio, Carla Bossu, Cláudia, Dani Schavo, Eveline, Fernanda, Guto, Juliana, Juliano, Lílian, Marcos, Marcos Gomes, Mário, Rodolfo, Silmara, Silvéria, Sílvia, Telma, Wladiana;
- Aos amigos Chris, Christian, David, Elizabeth, Eva, Guilhem, Jorgi, Katharina, Kristina, Long-Peng, Nicolas, Ralf e Sairoong pela recepção e calorosa amizade;
- Aos amigos da Embrapa Pecuária Sudeste Carlos, Cristina, Gilbertinho, Gilberto, Lourdes, Marcos e Victor;
- Aos amigos de graduação Beneilde, Gisele, Lúcia, Milton e Sônia pelo companheirismo e sincera amizade;

- Aos amigos Aleix, Chicão, Claudionor, Francílio, Janildo, Milton Batista, Milton Matos, Naíse, Raimundo Ribeiro pela saudável convivência de república;
- Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação do PPG-DQ UFSCar, Ariane, Cristina e Luciani, pela atenção dada nos serviços burocráticos;
- Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFSCar pela oportunidade;
- À Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio institucional e oportunidades oferecidas;
- Aos professores e amigos do Departamento de Química da UFSCar, pela formação e apoio institucional;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico pela bolsa concedida e apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento à Pesquisa e ao Ensino Superior – CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche concedida (BEX: 0126/06-3) que permitiu que parte do trabalho fosse desenvolvido no grupo coordenado pelo Professor Dr. Jörg Feldmann na University of Aberdeen - Escócia;
- A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Sinceramente

Muito Obrigado !!!

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.2 – Características dos ICP OES VISTA PRO Radial.....	15
TABELA 2.3 – Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES avaliado.	16
TABELA 2.4 – Programa de aquecimento do forno de microondas Multiwave utilizado na digestão de materiais de referência certificado – folha de pessegueiro e farelo de milho. Temperatura máxima de 210 °C.....	17
TABELA 2.5 – Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado na digestão de amostra de solo. Temperatura máxima de 190 °C.	18
TABELA 2.6 - Planejamento fatorial 2 ³ mais estrela com triplicata do ponto central montado para investigação das condições de operação do ICP OES.	19
TABELA 2.7 - Limites de detecção avaliados com plasma operado em condições robustas (1,4 kW de potência e 0,7 L min ⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (0,7 kW de potência e 1,4 L min ⁻¹ de gás de nebulização) e altura de observação em 8 mm. Analitos em meio de solução extratora DTPA e em meio HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹	29
TABELA 2.8. Sensibilidades obtidas com plasma operado em condições robustas (1,3 kW de potência e 0,7 L min ⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (1,3 kW e 0,7 L min ⁻¹) e altura de observação 8 mm. Analitos em meio de solução extrato da DTPA e em meio de HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹	32
TABELA 2.9 - Faixa linear de calibração avaliada com plasma operado em condições robustas (1,3 kW de potência e 0,6 L min ⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (0,9 kW de potência e 1,0 L min ⁻¹ de vazão de gás de nebulização). Altura de observação igual a 8 mm.....	36
TABELA 2.10 - Comparação do desempenho de sistemas de introdução de amostra: câmara ciclônica e nebulizador concêntrico; câmara Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Sensibilidades e LOD's para analitos em meio de HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹ com plasma operado em condições a 1,05 kW de potência e 0,6 L min ⁻¹ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação. Taxas de nebulização 1,0 e 4,0 mL min ⁻¹ e razão MgII/MgI 8,1 e 7,2 respectivamente.	42

TABELA 2.11 - Concentração dos analitos determinados em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ com plasma operado nas condições: 1,05 kW de potência, $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação. Razão MgII/MgI aproximadamente 7.....	45
TABELA 2.12 - Concentração dos analitos determinados em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$, com plasma operado nas condições: 1,05 kW de potência, $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação.....	46
TABELA 2.13 - Comparação de LOD's, sensibilidades e valores determinados de Cu, Fe Mn e Zn em extratos de solo em meio de solução extratora DTPA com plasma operado em condições: (A*); 1,05 kW de potência e $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e (B*); 1,15 kW de potência e $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização. A altura de observação foi mantida em 8 mm para ambas as condições.	48
TABELA 2.14 – Teores dos analitos determinados em digeridos de solo (material de referência certificado - NIST 2709 – San Joaquim Soil) em meio de água régia+ H_2O_2 +HF. Plasma operado nas seguintes condições: 1,05 kW de potência; $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação.	49
TABELA 2.15 - Comparativo de custos de análises de boro por ICP OES ou por espectrofotometria (método da azometina-H).....	51
TABELA 2.16 – Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro.....	52
TABELA 2.17 – Parâmetros operacionais e analíticos para a determinação multielementar por ICP OES em extratos de material vegetal digeridos em bloco digestor empregando 6 mL da mistura $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$ (4:1 v v ⁻¹).....	54
TABELA 2.18 – Parâmetros operacionais e analíticos para determinação multielementar por ICP OES em extratos de solo (solução extratora de DTPA).....	54
TABELA 3.1 - Parâmetros do ICP-MS Spectromass 2000 empregados para a determinação total de analitos.....	72
TABELA 3.2 - Parâmetros instrumentais dos detectores UV e ICP-MS (Agilent 7500c) e do sistema HPLC com SEC.....	73

TABELA 3.3 - Concentração total de Fe nas amostras de alimentos. Determinações realizadas por ICP-MS nas condições de operação descritas na TABELA 3.1..... 77

TABELA 3.4 - Concentração total de Fe nas soluções resultantes da extração com tampão Tris $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3 e da digestão com fluido gástrico simulado. 80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Esquema de uma tocha de quartzo.	4
FIGURA 2.1 – Esquema mostronstrando a interface dos equipamentos com configuração: a) axial e b) radial.	8
FIGURA 2.2 - Superfície de resposta obtida com plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Soluções em meio de (a) DTPA e (b) HNO_3 $0,14 \text{ L}^{-1}$. Altura de observação de 8 mm. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.	23
FIGURA 2.3 - Gráficos de efeitos principais mostrando a influência dos parâmetros avaliados na a razão MgII/MgI . Plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Soluções em meio de: a) DTPA; e b) HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.....	25
FIGURA 2.4 - Gráfico de efeitos principais mostrando a influência dos parâmetros potência aplicada, vazão do gás de nebulização e altura de observação sobre o limite de detecção para o Cu e para o Al. Plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. soluções em meio de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.	27
FIGURA 2.5 - Razões MgII/MgI obtidos com plasma operado com potência de 1,05 kW, vazão do gás de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$, 8 mm de altura de observação, câmara de nebulização Sturman-Masters, nebulizador ranhura em V e diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm. [0,5] à [10,0]: concentração das soluções de referência (mg L^{-1}); 1 à 7: extratos das amostras submetidas a digestão ou extração..	39
FIGURA 2.6 – Intensidade de emissão relativa das linas de Ar durante a determinação analitos em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$. Condições de operação: potência de 1,05 kW, vazão do gás de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$, 8 mm de altura de observação, câmara de nebulização Sturman Master, nebulizador V-Groove.	40

FIGURA 3.1 - Sistema SEC-UV-ICP-MS montado nas condições em que foram realizadas as determinações: 1) autoamostrador; 2) coluna de exclusão por tamanho; 3) detector ultravioleta e; 4) ICP-MS.....	74
FIGURA 3.2. Cromatográfico das proteínas resultantes da injeção dos extratos de uma amostra de carne crua e da injeção de uma amostra de carne cozida, ambos em meio de tampão Tris $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , pH 7,3. Sinal monitorado em 280 nm.	82
FIGURA 3.3 - Curva de calibração da coluna de exclusão por tamanho (SEC).....	83
FIGURA 3.4.- Perfil do cromatograma obtido de uma solução de mioglobina submetida às condições de extração e de uma solução de mioglobina preparada imediatamente antes de ser injetada na coluna. Soluções preparadas com $5,0 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ tampão tris pH 7,3.....	84
FIGURA 3.5 - Perfil do Cromatograma com injeção do extrato de carne crua e adição de 0,05; 0,01; 0,25; 0,50 e 0,74 g L ⁻¹ de mioglobina; com 50×10^{-3} mol L ⁻¹ tampão Tris pH 7,3. a) Cromatograma; b) Curva de calibração.	86
FIGURA 3.6 - Perfil do cromatograma após injeções dos extratos de carne crua e carne cozida a padrão de proteína em meio de: tampão Tris $5,0 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ pH 7,3; em meio de fluido gástrico simulado (FG); padrão de mioglobina em meio de tampão Tris pH 7,3.	88
FIGURA 3.7 - Cromatograma após a injeção na coluna SEC dos extratos de: alga crua e alga cozida em meio de tampão Tris 50×10^{-3} mol L ⁻¹ , pH 7,3 ; alga crua e alga cozida com fluido gástrico (FG); padrão de mioglobina em meio de tampão Tris.	90
FIGURA 3.8 - Cromatograma após a injeção na coluna SEC dos extratos de: a) cereal, b) suplemento alimentar e c) refrigerante em meio de tampão Tris $5,0 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ , pH 7,3 e em meio de fluido gástrico (FG).	92

RESUMO

AVALIAÇÃO DE POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES DE ESPECTRÔMETROS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE EM ANÁLISES QUÍMICAS. Este trabalho está dividido em duas partes principais. Na primeira foram avaliadas as condições de operação de um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente – ICP OES com configuração radial. Um planejamento fatorial foi efetuado para avaliação sistemática das condições de operação do equipamento, tendo-se estabelecido as condições 1,05 kW de potência, 0,6 L min⁻¹ vazão de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação como adequadas para a determinação de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S e Zn nas amostras estudadas, material de referência certificado (NIST, folhas de pessegueiro e farelo de milho) digeridos em diferentes meios oxidantes. A recuperação de Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de solos em meio de DTPA (IAC 274) e a recuperação de Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn em solo certificado (NIST, San Joaquin Soil) também foram avaliadas nas mesmas condições de operação do ICP OES. Foi proposto protocolo para uso do ICP OES em análises de rotina.

Na segunda parte do trabalho avaliou-se a biodisponibilidade de ferro em alimentos crus e processados. Metaloproteínas foram extraídas nos seguintes meios: tampão Tris 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ e fluido gástrico simulado. Para a determinação de Fe nas soluções extratoras, foi utilizado espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente - ICP MS e para a especiação das metaloproteínas foi utilizada uma coluna de exclusão por tamanho (SEC) acoplada em linha aos detectores UV - ICP-MS. Os resultados indicaram que processos de cozimento causaram mudanças significativas nos teores de Fe ligados às proteínas contidas em amostras de carne e alga marinha, apesar de continuarem biodisponíveis, fato verificado após a digestão com fluido gástrico simulado.

ABSTRACT

EVALUATION OF POTENCIALITIES AND APLICATIONS OF INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROMETERS IN CHEMICAL ANALYSIS. This work is divided in two main parts. In the first one, the operating conditions of a radially inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) was evaluated in soil and vegetable materials analysis. A factorial design was performed to systematic evaluation of the equipment operating conditions, being established: 1.05 kW power, 0.6 L min⁻¹ flow gas nebulization and 8 mm observation height as operating conditions to Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn determination in the studied samples, certified materials (NIST, Peach Leaves and Corn Bran), digested in different oxidant media. The recoveries of Cu, Fe, Mn, and Zn in soil extracts (IAC 274 and NIST San Joaquin Soil) were also evaluated in the same established conditions. A protocol was established for use of the equipment in routine analysis. In the second part of this work, the bioavailability of iron-proteins in different crude and processed foods was evaluated. Two different media were used to metalloprotein extraction: Tris buffer 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ and simulated gastric fluid. An inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) was used to determine Fe in the extract solutions and a size exclusion column (SEC) coupled to UV-ICP-MS detectors was used to metalloprotein speciation. The results indicated that the cooking caused significant changes in the amounts of Fe bond to proteins from beefs and seaweeds, although the elements were still bioavailables.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1- Espectrômetros com plasma acoplado indutivamente	2
2 - AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DE ICP OES COM CONFIGURAÇÃO RADIAL PARA ANÁLISES DE AMOSTRAS AGRONÔMICAS.....	6
2.1 - REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1.1 - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).....	7
2.2 - OBJETIVO	13
2.3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.3.1 - Reagentes e soluções	14
2.3.2. Instrumentação.....	14
2.3.3 – Procedimentos.....	16
2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.4.1 – Planejamento fatorial e razão MgII/MgI como ferramenta de diagnóstico do plasma	22
2.4.2 – Faixa linear de calibração	34
2.4.3 – Robustez do plasma	38
2.4.4 – Estabilidade do plasma	39
2.4.5 – Sistema de introdução de amostra	40
2.4.6 – Análises de materiais de referência	44
2.4.7 – Viabilidade de ICP OES como técnica monoelementar	50
2.4.8 – Protocolo proposto para a determinação de nutrientes em amostras de solos e material vegetal por ICP OES.....	52
2.5 - CONCLUSÃO.....	55
3 - ESPECIAÇÃO DE Fe-PROTEÍNAS EM ALIMENTOS CRUS E PROCESSADOS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE POR SEC-UV-ICP-MS.....	58
3.1 - REVISÃO DA LITERATURA.....	59
3.1.1 – Metaloproteínas.....	59
3.1.2 - Técnicas de separação e detecção de metaloproteínas	59
3.1.3 – Aspectos nutricionais dos minerais.....	62
3.1.4 – Especificação química.....	63
3.1.5 – Biodisponibilidade	63
3.1.6 – Métodos de avaliação da biodisponibilidade e especificação.....	65

3.2 - OBJETIVOS	67
3.3 – MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.3.1 - Reagentes e soluções	68
3.3.2 – Amostras	68
3.3.3 – Instrumentação	69
3.3.4 - Extração das espécies elementares	70
3.3.5 - Determinação da concentração total dos analitos.....	71
3.3.6 - Especificação das metaloproteínas	72
3.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.4.2 – Concentração total dos elementos nas amostras analisadas	75
3.4.3 – Determinação da concentração total dos analitos nos extratos empregando tampão Tris e digeridos com fluido gástrico simulado	78
3.4.4 – Especificação das metaloproteínas por SEC-UV-ICP-MS	81
3.4.5 – Calibração (ou estimativa) da distribuição do peso molecular das espécies na coluna de exclusão por tamanho	82
3.4.6 – Estudo de avaliação da estabilidade da mioglobina	84
3.4.7 – Estudo de quantificação da mioglobina	85
3.4.7 – Avaliação dos efeitos do cozimento sobre as metaloproteínas.....	87
3.5 – CONCLUSÕES	94
4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

Capítulo 1

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Espectrômetros com plasma acoplado indutivamente

Os métodos espectrométricos abrangem um grupo de procedimentos baseados na espectroscopia atômica e molecular. Espectroscopia é um termo geral para a ciência que estuda a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, incluindo ainda ondas acústicas e os feixes de partículas, como íons e elétrons. A espectrometria se refere às medidas das intensidades da radiação usando transdutores fotoelétricos ou outros tipos de dispositivos eletrônicos. Os métodos espectrométricos mais amplamente utilizados fazem uso da radiação eletromagnética (SKOOG et al., 2002).

A espectroscopia pode ser dividida em espectroscopia atômica e em espectroscopia molecular, sendo que a espectroscopia atômica ainda pode ser subdividida em espectrometria de absorção atômica, espectrometria de fluorescência atômica, espectrometria de emissão atômica e espectrometria de massa atômica (SKOOG, 2002).

Para obter espectros de absorção e emissão atômicos e espectros de massa, os constituintes de uma amostra devem ser convertidos em átomos gasosos ou átomos ionizados, que podem ser determinados por medidas de espectros de emissão, de absorção, de fluorescência ou de massa. A etapa de atomização é fundamental para a precisão e a exatidão dos métodos atômicos, embora eventualmente pode-se ter uma situação de baixa eficiência de atomização, mas com boa precisão. Os componentes usados na atomização são chamados de atomizadores. Há vários tipos de atomizadores, sendo os atomizadores de plasma acoplado indutivamente os que serão abordados neste trabalho.

As diferentes aplicações de plasma acoplado em análises químicas advêm das elevadas temperaturas produzidas pelo plasma, capazes de atomizar, excitar e ionizar a maioria dos elementos químicos da tabela periódica. Com isso, é possível o aproveitamento, para fins analíticos da radiação emitida, no caso deste trabalho, por espectrometria de emissão óptica com plasma ou ainda, aproveitar a população de íons

para medidas do espectro de massas em espectrômetro de massas (MONTASER, 1998).

As principais vantagens dos plasmas acoplados indutivamente são: as temperaturas elevadas (5000 – 10000 K); elevada densidade eletrônica (10^{14} a 10^{15} elétrons por cm^3); formação de elevada população de átomos livres ; espécies moleculares em baixa concentração; ausência de eletrodos; características multielementares; e uso de gases não explosivos (HWANG e WANG, 1998).

O sistema usado para gerar o plasma acoplado indutivamente (ICP) é formado por três componentes principais: uma tocha, uma bobina de indução magnética e uma fonte de rádio-frequência. Três tubos concêntricos de quartzo formam a tocha do plasma (**Figura 1.1**). Um fluxo principal de argônio ($\sim 12\text{-}17 \text{ L min}^{-1}$) passa através da tocha entre o tubo externo e o tubo intermediário. Um outro fluxo de gás suplementar ($\sim 1 \text{ L min}^{-1}$) passa entre o tubo intermediário e o tubo central. Esse suplemento de gás auxiliar assegura que o plasma permaneça a uma distância segura do tubo de quartzo e não provoque danos à tocha. A mudança no fluxo deste gás pode ser usada para ajuste da base do plasma. O tubo central (ou tubo injetor da amostra), é usado para introdução da amostra. Nesse tubo, uma vazão de argônio ($\sim 1 \text{ L min}^{-1}$), gás nebulizador e carregador, transporta a amostra até o plasma na forma de um fino aerossol (HEBERT, 2002). A vazão desse gás, juntamente com o diâmetro do tubo central, são determinantes do tempo de residência do aerossol da amostra.

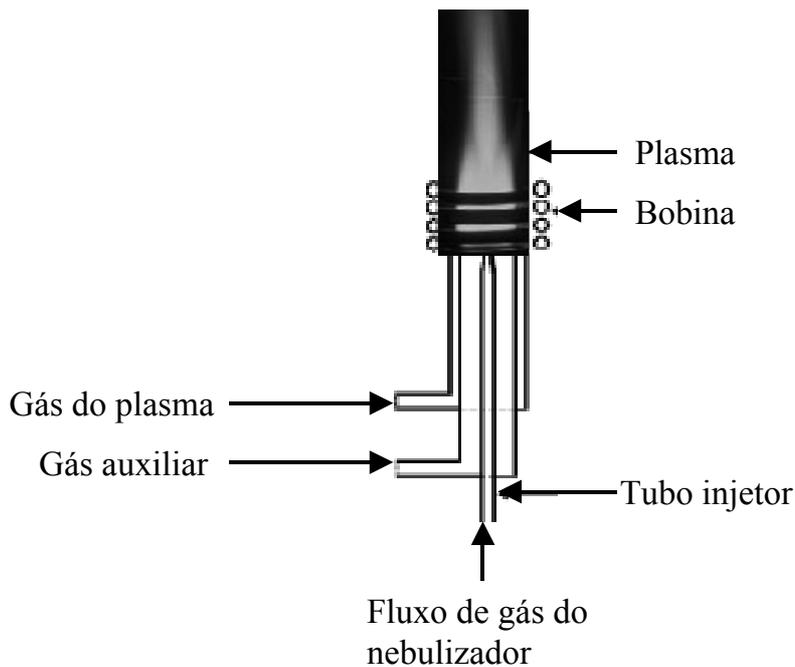


FIGURA 1.1 - Esquema de uma tocha de quartzo.

Uma elevada voltagem criada pela bobina de indução inicia a ignição do plasma no fluxo de argônio que está passando através da tocha. A ignição inicial fornece elétrons, que são acelerados por um campo magnético criado pela bobina de rádio frequência ao redor da tocha. O campo magnético é criado por uma corrente alternada oscilante a uma frequência geralmente de 27,12 ou 40,68 MHz. Colisões entre os elétrons e entre o gás argônio induzem a ionização dos átomos de argônio, que por sua vez colidem com outros átomos ionizando-os numa reação em cadeia. Esse fenômeno é conhecido como uma descarga do plasma acoplado indutivamente. O plasma é mantido por todo o período que o campo de rádio frequência e o fluxo de gás forem mantidos (HUANG et al., 1997).

A maneira como o suplemento principal de gás é introduzido na tocha tem uma relação direta com o formato do plasma e facilita a introdução da amostra. O gás é introduzido na tocha de uma maneira tangencial, criando um efeito vórtex e induzindo a um plasma no formato anular (HEBERT, 2002).

Há duas aplicações principais dos plasmas acoplados indutivamente para fins analíticos: espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente – ICP OES e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente – ICP-MS.

Neste trabalho foi avaliada a aplicação de um ICP OES para análises de rotina, comparando o desempenho desse equipamento em relação ao desempenho dos equipamentos em que as mesmas análises já são realizadas rotineiramente. Os aspectos econômicos envolvidos nas análises também foram considerados nessa avaliação.

Um outro estudo foi utilizada uma coluna de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a detectores UV-ICP-MS. Nesse estudo foram avaliadas a especificação e a biodisponibilidade de metais ligados a proteínas em alimentos crus e processados.

Capítulo 2

2 - AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DE ICP OES COM CONFIGURAÇÃO RADIAL PARA ANÁLISES DE AMOSTRAS AGRONÔMICAS

2.1 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente surgiu como técnica analítica na metade dos anos 60 (GREENFIELD *et al.*, 1964; WENDT & FASSEL, 1965), e desde então essa técnica tem experimentado grande aceitação entre os químicos analíticos, principalmente devido à relativa facilidade de manuseio dos equipamentos, capacidade de análises multielementares e ao relativamente baixo efeito de matriz (DUBUISSON *et al.*, 1997). O desenvolvimento de equipamentos com configuração axial (ABDALLAH *et al.*, 1976) e o desenvolvimento e a utilização de detectores de estado sólido (BARNARD *et al.*, 1993) proporcionaram o renascimento dessa técnica.

Os equipamentos com configuração axial proporcionaram significativos ganhos de sensibilidade para a técnica. Apesar disso, essa configuração teve inicialmente pouca aceitação devido a severas interferências matriciais. Esses problemas relacionados às interferências específicas para equipamentos com configuração axial parecem ter sido superados com o desenvolvimento de novas interfaces denominadas “Shear-gas” e “End-on-gas”, dependendo da configuração. Atualmente, problemas relacionados à interferências em equipamentos com configuração axial quando comparados a equipamentos com configuração radial são mais mitos do que realidade. Trabalhos desenvolvidos comparando as duas configurações (DUBUISSON *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 2001 e SILVA *et al.*, 2002), têm destacado os ganhos em sensibilidade dos equipamentos com configuração axial sem a ocorrência das interferências inicialmente salientadas. Na configuração radial, a tocha é posicionada perpendicularmente à entrada do sistema óptico, enquanto na configuração axial a tocha é posicionada horizontalmente, como pode ser observado na **Figura 2.1**.



FIGURA 2.1 – Esquema mostrando a interface dos equipamentos com configuração: a) axial e b) radial.

Fonte: SILVA, 2004.

O desenvolvimento e a aplicação da tecnologia de detectores de estado sólido representou um avanço na detecção da radiação por possibilitar a detecção da radiação separada bidimensionalmente por sistema de difração contendo prisma e grade de difração tipo Littrow/Echelle (BARNARD *et al.*, 1993 e GOY *et al.*, 1998).

Os detectores de estado sólido – CCD permitem a leitura simultânea no intervalo de comprimento de onda de 120 a 785 nm, dependendo do arranjo. Dessa forma podem ser monitoradas aproximadamente 96 % das linhas de emissão analiticamente úteis do intervalo citado (BARNARD *et al.*, 1993 e BRENNER & ZANDER, 2000).

Passada a revolução causada pelo surgimento do detector de estado sólido e a consolidação dos equipamentos com configuração axial, continuaram as discussões sobre os problemas relacionados a efeitos de matriz no plasma. Efeitos de matriz (ou interferência de matriz), podem ter de origem na amostra ou nos reagentes e podem resultar tanto em um aumento na intensidade de sinal do analito como na diminuição desse (IGLÉSIAS *et al.*, 2004).

Elementos facilmente ionizáveis tanto podem aumentar com também diminuir a intensidade de sinal dos analitos (ROMERO *et al.*, 1997). A acidez pode alterar as propriedades físicas da solução a ser introduzida no plasma e também efeitos nos processos de atomização, excitação e ionização (TODOLI *et al.*, 1999). Emissões indesejáveis decorrentes da presença de compostos orgânicos residuais ou elementos concomitantes da amostra podem ocorrer principalmente nas proximidades da região

mais fria do plasma, na qual processos de recombinação são favorecidos (THOMPSON & BARNES, 1992).

Os elementos facilmente ionizáveis causam efeitos no plasma à medida que a presença desses elementos provoca mudanças na transferência de energia entre a periferia e o centro do plasma, por onde passa a amostra (ROMERO *et al.*, 1997). BRENNER *et al.* (1998), estudaram a interferência de elementos facilmente ionizáveis como Ca e Na em ICP OES com configuração axial, usando baixas e altas vazões de nebulização e comparando várias linhas espectrais de espécies com diferentes potenciais de ionização. Os limites de detecção dos analitos As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sc, Sr, Ti, Tl, V e Zn em soluções aquosas e em soluções contendo 0,1 % de Ca e Na foram determinados. Em comparação com os limites de detecção usando um nebulizador com fluxo cruzado, o ganho médio para os analitos em soluções aquosas e usando nebulizador ultra-sônico foi de aproximadamente, 10 vezes. No entanto, para soluções contendo 0,1 % de Na e Ca, os limites de detecção foram degradados de 10 a 16 vezes quando usado o nebulizador fluxo cruzado e de 30 vezes quando foi usado o nebulizador ultra-sônico. Na presença de Ca e Na a 1,35 kW muitas das linhas espectrais sofreram supressões respectivamente da ordem de 10 % e 20 % quando foi empregado nebulizador de fluxo cruzado. Quando foi usado um nebulizador ultra-sônico, os efeitos de matriz foram maiores, sendo observados ganhos tanto de intensidade como em atenuação (de 20 a 30 % para o Na e de 30 a 50 % para o Ca).

Experimentos têm mostrado que os efeitos negativos causados por elementos facilmente ionizáveis são superados quando o plasma é operado em condições que a introdução desses elementos não altere os processos de transferência de energia no plasma (IVALDI & TYSON, 1995; BRENNER *et al.*, 1997; DUBUISSON *et al.*, 1997; ROMERO *et al.*, 1997; BRENNER *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2001). Essas condições de operação, que garantem a superação dos efeitos causados pelos elementos facilmente ionizáveis são: potência elevada e baixa vazão do gás de nebulização, ou seja, condições robustas (MERMET, 1989). As investigações foram realizadas tanto em equipamentos com configuração radial como em equipamentos com configuração axial.

Os efeitos da concentração ácida e do tipo de ácido também têm sido investigados. A magnitude dos efeitos produzidos pelos ácidos no ICP OES depende diretamente das características do sistema de introdução de amostra empregado (DAHLQUIST & KNOLL, 1978; TODOLÍ & MERMET, 1999). A magnitude do efeito produzido pelo ácido depende das características do nebulizador e da câmara de nebulização. O nebulizador é responsável pela formação do aerossol primário e terciário e a câmara de nebulização pelo transporte e seleção desse aerossol, sendo que esses processos podem ser alterados pela presença do ácido (MERMET, 1998). A presença de ácidos inorgânicos em uma solução aquosa altera a viscosidade e a tensão superficial quando comparado às propriedades da água sem a presença desses ácidos, tendo como consequência final a alteração na intensidade do sinal de emissão do sinal (FARINO *et al.*, 1987; TODOLÍ e MERMET, 1999).

STEWART & OLESIK (1998), investigaram a influência do ácido nítrico na geração do aerossol e nos processos de transporte desse aerossol para o plasma e concluíram que quando a solução está em meio de ácido nítrico, a quantidade de aerossol e do analito que atingem o plasma diminui quando a concentração de HNO_3 foi variada de 0 para 20 %, sugerindo que as mudanças no transporte do analito são, principalmente, devido a mudanças na vazão da solução até a câmara de nebulização, na formação e no transporte do aerossol. Diferentemente dos efeitos causados por elementos facilmente ionizáveis, os efeitos devido a diferenças de acidez não são superados somente com a implementação de condições robustas. Diferentes nebulizadores e câmaras de nebulização podem ter comportamentos distintos em função da concentração do ácido.

Algumas alternativas têm sido propostas para corrigir os efeitos da acidez em ICP OES, sendo que as principais são: a compatibilização de matriz (RONCEVIC & SIROKI, 1994), o uso de padrão interno (GROTTI & FRACHE, 2003), a adição de padrão (VANHOE *et al.*, 1995) e modificação do sistema de introdução de amostra (CARRÉ *et al.*, 1995).

MASSON (1999) estudou os efeitos de matrizes em amostras de plantas durante análises de elementos traço por ICP OES com configuração axial e com nebulização pneumática. Arsênio, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Se foram os analitos escolhidos e K, Ca e Mg foram os potenciais interferentes avaliados na investigação. As condições de

operação do equipamento foram otimizadas para obtenção das melhores sensibilidades. A máxima razão sinal do analito/sinal de fundo (SBR) foi escolhida como resposta. Os comprimentos de onda escolhidos foram os mais sensíveis e os que não apresentaram interferências espectrais. Foi observada uma diminuição da intensidade de emissão dos analitos quando foi aumentada a concentração dos potenciais interferentes. Nesse trabalho foi possível recuperar 100 % dos analitos quando o equipamento foi operado a 1,4 kW de potência aplicada. Vale ressaltar que 1,4 kW de potência não é a mais indicada para análises de rotina, em função do desgaste dos componentes do equipamento.

Para equipamento com configuração radial, os adequados ajustes da potência do sistema de radio-freqüência, da vazão de nebulização e da altura de observação podem ser suficientes para eliminar ou minimizar o efeito negativo de emissões indesejáveis que podem prejudicar a detecção do sinal analítico (THOMPSON & BARNES, 1992).

Para diagnosticar o desempenho de um ICP OES, POUSSEL *et al.* (1993) realizaram uma série de experimentos. Nesses experimentos foram empregadas determinadas linhas de emissão do espectro eletromagnético e soluções analíticas contendo os elementos Ba, Mg e Ni com a finalidade de verificar a resolução espectral, eficiências de ionização e de excitação (robustez), estabilidade e limite de detecção apresentados pelo espectrômetro em avaliação. A escolha das linhas de emissão e dos elementos utilizados no procedimento de diagnóstico foi detalhadamente discutida pelos autores em diferentes trabalhos (MERMET, 1991; POUSSEL *et al.*, 1993; MERMET & POUSSEL, 1995).

Empregando uma seqüência de experimentos propostos por MERMET & POUSSEL, (1993), SILVA *et al.*, (2002) e SILVA, (2004) avaliaram o desempenho de um ICP OES com configuração radial. O tempo de estabilização recomendado para o equipamento avaliado foi de 10 min. Com o equipamento operado a 1,3 kW de potência e 0,7 L min⁻¹ de gás de nebulização, a razão MgII/MgI foi superior a 10, como esperado. A estabilidade do equipamento em curto e em longo períodos foi considerada excelente. A resolução espectral do policromador Littrow/Echelle avaliado foi de 9 e 32 pm nas regiões do UV e VIS respectivamente.

Atualmente as pesquisas envolvendo a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma estão concentradas mais nas aplicações do que no desenvolvimento

dos equipamentos. A validação de métodos, principalmente para atender a norma ISO 17025 é uma das aplicações de ICP OES que despertam o interesse dos usuários dessa técnica principalmente para estabelecer o desempenho analítico para parâmetros como precisão, exatidão e limite de detecção (MERMET, 2005).

Para análises de rotina, protocolos de operação do equipamento devem ser montados para que as condições de operação do equipamento estejam estabelecidas de forma que o analista não tenha que avaliá-las a cada nova amostra a ser analisada.

Além das condições de operação, é importante que se avalie o quanto cada alternativa de análise é viável economicamente.

O equipamento estudado nesse trabalho teve seu desempenho previamente avaliado por SILVA *et al.*, (2002) e SILVA, (2004), seguindo a seqüência de experimentos recomenda por MERMET & POUSSSEL, (1993).

2.2 - OBJETIVO

- Avaliar condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com visão radial, visando o desenvolvimento de métodos para a determinação em amostras de material vegetal e solos.

2.3 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 - Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água desionizada purificada em sistema Milli-Q[®] (resistividade 18 MΩ cm).

As soluções de referência para obtenção das curvas analíticas foram preparadas após diluição adequada de soluções estoque contendo 1.000 mg L⁻¹ de cada elemento (Spex Sample Preparation, Metuchen, NJ, EUA) em meio de: 1) HNO₃ 0,14 mol L⁻¹; 2) HNO₃ + HClO₄, 2 %, na proporção 4:1 v v⁻¹; 3) solução extratora de DTPA. As concentrações dos analitos (Al, B, Ba, Ca Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si, V e Zn) nas soluções de referência variaram de 0,1 a 40,0 mg L⁻¹.

Para avaliar a faixa linear de calibração foram preparadas soluções contendo de 0,1 até 2000 mg L⁻¹ de Al, Co, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn a partir da diluição dos respectivos sais em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹.

Solução extratora de DTPA – A solução extratora de DTPA foi preparada a partir da mistura das soluções: solução tampão de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 0,005 mol L⁻¹; trietanolamina (TEA) 0,1 mol L⁻¹ e cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,01 mol L⁻¹ (ou ~ 400 mg L⁻¹ de Ca²⁺), pH 7,3. A mistura dessas soluções foi empregada como meio extrator de micronutrientes no solo (Van RAIJ *et al.*, 2001; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

2.3.2. Instrumentação

As determinações multielementares foram realizadas empregando espectrômetro de emissão óptica simultâneo com configuração radial, VISTA PRO Radial (Varian, Mulgrave, Austrália), equipado com um detector de estado sólido do tipo CCD; sistema pré-óptico do equipamento purgado com argônio a uma vazão de 0,2 L min⁻¹, para possibilitar leituras abaixo de 190 nm; policromador com montagem

Littrow/Echelle termostaticado a $\sim 35^{\circ}\text{C}$ e purgado com argônio. A descrição detalhada do espectrômetro e os parâmetros operacionais empregados são listados nas Tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente.

TABELA 2.2 – Características dos ICP OES VISTA PRO Radial.

Característica	Vista PRO Radial
Gerador de radiofrequência	40 MHz, Free running
<i>Sistema óptico</i>	
Policromador	Grade Littrow/Echelle + prisma dispersão cruzada de CaF_2
Densidade de ranhuras da grade	$95 \text{ ranhuras mm}^{-1}$
Plano focal	400 mm
Fenda de entrada	Altura = $29 \mu\text{m}$ e comprimento = $51 \mu\text{m}$
<i>Sistema de introdução da amostra</i>	
Nebulizador	Concêntrico do tipo K e ranhura em V
Câmara de nebulização	Ciclônica de simples passo e Sturman-Masters
Detector	CCD refrigerado a -35°C por sistema Peltier ~ 70.000 pixels arranjados de forma não linear Intervalo espectral de leitura $\sim 167-785 \text{ nm}$
Diâmetro interno do tubo injetor da tocha	1,4 mm

TABELA 2.3 – Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES avaliado.

Parâmetro operacional			
Potência RF (kW)	Variável (de 0,7 a 1,4)		
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15		
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5		
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	Variável (de 0,6 a 1,4)		
Taxa de nebulização da amostra (mL min ⁻¹)	1,0 e 4,0 (nebulizadores concêntrico e ranhura em V, respectivamente)		
Altura de observação (mm)	Variável (de 4 a 20)		
Linhas de emissão (nm)	Al(I) 396,152	Cu(I) 324,754	P(I) 213,618
	Al(I) 237,312	Fe(II) 238,204	P(I) 178,222
	B(I) 249,772	Fe(II) 259,940	Pb(II) 220,556
	B(I) 249,678	K(I) 766,491	Pb(I) 217,000
	Ba(II) 455,403	K(I) 769,897	S(I) 181,972
	Ba(II) 193,408	Mg(II) 280,270	S(I) 180,669
	Ca(II) 396847	Mg(I) 285,208	Se(I) 196,026
	Ca(II) 422,673	Mn(II) 257,610	Se(I) 203,985
	Cd(II) 214,439	Mn(II) 260,568	Si(I) 251,611
	Cd(I) 228,802	Mo(II) 202,032	Si(I) 288,158
	Co(II) 228,615	Mo(II) 204,598	V(II) 292,401
	Co(II) 238,892	Na(I) 589,592	V(II) 309,310
	Cr(II) 267,715	Na(I) 588,995	Zn(I) 213,857
	Cr(II) 205,560	Ni(II) 231,604	Zn(II) 206,204
	Cu(I) 327,395	Ni(II) 216,555	

(I) e (II)– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

As digestões das amostras foram realizadas em sistema de microondas com cavidade MULTIWAVE (Anton Paar, Austria) equipado com sensores de temperatura e pressão e rotor com 6 frascos fechados de teflon PFA[®] (perfluoralcóxi). Digestões também foram realizadas em bloco digestor modelo TE 40725 com aquecimento controlado (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

2.3.3 – Procedimentos

Preparo da amostra de material vegetal

A uma massa de 200 mg de materiais de referência certificado, folha de pessegueiro farelo de milho, (respectivamente NIST 1547 e NIST 8433 - National Institute of Technology, Gaithersburg, MD), foram adicionados 4 mL de HNO₃ 7 mol

L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 30 % $v v^{-1}$. A seguir, foram submetidos à digestão em forno de microondas com cavidade de acordo com programa de aquecimento descrito na **Tabela 2.4**. Os extratos dos digeridos foram diluídos conforme concentração da curva analítica empregada na análise.

TABELA 2.4 – Programa de aquecimento do forno de microondas Multiwave utilizado na digestão de materiais de referência certificado – folha de pessegueiro e farelo de milho. Temperatura máxima de 210 °C

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	300	2
2	0	3
3	650	4
4	850	5
5	1000	5
6	0	15 (resfriamento)

Em outro procedimento de digestão, que empregou bloco digestor, 500 mg de material de referência certificado, folha de pessegueiro, foram pesados e transferidos para tudo de vidro de 100 mL. A seguir foram adicionados 6 mL da mistura ácida HNO_3+HClO_4 4:1 $v v^{-1}$. Essa mistura foi deixada à temperatura ambiente durante uma noite e no dia seguinte submetida ao aquecimento em bloco digestor, inicialmente a 100 °C durante 1 h com aumento gradual de temperatura para 140, 180 e 210 °C, permanecendo a 210 °C até que o volume da solução no frasco se reduzisse a aproximadamente 1 mL. Os extratos dos digeridos foram diluídos para 50 mL e determinados.

Preparo da amostra de solo

Digestão assistida por radiação microondas - A 200 mg de material de referência certificado - San Joaquim Soil (NIST 2709), foram adicionados 2 mL de água régia e 1 mL de H_2O_2 30 % $v v^{-1}$, submetidos à digestão em forno de microondas com cavidade de acordo com programa de aquecimento descrito na **Tabela 2.5**. Após resfriamento, a

mistura resultante nos frascos de decomposição foi transferida quantitativamente para frascos graduados com volume de 15 mL, sendo o volume ajustado para 10 mL e os compostos silicatados não digeridos separados por centrifugação (3 min, 2000 rpm). O precipitado foi solubilizado à temperatura ambiente adicionando-se 1 mL de HF concentrado. Após a solubilização, foram adicionados 500 mg de H₃BO₃ para a complexação dos fluoretos remanescentes. A solução resultante foi acrescentada ao sobrenadante recolhido anteriormente (fase líquida) e o volume final ajustado para 15 mL com água (VIEIRA *et al.*, 2005).

TABELA 2.5 – Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado na digestão de amostra de solo. Temperatura máxima de 190 °C.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	400	3
2	850	6
3	1000	10
4	0	15 (resfriamento)

Extração de Cu(II), Fe(III), Mn(II) e Zn(II) com DTPA - Mediu-se 10 cm³ de solo e transferiu-se para frascos cônicos de polietileno. Adicionou-se 20 mL da solução extratora de DTPA, tamparam-se os frascos, agitou-se por 2 h à 220 rpm em mesa de agitação e filtrou-se a suspensão. As determinações de Cu, Fe, Mn e Zn nos extratos foram realizadas em no máximo 24 h (Van RAIJ *et al.*, 2001).

Avaliação das condições de operação do ICP OES

Para otimizar as condições de operação do ICP OES foram realizados estudos quimiométricos. Foi montado um planejamento fatorial 2³ com triplicata do ponto central mais estrela composto de 17 experimentos, sendo que cada variável foi avaliada em dois níveis: superior (+) e inferior (-). As variáveis utilizadas e os intervalos avaliados foram: a potência de rádio frequência entre 0,7 e 1,4 kW, a vazão do gás de nebulização entre 0,6 e 1,4 L min⁻¹ e a altura de observação entre 4 e 20 mm (**Tabela 2.6**). As respostas avaliadas foram: razão Mg(II)/Mg(I), LOD e SBR. Para

esse experimento, soluções de referência em meio de HNO_3 0,14 mol L^{-1} e solução extratora de DTPA contendo Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si, V e Zn foram preparadas em concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0, 10,0 e 40 mg L^{-1} . As intensidades de radiação emitidas foram obtidas e utilizadas nos cálculos para as avaliações. Soluções nas mesmas concentrações foram utilizadas para a determinação da concentração dos analitos nos digeridos das amostras de materiais de referência.

TABELA 2.6 - Planejamento fatorial 2^3 mais estrela com triplicata do ponto central montado para investigação das condições de operação do ICP OES.

Experimento	Potência (kW)	Vazão (L min^{-1})		Altura (mm)		
1	0	1,05	-1,68	0,6	0	12
2	-	0,7	+	1,4	-	4
3	+	1,4	-	0,6	+	20
4	0	1,05	+1,68	1,4	0	12
5	+	1,4	+	1,4	+	20
6	0	1,05	0	1,0	0	12
7	+1,68	1,4	0	1,0	0	12
8	0	1,05	0	1,0	0	12
9	-	0,7	+	1,4	+	20
10	0	1,05	0	1,0	+1,68	20
11	+	1,4	+	1,4	-	4
12	-	0,7	-	0,6	-	4
13	-	0,7	-	0,6	+	20
14	0	1,05	0	1,0	0	12
15	0	1,05	0	1,0	-1,68	4
16	+	1,4	-	0,6	-	4
17	-1,68	0,7	0	1,0	0	12

Os limites de detecção e quantificação foram calculados considerando-se a concentração do analito que produz um sinal líquido (altura de pico) equivalente à intensidade do sinal de fundo (BEC). As equações envolvidas no cálculo do BEC,

foram deduzidas conforme sugerido pela IUPAC (1978) e por THOMSEN *et al.* (2000):

O BEC é calculado pela equação:

$$\text{BEC} = (C_H \times I_B) / (I_H - I_B)$$

Onde;

C_H é a concentração da solução de referência mais concentrada,

I_B é a intensidade do branco analítico,

I_H é a intensidade de emissão da referência mais concentrada

O limite de detecção (LOD), considerando-se o BEC, é calculado aplicando-se a fórmula:

$$\text{LOD} = (3 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) \times 100.$$

Onde, o RSD_B é o desvio padrão relativo do branco.

O limite de quantificação (LOQ) é calculado aplicando-se a fórmula:

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) \times 100.$$

A sensibilidade do método para cada analito nos comprimentos de onda avaliados foi calculada a partir do coeficiente angular da reta de calibração, como recomenda a IUPAC. Isso porque os experimentos do planejamento não foram realizados em replicatas.

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em muitos laboratórios dedicados à análise de amostras de solo e material vegetal visando o fornecimento de resultado que ajudem na tomada de decisão a respeito de fertilidade ou valor nutricional, um grande número de amostra é analisado anualmente. As principais amostras analisadas e respectivos elementos determinados são:

1) Solos: Cu, Fe, Mn e Zn extraídos com solução extratora de DTPA a pH 7,3, normalmente quantificado por FAAS;

2) material vegetal: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn, digeridos via úmida em bloco digestor com mistura nítrico-perclórica (solução 4:1 v v⁻¹) e normalmente quantificados por FAAS (Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn); fotometria de chama (K e Na), espectrofotometria de absorção molecular (P e B), turbidimetria com cloreto de bário (S-SO₄²⁻). No caso da determinação de boro, normalmente é feita extração via seca e recuperação em meio de HCl diluído.

Neste trabalho serão discutidas as condições de realização das determinações por ICP OES. Parâmetros como limites de detecção e determinação, sensibilidade, faixa linear de trabalho e suscetibilidade à interferências devem ser previamente avaliadas para otimização do uso do equipamento.

A espectrometria de emissão com fonte de plasma se estabeleceu como uma técnica popular devido a menor suscetibilidade às interferências de matriz, decorrentes em função das altas temperaturas atingidas pelo plasma. Quanto maior a temperatura, menor as interferências matriciais. A maior temperatura é atingida com o aumento da potência aplicada. Quanto maior a potência, maior o desgaste de acessórios como tocha, desestabilização da fonte de rádio frequência, etc. Portanto, estabelecer as condições de operação do ICP OES é fundamental para sua operacionalização. A proposta de avaliar as condições de operação visou propor condições para que todas essas determinações sejam realizadas por ICP OES.

2.4.1 – Planejamento fatorial e razão MgII/MgI como ferramenta de diagnóstico do plasma

Para se avaliar o comportamento do espectrômetro utilizado foi realizado um planejamento fatorial variando-se a potência, a vazão do gás de nebulização e a altura de observação, sendo obtido como respostas a razão MgII/MgI, os limites de detecção para cada elemento avaliado e a razão sinal/sinal de fundo.

A superfície de resposta obtida (**Figura 2.2**) mostrou que quanto maior a potência e menor a vazão do gás de nebulização, maior a razão MgII/MgI e, portanto, maior a robustez do plasma (menor suscetibilidade a efeitos matriciais). Esse comportamento já havia sido observado por MERMET, (1991) e também já podia ser suposto a partir de experimentos realizados por HUANG *et al.*, (1997). É importante ressaltar que todos os valores da razão Mg II/Mg I apresentados nesta tese foram multiplicados pelo fator 1,8 citado na literatura (DENNAUD *et al.*, 2001). Pode-se observar ainda que tanto em meio de DTPA (**Figura 2.2 a**) como em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ (**Figura 2.2 b**), os perfis das superfícies são semelhantes e são obtidas similares razões MgII/MgI, indicando que o plasma apresenta processos de atomização e ionização similares nos dois meios. Porém, a potência aplicada e principalmente o tempo de residência são fatores determinantes da magnitude de ocorrência desses processos.

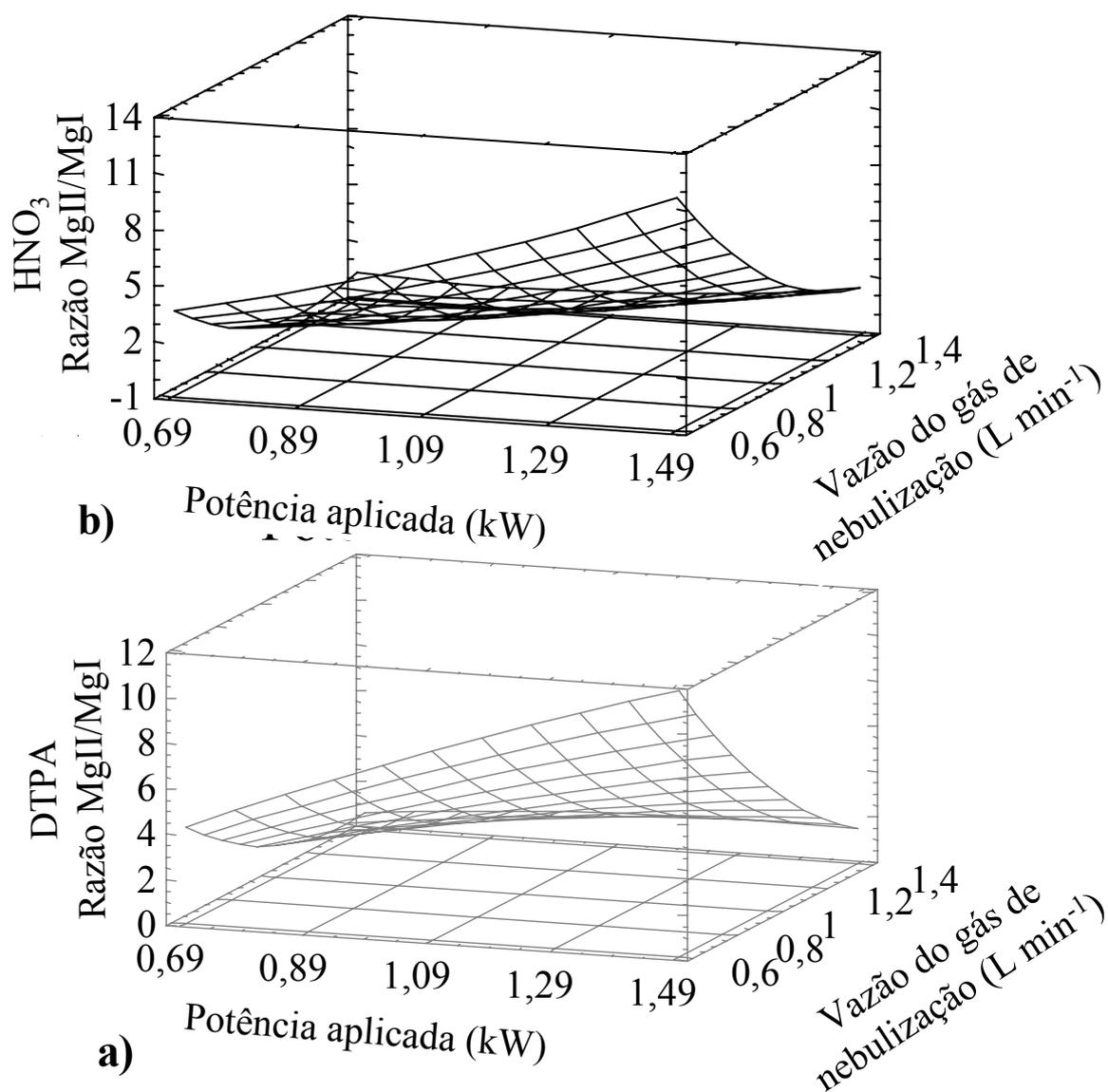


FIGURA 2.2 - Superfície de resposta obtida com plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Soluções em meio de (a) DTPA e (b) HNO₃ 0,14 L⁻¹. Altura de observação de 8 mm. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.

Analisando os gráficos de efeitos principais (**Figura 2.3**), obtidos a partir dos resultados do planejamento, é possível observar que o parâmetro mais importante para a obtenção de maiores razões MgII/MgI é a vazão do gás de nebulização, tanto para as soluções em meio DTPA (**Figura 2.3 a**) como para o meio HNO₃ (**Figura 2.3 b**). Vazões menores do gás de nebulização aumentam o tempo de residência do analito no plasma, possibilitando eficientes processos de atomização, excitação e ionização.

Portanto, diminuindo a vazão do gás de nebulização e mantendo uma potência intermediária é possível se trabalhar com um plasma relativamente robusto. A altura de observação não apresentou influência significativa para nenhum dos dois meios avaliados. Os resultados apresentados nos gráficos estão de acordo com os resultados apresentados por MERMET (1991) em experimentos realizados de forma univariada.

A razão MgII/MgI tem sido empregada na maioria dos trabalhos realizados visando diagnóstico de condições de operação do ICP OES (MERMET, 1991; SILVA *et al.*, 2002; TREVIZAN *et al.*, 2005; GROTTI *et al.*, 2006). A razão MgII/MgI é usada como critério para avaliar a robustez de uma plasma. O conceito de robustez foi proposto por MERMET (1989) para representar a eficiência de transferência de energia e resposta do plasma a mudanças nas condições de atomização e de excitação decorrentes da composição química de uma solução aspirada.

De acordo com critérios estabelecidos por MERMET & POUSSSEL, (1995), os equipamentos de ICP OES operam em condições robustas quando a razão MgII/MgI é maior do que 8 para equipamentos com configuração axial e quando a razão é maior que 10 para equipamentos com configuração radial.

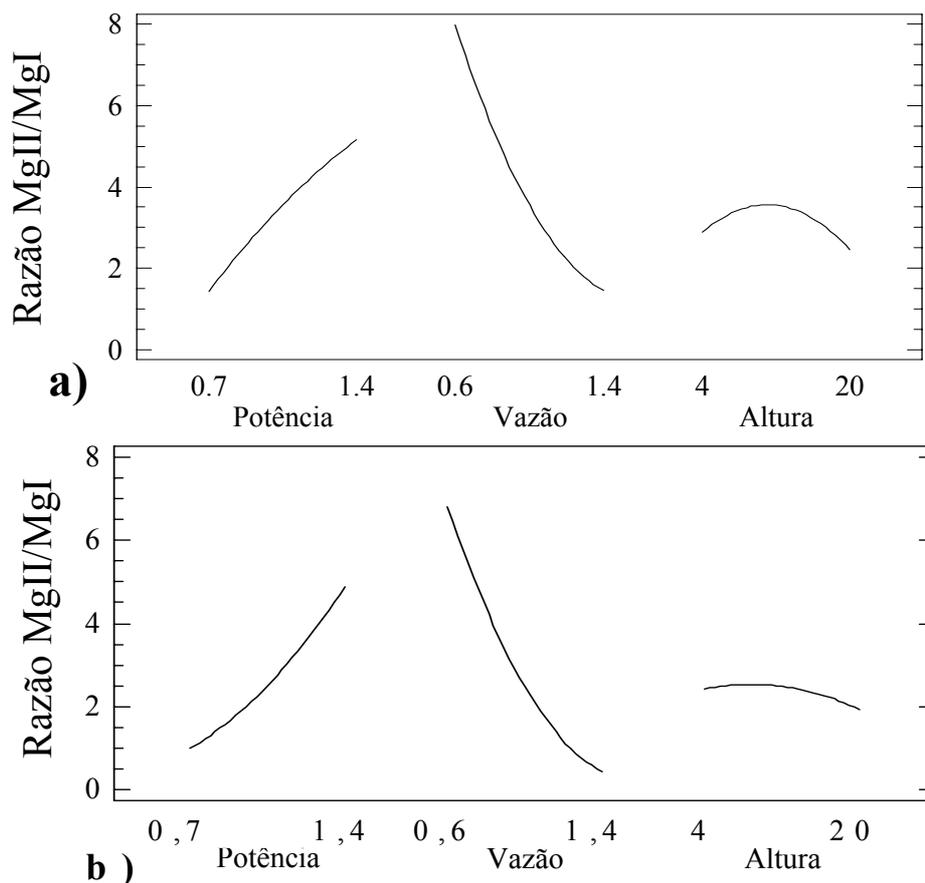


FIGURA 2.3 - Gráficos de efeitos principais mostrando a influência dos parâmetros avaliados na a razão MgII/MgI . Plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Soluções em meio de: a) DTPA; e b) HNO₃ 0,14 mol L⁻¹. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.

Vale a pena salientar que robustez em plasma não deve ser encarada como uma panacéia que resolve todos os possíveis problemas matriciais. Trabalhar com plasma operando em condições de elevada potência aplicada (>1,3 kW, por exemplo) implica em desgastes de componentes do instrumento. As condições que podem necessitar que um plasma seja operado em condições robustas, de acordo com o conceito proposto por MERMET, (1989), seriam quando há mudança de composição química da solução aspirada. Portanto, cabe a cada usuário avaliar se realmente é necessário operar o equipamento em potências elevadas.

A altura de observação no plasma foi dos três parâmetros avaliados o que apresentou menor influência estatística determinação de condições robustas. Isso não

diminui a importância desse parâmetro em estudos envolvendo determinações por ICP OES, uma vez que a robustez é calculada considerando apenas razões entre as intensidades MgII/MgI e a emissão cada elemento responde de forma diferente às temperaturas do plasma. Além disso, cada plasma tem uma dimensão específica que deve ser considerada para estudos investigativos.

Para se avaliar a altura de observação de maior intensidade de emissão de diferentes analitos, foi realizado um experimento variando-se a altura de observação e a concentração ácida. A altura de observação de 8 mm foi a que apresentou maior intensidade de emissão para a maioria dos elementos e comprimentos de onda avaliados, sendo essa altura a escolhida para os demais experimentos. A intensidade de emissão dos elementos em meio ácido nítrico 1,4 mol L⁻¹ foi relativamente maior que a intensidade de emissão desses elementos em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹. A presença de maior densidade eletrônica e íons no plasma oriundos da maior concentração ácida pode aumentar a transferência de energia do plasma, como já demonstrado e discutido por BATAL & MERMET (1982), GOLDWASSER & MERMET (1986) e MERMET (1991).

A partir do planejamento fatorial empregado foram calculados os limites de detecção quando se varia a potência aplicada, a vazão do gás de nebulização e a altura de observação. A **Figura 2.4** mostra o gráfico de efeitos principais para a obtenção do limite de detecção do (a) Cu e (b) Al, quando foram avaliados os parâmetros potência, vazão e altura de observação. Para ambos os elementos menores limites de detecção foram obtidos com o aumento da potência até ~1,2 kW. Já com relação aos parâmetros vazão e altura de observação, foram observados comportamentos totalmente antagônicos, indicando que em casos como esses e se o limite de detecção for um fator crítico para determinações multielementares, uma condição de potência, vazão e altura intermediárias pode ser uma alternativa viável.

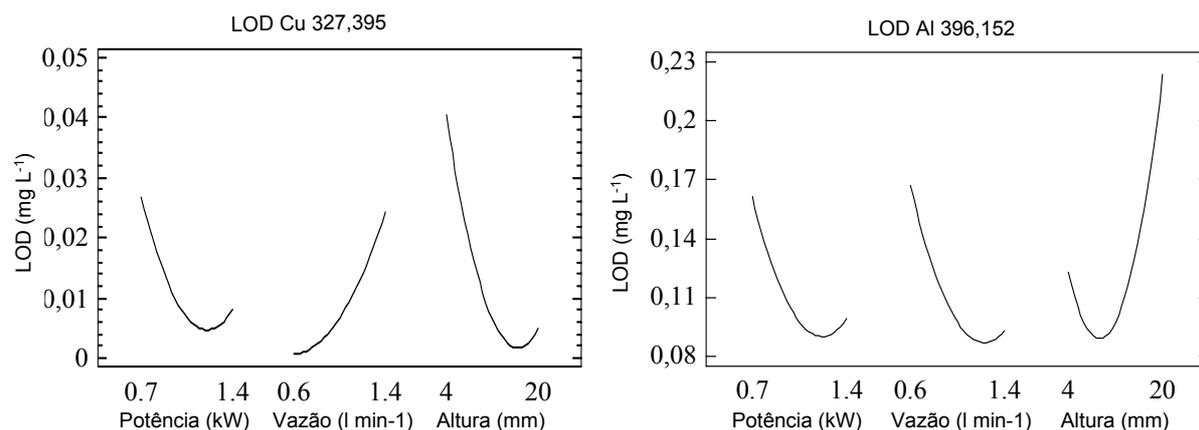


FIGURA 2.4 - Gráfico de efeitos principais mostrando a influência dos parâmetros potência aplicada, vazão do gás de nebulização e altura de observação sobre o limite de detecção para o Cu e para o Al. Plasma operado utilizando câmara de nebulização Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. soluções em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹. Diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm.

Na **Tabela 2.7** são apresentados os LOD's determinados para o ICP OES operado nas condições do experimento N° 2 (0,7 kW de potência e 1,4 L min⁻¹ de vazão de gás de nebulização) e do experimento N° 16 (1,4 kW de potência e 0,7 L min⁻¹ de vazão do gás de nebulização), do planejamento fatorial, sendo essas condições são consideradas não robustas e robustas, respectivamente, de acordo com a definição de robustez proposta por MERMET, (1991). Os resultados apresentados na **Tabela 2.7** foram obtidos com o plasma operado em condições robustas e não robustas, como forma de demonstrar que as condições de operação podem influenciar a capacidade de detecção do equipamento. Os limites de detecção para os analitos em meio HNO₃ e DTPA também foram avaliados.

As razões MgII/MgI obtidas para analitos em meio HNO₃ e DTPA quando o equipamento foi operado a 1,4 kW de potência e 0,7 L min⁻¹ de gás de nebulização foram iguais a 12,1 e 12,0 respectivamente. Portanto, condições robustas. No entanto, quando o equipamento foi operado a 0,7 kW de potência e 1,4 L min⁻¹ de gás de nebulização as razões MgII/MgI obtidas para analitos em meio HNO₃ e DTPA foram respectivamente 0,41 e 0,40 respectivamente, confirmando que o plasma estava não robusto.

Quando o equipamento foi operado em condições robustas, os LOD's geralmente foram relativamente inferiores aos limites determinados quando o equipamento foi operado em condições não robustas (**Tabela 2.7**) exceto para K e Na, que são elementos facilmente ionizáveis e não precisam de temperaturas e de tempo de residência elevados para ionização e excitação. Ainda nas condições não robustas e considerando a faixa de concentração estudada, 0 à 40 mg L⁻¹, não foi possível obter curva de calibração e conseqüentemente LOD's para as linhas de Al(II) 237,312; Co(II) 238,892; Co(II) 228,615; Cr(II) 205,560; Fe(II) 259,540; Mn(II) 260,568; Mo(II) 204,598; Ni(II) 231,604; Pb(II) 220,553; Se(I) 203,985, V(II) 309,310 e Zn (II) 26,200 para os analitos tanto em meio de HNO₃ como em meio de DTPA, bem como para as linhas de Cd(II) 214,439, Cr(II) 267,716; Fe(II) 238,204; Ni(II) 216,555, Pb(I) 217,000 e Se(I) 196,026 no meio de DTPA.

Outro aspecto avaliado e que também está apresentado na **Tabela 2.7** foi o meio em que se encontravam os analitos. Dentre os meios avaliados, HNO₃ e DTPA, pode-se observar que: para a maioria dos analitos, o emprego de HNO₃ apresentou LOD's inferiores, fato já esperado, pois a complexidade do DTPA e a presença do Ca em elevadas concentrações (~400 mg L⁻¹ de Ca²⁺) apresentam elevação do sinal de fundo e conseqüente elevação dos valores dos limites de detecção. Em meio de DTPA e em condições não robustas, K e Na apresentaram LOD's relativamente próximos aos limites apresentados quando em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹, indicando mais uma vez que a melhor condição para determinar baixas concentrações de K e Na são de menor potência e maior vazão. Também deve ser enfatizada a diferença entre os valores observados em função dos diferentes comprimentos de onda avaliados. A energia de excitação e ionização de cada linha avaliada também pode influenciar na obtenção dos LOS's.

TABELA 2.7 - Limites de detecção avaliados com plasma operado em condições robustas (1,4 kW de potência e 0,7 L min⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (0,7 kW de potência e 1,4 L min⁻¹ de gás de nebulização) e altura de observação em 8 mm. Analitos em meio de solução extratora DTPA e em meio HNO₃ 0,14 mol L⁻¹.

	Comp. de onda (nm)	LOD (mg L ⁻¹)			
		Robustas		Não Robustas	
		HNO ₃	DTPA	HNO ₃	DTPA
Al(I)	396,152	0,04	0,09	0,12	0,48
Al(II)	237,312	0,44	0,13	nd	nd
B(I)	249,772	0,06	0,03	1,10	0,19
B(I)	249,678	0,07	0,03	1,30	0,29
Ba(II)	455,403	0,02	0,02	0,13	0,03
Ba(II)	493,408	0,02	0,02	0,18	0,05
Ca(II)	396,847	0,02	nd	0,04	nd
Ca(I)	422,673	0,06	nd	0,03	nd
Cd(II)	214,439	0,10	0,01	4,11	nd
Cd(I)	226,505	0,08	0,02	18,1	6,9
Co(II)	238,892	0,27	0,85	nd	nd
Co(II)	228,615	0,08	1,35	nd	nd
Cr(II)	267,716	0,04	0,02	2,33	nd
Cr(II)	205,560	0,06	0,09	nd	nd
Cu(I)	327,395	0,04	0,07	0,06	0,19
Cu(I)	324,754	0,03	0,08	0,07	0,15
Fe(II)	238,204	0,04	0,07	16,6	nd
Fe(II)	259,940	0,06	0,10	nd	nd
K(I)	766,491	0,83	0,94	0,03	0,07
K(I)	769,897	1,60	1,36	0,11	0,09
Mg(II)	280,270	0,02	0,08	2,52	2,44
Mg(I)	285,213	0,02	0,08	0,25	0,29

(I) e (II): linhas de emissão atômicas e iônicas, respectivamente.

nd: não determinado dentro da faixa de concentração avaliada, por não ter sido possível a construção de uma curva de calibração para as linhas nas condições estudadas.

Continuação da Tabela 2.7.

	Comp. de onda (nm)	LOD (mg L ⁻¹)			
		Robusto		Não Robusto	
		HNO ₃	DTPA	HNO ₃	DTPA
Mn(II)	257,610	0,02	0,07	1,60	0,58
Mn(II)	260,568	0,03	0,07	nd	12,8
Mo(II)	202,032	0,32	0,05	28,0	nd
Mo(II)	204,598	0,24	0,15	nd	nd
Na(I)	589,592	0,03	2,42	0,02	0,06
Na(I)	588,995	0,10	2,58	0,03	0,08
Ni(II)	231,604	0,11	0,10	nd	25,13
Ni(II)	216,555	0,16	0,03	4,56	nd
P(I)	213,618	0,39	0,23	1,64	5,11
P(I)	178,222	nd	2,28	6,15	6,74
Pb(II)	220,553	1,10	0,07	nd	nd
Pb(I)	217,000	1,07	0,96	3,94	nd
S(I)	181,972	nd	0,45	9,11	33,07
S(I)	180,669	nd	3,11	19,89	nd
Se(I)	196,026	4,19	0,32	9,16	nd
Se(I)	203,985	1,37	0,90	nd	nd
Si(I)	251,611	0,05	0,07	0,96	0,82
Si(I)	288,158	0,05	0,08	0,36	1,26
V(II)	292,401	0,06	0,02	16,77	11,98
V(II)	309,310	0,03	0,03	nd	0,00
Zn(I)	213,857	0,03	0,07	0,46	0,38
Zn(II)	206,200	0,09	0,12	nd	nd

(I) e (II): linhas de emissão atômicas e iônicas, respectivamente.

nd: não determinado dentro da faixa de concentração avaliada, por não ter sido possível a construção de uma curva de calibração para as linhas nas condições estudadas.

A sensibilidade foi outro parâmetro importante investigado no planejamento fatorial quando o plasma foi operado em condições robustas e não robustas, com os analitos em meio de HNO_3 0,14 mol L⁻¹ e em meio de DTPA.

Comparando-se condições de operação (**Tabela 2.8**), percebe-se que em condições não robustas há um ganho de sensibilidade para as linhas atômicas dos elementos facilmente ionizáveis, quando comparadas com a sensibilidade para as mesmas linhas, mas com o plasma operado em condições robustas.

Quando a comparação é em relação ao meio que os analitos se encontram, as sensibilidades são próximas, porém maiores para a maioria dos elementos e comprimentos de onda quando o meio é HNO_3 0,14 mol L⁻¹.

Portanto, a sensibilidade é mais influenciada pelas condições de operação que pelo meio em que se encontra o analito. Vale ressaltar que, procurando-se adequar as condições de operação, avaliaram-se duas condições extremas de operação, fato que aumentou a relevância desse parâmetro.

TABELA 2.8. Sensibilidades obtidas com plasma operado em condições robustas (1,3 kW de potência e 0,7 L min⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (1,3 kW e 0,7 L min⁻¹) e altura de observação 8 mm. Analitos em meio de solução extrato da DTPA e em meio de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹.

	Comp. de onda (nm)	Sensibilidade em (CPS.L.mg ⁻¹)			
		Robusto		Não Robusto	
		HNO ₃	DTPA	HNO ₃	DTPA
Al(I)	396,152	2149	1926	118	126
Al(II)	237,312	144	129	nd	nd
B(I)	249,772	2997	2650	15	128
B(I)	249,678	1398	1214	8,7	92
Ba(II)	455,403	163413	142840	126	622
Ba(II)	493,408	18961	67526	85	412
Ca(II)	396,847	324278	nd	776	nd
Ca(I)	422,673	1372	nd	1524	nd
Cd(II)	214,439	2136	2530	1,67	nd
Cd(I)	226,505	4020	3296	1,65	12
Co(II)	238,892	1233	nd	nd	nd
Co(II)	228,615	1227	nd	nd	nd
Cr(II)	267,716	3686	2932	1,10	nd
Cr(II)	205,560	853	783	nd	nd
Cu(I)	327,395	3480	3094	279	330
Cu(I)	324,754	3737	3657	289	377
Fe(II)	238,204	3653	2666	4,32	4,2
Fe(II)	259,940	1304	1057	Nd	3,4
K(I)	766,491	429	360	3102	3040
K(I)	769,897	322	277	2274	2216
Mg(II)	280,270	23300	18527	15	2063
Mg(I)	285,213	3246	2836	111	136

(I) e (II): linhas de emissão atômicas e iônicas, respectivamente.

nd: não determinado dentro da faixa de concentração avaliada.

Continuação da Tabela 2.8

	Comp. de onda (nm)	Sensibilidade (CPS.L.mg ⁻¹)			
		Robusto		Não Robusto	
		HNO ₃	DTPA	HNO ₃	DTPA
Mn(II)	257,610	34803	27844	32	44
Mn(II)	260,568	2638	2073	nd	3,58
Mo(II)	202,032	738	715	nd	nd
Mo(II)	204,598	173	338	nd	nd
Na(I)	589,592	13807	7290	48504	29821
Na(I)	588,995	28991	14830	27978	50184
Ni(II)	231,604	407	327	nd	nd
Ni(II)	216,555	710	553	1,88	nd
P(I)	213,618	142	130	4,67	3,65
P(I)	178,222	0,19	13	0,75	1,68
Pb(II)	220,553	209	186	nd	nd
Pb(I)	217,000	67	67	1,12	nd
S(I)	181,972	1,36	46	1,97	2,18
S(I)	180,669	nd	20	0,44	2,79
Se(I)	196,026	77	92	1,49	28
Se(I)	203,985	62	76	nd	30
Si(I)	251,611	382	316	11	17
Si(I)	288,158	1386	1114	53	60
V(II)	292,401	4843	3869	3,16	28
V(II)	309,310	2881	2410	1,08	12
Zn(I)	213,857	2768	2475	29	31
Zn(II)	206,200	630	494	nd	0,79

(I) e (II): linhas de emissão atômicas e iônicas, respectivamente.

nd: não determinado dentro da faixa de concentração avaliada.

Os resultados, discutidos a partir das respostas do planejamento fatorial, permitem concluir que uma condição apropriada para análises de rotina realizada no equipamento avaliado, considerando a necessidade de conciliar LOD, sensibilidade e estabilidade do plasma, seria uma condição intermediária, que pudesse garantir a estabilidade do plasma durante as determinações. As condições estabelecidas foram as equivalentes ao experimento N° 1 do planejamento: 1,05 kW de potência aplicada, 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização, mas com altura de observação igual a 8 mm. Essa condição foi escolhida por levar a uma condição de um plasma relativamente robusto, com razões Mg(II)/Mg(I) igual a aproximadamente 7 para as diferentes amostras analisadas. Além disso, essa condição apresenta potencial para atender as necessidades das análises em termos de LOD's e sensibilidade.

2.4.2 – Faixa linear de calibração

A faixa linear de calibração foi avaliada no intervalo de concentração de 0,1 até 2000 mg L⁻¹ para Al, Co, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn. Apesar de não ter sido observada perda de linearidade para a maioria das linhas espectrais, soluções com concentrações superiores a 2000 mg L⁻¹ não foram avaliadas, tendo em vista que as soluções foram preparadas a partir de sais e o elevado teor de sólidos dissolvidos poderia interferir nas análises.

A faixa linear mostrada na **Tabela 2.9** apresenta somente os pontos experimentais maiores que o limite de quantificação. A faixa de calibração foi considerada linear até o ponto máximo cujo coeficiente de correlação calculado (r^2) foi maior que 0,99.

Para avaliação da faixa linear foram escolhidas as condições de operação do equipamento estabelecidas como robustas (1,3 kW de potência e 0,6 L min⁻¹ de vazão de gás de nebulização) e não robustas (0,9 kW de potência e 1,0 L min⁻¹ de vazão de gás de nebulização) e altura de observação de 8 mm, para os dois casos.

Para cada elemento, há pelo menos um comprimento de onda que apresentou comportamento linear até 2000 mg L⁻¹ (**Tabela 2.9**). Os elementos que não permitiram a calibração até 2000 mg L⁻¹ são, na maioria, os que apresentavam menores limites de

detecção. Nesse caso, se o analista desejar determinar um analito cuja concentração estiver fora do limite superior ou inferior de um dos comprimentos de onda, poderia optar por calibrar o equipamento para mais de um comprimento de onda, o que é permitido para a maioria dos softwares dos equipamentos disponíveis. Mas essa alternativa só será viável se a concentração a ser determinada estiver acima do limite de quantificação para aquele analito.

Ainda de acordo com os resultados apresentados na **Tabela 2.9**, pode-se verificar que as condições de operação do equipamento afetam a faixa linear de calibração bem como os limites de detecção e quantificação do equipamento.

Os resultados obtidos a partir da avaliação da faixa linear de calibração ressaltam a possibilidade de trabalhar em amplas faixas lineares de calibração para vários elementos simultaneamente. Com isso, é possível se determinar os analitos em diferentes concentrações sem a necessidade de diluições excessivas, diminuindo o tempo de análise, a produção de resíduos e os custos. Essa é uma das características vantajosas que torna os espectrômetros de emissão com fonte de plasma uma ótima ferramenta em laboratórios de rotina.

TABELA 2.9 - Faixa linear de calibração avaliada com plasma operado em condições robustas (1,3 kW de potência e 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização) e em condições não robustas (0,9 kW de potência e 1,0 L min⁻¹ de vazão de gás de nebulização). Altura de observação igual a 8 mm.

Elemento	Comp. de onda (nm)	1,3 kW; 0,6 L min ⁻¹		0,9 kW; 1,0 L min ⁻¹	
		Linearidade (mg L ⁻¹)	r ²	Linearidade (mg L ⁻¹)	r ²
Al	236,705	0,26 - 2000	0,998	0,89 - 1500	0,997
Al	237,312	0,15 - 2000	0,998	1,17 - 2000	0,999
Al	394,401	0,10 - 2000	0,999	0,76 - 2000	0,999
Al	396,152	0,03 - 2000	0,998	0,80 - 2000	0,999
Co	228,615	0,06 - 2000	0,999	0,43 - 2000	0,997
Co	230,786	0,07 - 2000	0,999	-	< 0,99
Co	231,160	0,17 - 2000	0,999	1,52 - 2000	0,996
Co	237,863	0,01 - 2000	0,999	-	< 0,99
Co	238,892	0,05 - 2000	0,999	0,31 - 2000	0,996
Cu	213,598	0,07 - 2000	0,999	1,08 - 2000	0,996
Cu	223,009	0,06 - 2000	0,999	0,95 - 2000	0,997
Cu	224,700	0,08 - 2000	0,999	1,10 - 2000	0,996
Cu	324,754	0,02 - 2000	0,999	0,00 - 2000	0,997
Cu	327,395	0,02 - 2000	0,999	0,00 - 2000	0,999
Fe	234,350	0,11 - 2000	0,998	0,94 - 2000	0,998
Fe	238,204	0,04 - 2000	0,996	1,49 - 2000	0,993
Fe	239,563	0,15 - 2000	0,993	1,31 - 2000	0,997
Fe	259,940	0,05 - 2000	0,996	0,45 - 2000	0,995
Fe	261,187	0,05 - 2000	0,998	1,32 - 2000	0,997
Fe	273,358	1,27 - 2000	0,998	0,79 - 2000	0,999
Fe	373,699	0,50 - 1000	0,999	0,76 - 2000	0,994

Continuação da Tabela 2.9.

Elemento	Comp. de onda (nm)	Condições robustas		Condições não robustas	
		*Linearidade (mg L ⁻¹)	r ²	*Linearidade (mg L ⁻¹)	r ²
K	344,637	3,45 - 1000	0,997	7,48 - 1000	0,994
K	344,738	-	< 0,99	16,5 - 1000	0,999
K	766,491	0,03 - 100	0,999	1,04 - 2000	0,999
K	769,897	0,41 - 2000	0,9928	0,94 - 2000	0,999
Mg	279,078	0,08 - 1000	0,999	0,97 - 400	0,992
Mg	279,553	0,003 - 100	0,999	0,00 - 100	0,999
Mg	279,800	0,03 - 1000	0,999	0,68 - 400	0,992
Mg	280,270	0,003 - 200	0,997	0,00 - 200	0,994
Mg	383,829	0,05 - 1000	0,997	0,96 - 1000	0,999
Na	330,237	2,54 - 2000	0,998	3,81 - 2000	0,999
Na	330,298	2,28 - 2000	0,999	2,16 - 2000	0,999
Na	568,821	7,20 - 2000	0,999	1,11 - 2000	0,999
Na	588,592	0,05 - 2000	0,998	0,00 - 2000	0,999
Na	589,592	0,05 - 2000	0,998	0,00 - 2000	0,999
Na	616,075	22,6 - 2000	0,999	3,97 - 2000	0,999
Zn	202,548	32,9 - 400	0,996	0,97 - 2000	0,997
Zn	206,200	114 - 1500	0,997	1,31 - 2000	0,999
Zn	213,857	0,03 - 400	0,996	1,08 - 600	0,996
Zn	330,258	0,80 - 2000	0,999	12,6 - 2000	0,998
Zn	334,502	0,14 - 2000	0,9999	1,08 - 2000	0,998

*O primeiro ponto da faixa linear de calibração foi obtido a partir do LOD, sendo o limite de detecção calculado considerando-se o BEC.

2.4.3 – Robustez do plasma

A robustez do plasma mediante presença dos extratos analisados foi avaliada medindo-se as razões MgII/Mg quando soluções de referência e extratos de amostras de farinha de trigo, milho e solo submetidas a digestão e solo submetido a extração com DTPA foram introduzidos no plasma. Nesse estudo, as soluções de referência foram preparadas no mesmo meio e concentração ácida que as amostras foram digeridas ou, no mesmo meio que foram realizadas as extrações no caso da extração com DTPA. Assim as soluções de referência continham os analitos adicionados e os extratos das amostras continham os analitos e mais outras espécies disponibilizadas durante a digestão ou extração, sendo que o efeito das soluções de referência sobre as propriedades do plasma pode ser diferente dos efeitos dos extratos das digestões ou extrações.

Na **Figura 2.5** é possível verificar que, exceto para o extrato da amostra de solo em meio de DTPA, não houve variação significativa da razão MgII/MgI quando a composição da matriz variou das soluções de referência para os extratos das amostras. As variações poderiam ser significativas se a concentração de elementos facilmente ionizáveis (ou o somatório desses elementos) que estão presentes em concentrações relativamente elevadas nesse tipo de amostra provocasse mudanças significativas na transferência de energia da periferia para o centro do plasma.

No caso dos solos extraídos em meio de DTPA ocorreu variação da razão MgII/MgI de ~ 6,5 para ~ 7,8, quando comparados as soluções analíticas e os extratos. As soluções analíticas eram compostas apenas pelos analitos em meio de DTPA, enquanto que os extratos continham ainda as espécies extraídas da matriz da amostra. A variação da razão pode ser resultante da presença de elementos facilmente ionizáveis ou da matéria orgânica, que provocam alterações na energia do plasma. Se a recuperação dos analitos em amostras controle ou material de referência certificado não for eficiente, deve-se considerar a possibilidade de elevar a potência aplicada para essa matriz.

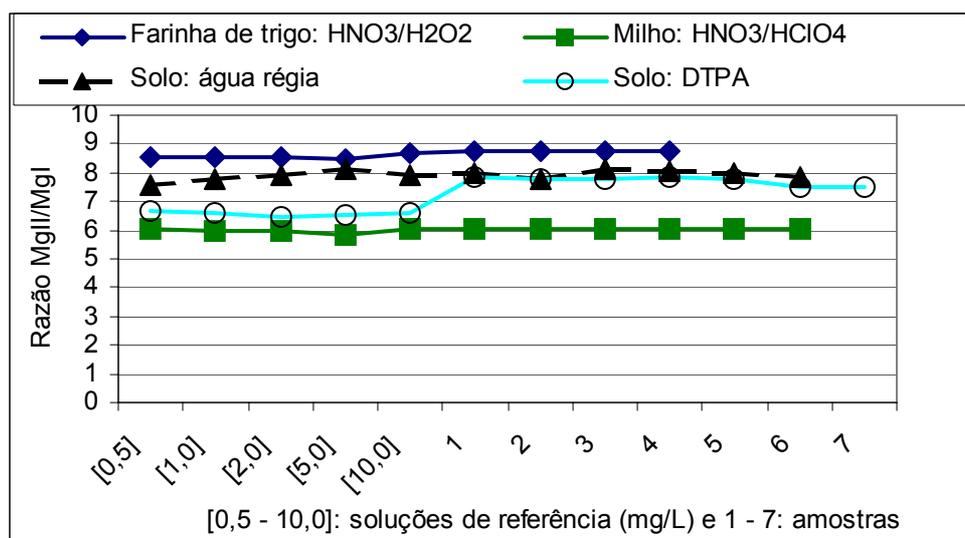


FIGURA 2.5 - Razões MgII/MgI obtidos com plasma operado com potência de 1,05 kW, vazão do gás de nebulização de 0,6 L min⁻¹, 8 mm de altura de observação, câmara de nebulização Sturman-Masters, nebulizador ranhura em V e diâmetro interno do tubo central da tocha de 1,8 mm. [0,5] à [10,0]: concentração das soluções de referência (mg L⁻¹); 1 à 7: extratos das amostras submetidas a digestão ou extração.

2.4.4 – Estabilidade do plasma

A estabilidade do plasma durante longo período foi avaliada medindo-se intensidades relativas das linhas de emissão argônio ao longo da determinação dos analitos nos extratos dos digeridos ou extraídos das amostras nos diferentes meios. Esse estudo foi realizado objetivando determinar o intervalo de tempo necessário para recalibrar o equipamento ao longo das determinações uma vez que em análises de rotina quando se faz medidas de um elevado número de amostras pode ser necessário a recalibração do equipamento durante as determinações.

Na **Figura 2.6** são mostrados as intensidades relativas das linhas de emissão de Ar 404,442 e 404,597, durante a determinação dos analitos em extratos de digeridos de material certificado em meio de HNO₃+H₂O₂ com plasma operado nas condições: 1,05 kW de potência, 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação, que possibilitou a obtenção de uma razão MgII/MgI aproximadamente igual a 7. É possível verificar que a partir de aproximadamente 55 determinações há uma variação

nas intensidades relativas de emissão que pode indicar a necessidade de recalibração do equipamento para assegurar que os resultados obtidos sejam confiáveis. Para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em meio de DTPA, as flutuações de intensidade relativa foram observadas a partir de 40 determinações.

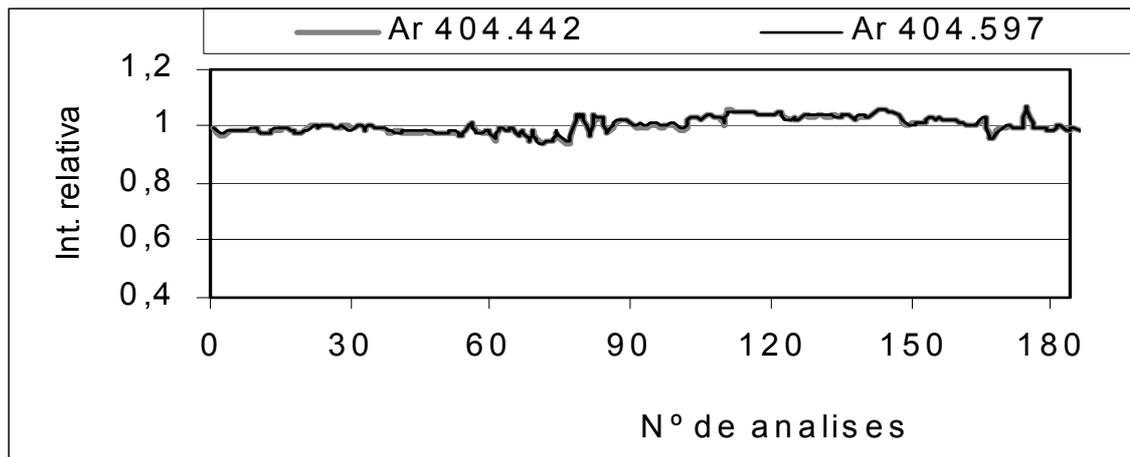


FIGURA 2.6 – Intensidade de emissão relativa das linhas de Ar durante a determinação analítica em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Condições de operação: potência de 1,05 kW, vazão do gás de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$, 8 mm de altura de observação, câmara de nebulização Sturman Master, nebulizador V-Groove.

2.4.5 – Sistema de introdução de amostra

Dois sistemas de introdução de amostras foram testados neste trabalho: a) câmara ciclônica com nebulizador concêntrico; e b) câmara Sturman-Masters com nebulizador do tipo ranhura em V. As duas câmaras têm como característica comum o fato de serem câmaras ciclônicas, porém a câmara Sturman-Masters é uma câmara de passo duplo, enquanto a ciclônica é uma câmara de passo simples. O nebulizador concêntrico é indicado para amostras com baixos teores de sólidos dissolvidos ($< 8 \% \text{ m/v}$) e sem a presença de sólido em suspensão. O nebulizador do tipo ranhura em V

suporta maior quantidade de sólidos dissolvidos e suspensões, é resistente a ácido fluorídrico e bases fortes, mas é considerado limitado devido à degradação do LOD e da sensibilidade (GAINES, 2005).

Os resultados apresentados na **Tabela 2.10** mostram que o desempenho de ambos os sistemas foi semelhante, tanto em relação aos LOD's quanto em relação à sensibilidade, o que é uma discordância em relação a informações da literatura, que o nebulizador ranhura em V degradaria o LOD e a sensibilidade (GAINES, 2005). A câmara Sturman-Masters avaliada, por ser de passo duplo, pode favorecer a seleção do aerossol, de modo que apenas as gotículas de pequenos diâmetros sejam direcionadas ao plasma. Essa pode ser a explicação para a obtenção de sensibilidades e LOD's similares para as duas câmaras, o que favorece o uso do conjunto câmara Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V, não tão dependente em termos de sólidos dissolvidos. Nos extratos de amostras de solo extraídos com DTPA e digeridos por via úmida, é comum a presença de partículas sólidas decantadas e em suspensão. Essas amostras não são apropriadas para introdução empregando nebulizador concêntrico, pois poderá entupir o nebulizador.

As características do aerossol que atinge o plasma podem influenciar na distribuição da energia da borda para o centro do plasma e são determinantes para a obtenção de parâmetros como LOD, sensibilidade e repetibilidade (DUBUISSON *et al.*, 1997, GROTTI *et al.*, 2006, GÓMEZ *et al.*, 2006, GAINES, 2005, IGLÉSIAS *et al.*, 2004).

TABELA 2.10 - Comparação do desempenho de sistemas de introdução de amostra: câmara ciclônica e nebulizador concêntrico; câmara Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V. Sensibilidades e LOD's para analitos em meio de HNO_3 0,14 mol L^{-1} com plasma operado em condições a 1,05 kW de potência e 0,6 L min^{-1} de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação. Taxas de nebulização 1,0 e 4,0 mL min^{-1} e razão MgII/MgI 8,1 e 7,2 respectivamente.

	Comp. de onda (nm)	Câmara ciclônica e nebulizador concêntrico		Câmara Sturman-Masters e nebulizador (ranhura em V)	
		LOD (mg L^{-1})	Sensibilidade (CPS.L.mg^{-1})	LOD (mg L^{-1})	Sensibilidade (CPS.L.mg^{-1})
Al(I)	396,152	0,06	2095	0,02	2058
Al(II)	237,312	0,32	121	0,21	113
B(I)	249,772	0,04	2182	0,02	2013
B(I)	249,678	0,04	1071	0,02	1028
Ca(II)	396,847	0,05	250396	0,48	247367
Ca(I)	422,673	0,06	1603	0,29	1564
Cd(II)	214,439	0,02	1262	0,02	1412
Cd(I)	226,505	0,01	1982	0,01	2209
Co(II)	238,892	0,04	753	0,03	642
Co(II)	228,615	0,02	611	0,03	805
Cr(II)	267,716	0,02	2068	0,03	2168
Cr(II)	205,560	0,05	478	0,06	510
Cu(I)	327,395	0,01	3059	0,05	3150
Cu(I)	324,754	0,01	3396	0,04	3122
Fe(II)	238,204	0,07	1779	0,03	1206
Fe(II)	259,940	0,14	796	0,03	835
K(I)	766,491	0,17	468	1,39	560
K(I)	769,897	0,45	340	4,00	380
Mg(II)	280,270	0,01	14412	0,02	14404
Mg(I)	285,213	0,02	3130	0,01	2993

(I) e (II): linha de emissão atômica e iônica, respectivamente.

Continuação da Tabela 2.10

	Comp. de onda (nm)	Câmara ciclônica e nebulizador concêntrico		Câmara Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V	
		LOD (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (CPS.L.mg ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (CPS.L.mg ⁻¹)
Mn(II)	257,610	0,01	19115	0,01	19836
Mn(II)	260,568	0,02	1504	0,01	1554
Mo(II)	202,032	0,07	471	0,08	505
Mo(II)	204,598	0,08	235	0,12	239
Na(I)	589,592	0,05	4442	0,15	4917
Na(I)	588,995	0,04	9173	0,31	10034
Ni(II)	231,604	0,05	206	0,06	221
Ni(II)	216,555	0,03	332	0,02	360
P(I)	213,618	0,32	80	0,34	96
P(I)	178,222	2,52	2,11	3,13	11
Pb(II)	220,553	0,50	107	0,19	119
Pb(I)	217,000	0,26	56	0,39	54
S(I)	181,972	0,6	32	1,72	37
S(I)	180,669	2,2	15	1,17	16
Se(I)	196,026	nd	2,49	12,75	4,18
Se(I)	203,985	1,23	14,51	4,18	12
V(II)	292,401	0,02	2950	0,02	3022
V(II)	309,310	0,04	1995	0,05	1991
Zn(I)	213,857	0,01	2194	0,02	2264
Zn(II)	206,200	0,07	270	0,12	272

(I) e (II): linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente. nd: não determinado

2.4.6 – Análises de materiais de referência

Normalmente em análises para avaliação nutricional de vegetais, nutrientes como Al, B, Cu, Mn, Fe, Mn, P e Zn em extratos de plantas estão em concentrações relativamente baixas nos extratos dos digeridos, sendo que os LOD's, os LOQ's e a sensibilidade do equipamento em duas condições de operação foram apresentados nas **Tabelas 2.9 e 2.10**. O LOD e o BEC foram calculados conforme sugerido pela IUPAC (1978) e por THOMSEN *et al.* (2000), sendo os LOD's e a sensibilidade relativa do equipamento para os analitos avaliados em meio de HNO₃, água régia, HNO₃+HClO₄ e DTPA determinados para a condição escolhida como adequada para as análises multielementares.

Nas **Tabelas 2.11, 2.12, 2.13 e 2.14**, são apresentadas os teores dos analitos determinados em diferentes extratos de materiais de referência certificado (NIST) e em amostra controle (IAC). Alguns analitos avaliados tais como Al em farelo de milho e Cd, Mo, Ni e Pb em farelo de milho e folha de pessegueiro não foram determinados porque as concentrações nos extratos encontravam-se abaixo dos limites de quantificação estabelecidos. Os teores dos demais elementos determinados estão em concordância com os valores certificados a um nível de 95 % de confiança de acordo com teste *t* de Student.

TABELA 2.11 - Concentração dos analitos determinados em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ com plasma operado nas condições: 1,05 kW de potência, $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação. Razão MgII/MgI aproximadamente 7

	Comp. de onda (nm)	Digestão em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$			
		Folha de pessegueiro (NIST 1547)		Farelo de milho (NIST 8433)	
		Determinado (mg kg^{-1})	Certificado (mg kg^{-1})	Determinado (mg kg^{-1})	Certificado (mg kg^{-1})
Al(I)	396,152	238 ± 12	245 ± 8	$< 6,0$	$1,01 \pm 0,55$
B(I)	249,772	$32,3 \pm 1,8$	29 ± 2	$3,6 \pm 1,58$	$2,8 \pm 1,2$
Ba(II)	455,403	119 ± 3	124 ± 4	$2,60 \pm 0,10$	$2,40 \pm 0,52$
Ca(I)	422,673	$13240 \pm 515^*$	15600 ± 200	405 ± 17	420 ± 38
Cd(I)	226,505	$< 3,0$	$0,026 \pm 0,003$	$< 3,0$	$0,012 \pm 0,005$
Cu(I)	324,754	$4,02 \pm 0,31$	$3,7 \pm 0,4$	$2,75 \pm 0,87$	$2,47 \pm 0,40$
Fe(II)	238,204	231 ± 7	218 ± 14	$11,6 \pm 0,8$	$14,8 \pm 1,8$
K(I)	766,491	$18310 \pm 715^*$	24300 ± 300	482 ± 29	566 ± 75
Mg(II)	280,270	3987 ± 285	4320 ± 80	760 ± 42	818 ± 59
Mn(II)	257,610	106 ± 4	98 ± 3	$3,03 \pm 0,35$	$2,55 \pm 0,29$
Mo(II)	202,032	$< 8,0$	$0,06 \pm 0,08$	$< 8,0$	$0,252 \pm 0,039$
Na(I)	588,995	32 ± 7	24 ± 2	385 ± 26	430 ± 31
Ni(II)	216,555	$< 3,0$	$0,69 \pm 0,09$	$< 3,0$	$0,158 \pm 0,054$
P(I)	213,618	1254 ± 82	1370 ± 70	159 ± 9	171 ± 11
Pb(II)	220,553	< 60	$0,87 \pm 0,03$	< 60	$0,140 \pm 0,034$
S(I)	181,972	< 60	nd	684 ± 192	860 ± 150
V(II)	292,401	$< 2,0$	$0,37 \pm 0,03$	$< 2,0$	$0,005 \pm 0,002$
Zn(I)	213,857	$16,71 \pm 0,24$	$17,9 \pm 0,4$	$16,72 \pm 0,25$	$18,6 \pm 2,2$

N = 4; *diluições superiores a 50 vezes.

TABELA 2.12 - Concentração dos analitos determinados em extratos de digeridos de material certificado em meio de $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$, com plasma operado nas condições: 1,05 kW de potência, $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação.

	Comp. de onda (nm)	Digestão via úmida em meio de $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$ (4:1 v v ⁻¹)	
		Folha de pessegueiro (NIST 1547)	
		Determinado (mg kg^{-1})	Certificado (mg kg^{-1})
Al(I)	396,152	254 ± 16	245 ± 8
Ba(II)	455,403	109 ± 11	124 ± 4
Ca(II)	396,847	15098 ± 863	15600 ± 200
Cu(I)	324,754	$4,20 \pm 0,64$	$3,7 \pm 0,4$
Fe(II)	238,204	215 ± 7	218 ± 14
K(I)	766,491	22357 ± 1075	24300 ± 300
Mg(II)	280,270	4008 ± 622	4320 ± 80
Mn(II)	257,610	101 ± 7	98 ± 3
P(I)	213,618	1264 ± 84	1370 ± 70
Zn(I)	213,857	$17,5 \pm 0,9$	$17,9 \pm 0,4$

N = 3.

A determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em meio DTPA foi avaliada utilizando-se 8 tipos diferentes de solo provenientes de programa interlaboratorial coordenado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (Ensaio de Proficiência IAC para Laboratórios de Análise de Solo para Fins Agrícolas). Na **Tabela 2.13** são apresentadas as concentrações obtidas, podendo-se verificar a concordância com o intervalo de variação. Duas condições de operação foram avaliadas. Na condição designada por A* (**Tabela 2.13**), o plasma foi operado a 1,05 kW de potência e $0,6 \text{ L min}^{-1}$ de vazão de gás de nebulização. Nessa condição havia sido constatado que quando a composição da solução muda de meio extrator para meio extrator + matriz da amostra, a razão MgII/MgI varia de $\sim 6,8$ para $\sim 7,8$, indicando alteração na transferência de energia do plasma (**Figura 2.5**).

Na condição designada como B* (**Tabela 2.13**), houve elevação da potência de 1,05 kW para 1,15 kW. Limites de detecção semelhantes, melhora na sensibilidade e diminuição dos desvios padrão foram observados para todos os elementos, sendo que os valores encontrados estão dentro do intervalo de variação da amostra controle.

Portanto, a condição de operação para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de solo em meio DTPA pode também ser estabelecida como: 1,05 kW de potência, 0,6 L min⁻¹ de vazão de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação.

TABELA 2.13 - Comparação de LOD's, sensibilidades e valores determinados de Cu, Fe Mn e Zn em extratos de solo em meio de solução extratora DTPA com plasma operado em condições: (A*); 1,05 kW de potência e 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização e (B*); 1,15 kW de potência e 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização. A altura de observação foi mantida em 8 mm para ambas as condições.

	Comp. de onda (nm)	Extração com DTPA						
		LOD (mg L ⁻¹)		Sensibilidade (CPS.L.mg ⁻¹)		Valores determinados: Solo IAC 274 (mg kg ⁻¹)		
		A*	B*	A*	B*	A*	B*	Valor referência
Cu(I)	327,395	0,02	0,02	3697	4261	1,94 ± 0,12	2,03 ± 0,14	1,81 ± 0,41
Fe(II)	238,204	0,08	0,07	1965	2536	13,93 ± 1,85	14,58 ± 0,45	14,8 ± 2,3
Mn(II)	257,610	0,07	0,07	20416	25964	3,27 ± 0,60	4,38 ± 0,20	3,87 ± 1,17
Zn(I)	213,857	0,01	0,07	2027	2364	1,60 ± 0,14	1,54 ± 0,10	1,34 ± 0,34

A determinação dos analitos em solo (material de referência certificado NIST 2709), seguiu a método desenvolvido por VIEIRA *et al.*, (2005). Os valores determinados são concordantes com os valores certificados (**Tabela 2.14**).

TABELA 2.14 – Teores dos analitos determinados em digeridos de solo (material de referência certificado - NIST 2709 – San Joaquim Soil) em meio de água régia+H₂O₂+HF. Plasma operado nas seguintes condições: 1,05 kW de potência; 0,6 L min⁻¹ de gás de nebulização e 8 mm de altura de observação.

	Comp. de onda (nm)	Digestão em meio de água régia+H ₂ O ₂ + HF	
		San Joaquim Soil (NIST 2709)	
		Determinado (mg kg ⁻¹)	Certificado (mg kg ⁻¹)
Al(I)	396,152	75752 ± 340	75000 ± 600
Ba(II)	455,403	985 ± 43	968 ± 40
Ca(II)	396,847	19855 ± 1056	18900 ± 500
Cu(I)	324,754	32,8 ± 2,1	34,6 ± 0,7
Cr(II)	267,716	127 ± 9	130 ± 4
Fe(II)	238,204	33861 ± 934	35000 ± 1100
Mg(II)	280,270	13978 ± 828	15100 ± 500
Mn(II)	257,610	531 ± 45	538 ± 17
V(II)	292,401	106 ± 7	112 ± 5
Zn(I)	213,857	102 ± 8	106 ± 3

N = 3.

2.4.7 – Viabilidade de ICP OES como técnica monoelementar

A extração do B em amostras vegetais normalmente é realizada por via seca. As determinações desse elemento podem ser feitas por espectrofotometria, com o emprego do reagente azometina-H (WOLF, 1971). Para avaliar a viabilidade dessas análises serem feitas em ICP OES, realizou-se o levantamento de custos de análises e viabilidade dos métodos comparando-se os dois protocolos de determinação. Para 2500 determinações, o preço total considerando todos os reagentes, manutenção e mão de obra foi de R\$ 3.100,00 (R\$ 1,24 por determinação) quando feitas por ICP OES e R\$ 6.860,00 (R\$ 2,74 por determinação) quando feitas por espectrofotometria (**Tabela 2.15**). Os resultados indicaram a viabilidade econômica do emprego do ICP OES na determinação monoelementar de B, visto que a azometina-H, além de ser um reagente caro, produz resíduos tóxicos que necessitam o estabelecimento de protocolo de tratamento. Já na determinação por ICP OES são gerados resíduos ácidos, facilmente neutralizáveis. É necessário se enfatizar que os custos podem ser alterados em função do preço do cilindro de argônio, que pode variar dependendo da região de localização do laboratório e do fornecedor.

TABELA 2.15 - Comparativo de custos de análises de boro por ICP OES ou por espectrofotometria (método da azometina-H).

Descrição	ICP OES (2500 análises)		Espectrofotometria (2500 determinações)	
		Custo (R\$)		Custo (R\$)
Reagentes	Solução de referência	100,00	Reagentes	4.860,00
Horas de trabalho	60	900,00	125	1.875,00
Energia elétrica		550,00		25,00
Argônio		1.000,00	-	-
Material de consumo	Manutenção, tocha, tubos, câmara	500,00	Manutenção, cubetas, lâmpadas	100,00
Tratamento de resíduos	5 L HNO ₃ 1% (v v ⁻¹)	50,00	12 L de solução de solução resíduária contendo azometina	*
Total		3.100,00		6.860,00

Levantamento de preço realizado em fevereiro de 2006; *Resíduo tóxico, sem protocolo definido para o tratamento. Nos cálculos foi considerado o valor de R\$ 15,00 por hora de trabalho, não sendo incluídos os gastos com o preparo das amostras.

2.4.8 – Protocolo proposto para a determinação de nutrientes em amostras de solos e material vegetal por ICP OES

As condições otimizadas de operação do ICP OES para determinação de alguns analitos em materiais vegetais e extratos de solos estão apresentadas na **Tabela 2.16**. Essas condições foram otimizadas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn nos extratos de material vegetal decompostos com a mistura HNO₃+HClO₄ 4:1 (v/v). Outros elementos, tais como Al, B, Cd, Co, Cr, Ni, Pb, S e V também podem ser determinados nas mesmas condições, dependendo apenas dos teores presentes. Nas mesmas condições podem ser determinados os microelementos Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de solos em meio de DTPA; Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, V e Zn em extratos de materiais vegetais digeridos em meio de HNO₃+H₂O₂. A recalibração do equipamento é recomendada a cada 55 determinações (**Figura 2.6**).

TABELA 2.16 – Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro.

Parâmetro operacional			
Potência RF (kW)			1,05
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)			15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)			1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)			0,6
Tempo de leitura das replicata (s)			1
Tempo de espera de estabilização (s)			15
Taxa de nebulização da amostra (mL min ⁻¹)	1,0 e 4,0 (nebulizadores concêntrico e ranhura em V, respectivamente)		
Altura de observação (mm)			8
Linhas de emissão (nm)	Al(I) 396,152 B(I) 249,772 Ba(II) 455,403 Ca(II) 422,673 Cd(II) 226,505 Co(II) 238,892 Cr(II) 267,715	Cu(I) 324,754 Fe(II) 238,204 K(I) 766,491 Mg(II) 280,270 Mn(II) 257,610 Mo(II) 202,032 Na(I) 588,995	Ni(II) 216,555 P(I) 213,618 Pb(II) 220,556 S(I) 181,972 Si(I) 288,158 V(II) 292,401 Zn(I) 213,857

(I) e (II)– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

Na **Tabela 2.17** são apresentados os parâmetros limites de detecção e a sensibilidade de cada comprimento de onda nas condições definidas na **Tabela 2.16**, para a determinação Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn nos extratos de material vegetal decompostos com a mistura $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$. Outros elementos, tais como Al, B, Cd, Co, Cr, Ni, Pb, S e V também podem ser determinados nas mesmas condições, dependendo apenas dos teores presentes. Na **Tabela 2.18** também são apresentados os parâmetros operacionais limites de detecção e a sensibilidade de cada comprimento de onda nas condições definidas, mas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de solos em meio de solução extratora de DTPA. A recalibração do equipamento para determinações em meio de DTPA é recomendada a cada 40 determinações (**Figura 2.6**).

TABELA 2.17 – Parâmetros operacionais e analíticos para a determinação multielementar por ICP OES em extratos de material vegetal digeridos em bloco digestor empregando 6 mL da mistura HNO₃+HClO₄ (4:1 v v⁻¹).

Elemento	Comp. de onda (nm)	LOD (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (CPS/mg L ⁻¹)	Intervalo de calibração (mg L ⁻¹)*
Ca(I)	422,673	0,05	1603	0,16 a 20
Cu(I)	324,754	0,01	3059	0,09 a 5,0
Fe(II)	238,204	0,07	1779	0,25 a 20
K(I)	766,491	0,17	468	0,60 a 20
Mg(II)	280,270	0,01	14412	0,09 a 20
Mn(II)	257,610	0,01	19115	0,09 a 4,0
Na(I)	588,995	0,04	9193	0,15 a 20
P(I)	213,618	0,32	80	1,0 a 12
Zn(I)	213,857	0,01	2194	0,09 a 1,5
Outros elementos possíveis de serem determinados com as mesmas condições de operação				
Al(I)	396,152	0,02	2092	A ser estabelecido de acordo com a necessidade
Ba(II)	455,403	0,03	142840	
Cd(I)	226,505	0,01	1982	
Co(II)	238,892	0,03	-	
Ni(II)	216,555	0,02	332	
Pb(II)	220,553	0,19	107	
S(I)	181,972	1,72	32	
V(II)	292,401	0,02	2950	

*Intervalo estabelecido em função dos limites de quantificação do equipamento (3,33 x LOD) e dos teores médios encontrados nas amostras de solo pelo procedimento de extração avaliado. Faixa dinâmica linear > 10³ mg L⁻¹.

TABELA 2.18 – Parâmetros operacionais e analíticos para determinação multielementar por ICP OES em extratos de solo (solução extratora de DTPA).

Elemento	Comp. de onda (nm)	LOD (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (CPS/mg L ⁻¹)	Intervalo de calibração (mg L ⁻¹)*
Cu(I)	324,754	0,07	3657	0,09 a 8,0
Fe(II)	238,204	0,07	2666	1,0 a 30
Mn(II)	257,610	0,07	27844	0,80 a 4,0
Zn(I)	213,857	0,07	2474	0,10 a 1,5

*Intervalo estabelecido em função dos limites de quantificação do equipamento (3,33 x LOD) e dos teores médios encontrados nas amostras de solo pelo procedimento de extração avaliado. Faixa dinâmica linear > 10³ mg L⁻¹.

2.5 - CONCLUSÃO

A avaliação das condições de operação do ICP OES de forma sistemática possibilitou determinar as condições de trabalho adequadas às necessidades de análises de rotina sem a aplicação de potências elevadas.

Dentre os parâmetros avaliados no planejamento fatorial, a vazão do gás de nebulização foi o que mostrou-se mais importante para a obtenção de maiores razões MgII/MgI, ou seja, para obtenção de um plasma robusto. A potência aplicada foi o segundo parâmetro mais importante, seguido pela altura de observação.

A interpretação das respostas do planejamento (**Figura 2.2**), permitiu concluir que tem-se um plasma relativamente robusto quando o equipamento é operado a uma potência aplicada intermediária (1,05 kW), baixa vazão de gás de nebulização ($0,6 \text{ L min}^{-1}$) e altura de observação média (8 mm). A robustez nessa condição foi comprovada para introdução de analitos em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$, DTPA e água régia (**Figura 2.5**). A aplicação dessa condição para determinação dos analitos permitiu: (a), a determinação de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S e Zn em extratos de vegetais digeridos em meio de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ (**Tabela 2.11**); (b), a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn nos extratos de material vegetal decompostos com a mistura $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$ (**Tabela 2.12**); (c), a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de solos em meio de DTPA (**Tabela 2.13**); e (d) a determinação de Al, Ca, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn em extratos de solos digeridos em meio de água régia (**Tabela 2.14**). Outros elementos, tais como Cd, Co, Cr, Mo, Ni, Pb e V, em materiais vegetais, também podem ser determinados na mesma condição, dependendo apenas dos teores presentes.

A condição de operação mostrou-se um fator crítico na determinação de parâmetros como LOD e sensibilidade. Condições robustas permitiram a obtenção de baixos LOD's e elevada sensibilidade, enquanto que para condições não robustas o mesmo desempenho não foi observado, tanto para os analitos em meio de HNO_3 e como em meio de solução extratora de DTPA (**Tabela 2.8**).

Ambos os sistemas de introdução de amostra testados, Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V e câmara ciclônica com nebulizador concêntrico, apresentaram desempenho similares quanto à obtenção de sensibilidades e LOD's (**Tabela 2.10**), mas esse resultado favorece o uso do conjunto câmara Sturman-Masters e nebulizador ranhura em V, pois esse sistema apresenta menos problemas em relação a entupimento durante análises de rotina.

Os resultados obtidos a partir da avaliação da faixa linear de calibração mostraram que todos os comprimentos de onda avaliados possuem uma faixa dinâmica linear $> 10^3$, e que para cada analito é possível a determinação de concentrações superiores a 1000 mg L^{-1} (**Tabela 2.9**). Isso permite a determinação de analitos em maior ressaltam a possibilidade de determinar os analitos em diferentes concentrações sem a necessidade de diluições excessivas, diminuindo o tempo de análise, a produção de resíduos e os custos. Essa característica reforça as vantagens da utilização de espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente em análises de rotina.

A determinação de boro por ICP OES, mesmo com o equipamento utilizado para determinação de forma monoelementar, mostrou-se mais vantajosa quando comparada com a determinação por espectrofotometria, tanto economicamente como ambientalmente, visto que a azometina-H (reagente utilizado na determinação por espectrofotometria), além de ser um reagente caro, produz resíduos tóxicos que necessitam o estabelecimento de protocolo de tratamento. Já na determinação por ICP OES são gerados resíduos ácidos, facilmente neutralizáveis e os custos de determinação são inferiores (**Tabela 2.15**).

A otimização das condições de operação do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e o estabelecimento de um protocolo para utilização desse equipamento em análises de rotina permitem aos operadores realizarem as determinações com maior confiabilidade e sem a necessidade de

otimização das condições de operação a cada nova determinação, uma vez que essa etapa já foi previamente estabelecida.

Capítulo 3

**3 - ESPECIAÇÃO DE Fe-PROTEÍNAS EM ALIMENTOS CRUS
E PROCESSADOS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIODISPONIBILIDADE POR SEC-UV-ICP-MS**

3.1 - REVISÃO DA LITERATURA

Identificar compostos específicos nas amostras sejam elas ambientais, biológicas ou tecnológicas, tem se tornado o “estado da arte” em química analítica e a demanda por esse tipo de determinação tem fomentado inúmeras pesquisas (SZPUNAR, 2005).

3.1.1 – Metaloproteínas

Conhecer o comportamento e as funções dos complexos formados por biomoléculas, como proteínas, com metais, tem sido um desafio de interesse para vários campos da ciência. Esse interesse foi ampliado com o avanço nos estudos da genômica e da proteômica, que colocou em destaque o papel dos metais nas diversas funções das proteínas e enzimas. O conjunto de biomoléculas, que inclui as metaloproteínas e as metaloenzimas que se ligam ou interagem com metais numa célula, tecido ou organismo, faz parte da metalômica (HARAGUCHI, 2004), termo utilizado para nomear a ciência que estuda os biometais (SZPUNAR, 2004; SZPUNAR, 2005; HARAGUCHI, 2004).

Na literatura é feita uma distinção entre metaloproteínas e metais-proteínas. As primeiras se referem às proteínas que estão ligadas a metais por ligações de alta afinidade, como ligações covalentes, que não são facilmente rompidas durante a manipulação das amostras para isolar a proteína. Já no segundo caso as interações proteína-metal são fracas, de baixa afinidade e facilmente destruídas (GARCIA *et al.*, 2006).

3.1.2 - Técnicas de separação e detecção de metaloproteínas

As proteínas podem ser isoladas e purificadas aplicando os modos cromatográficos de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade ou fase reversa. Essas

técnicas são usadas comumente para análises e purificação de peptídeos (GARCIA *et al.*, 2006).

Em estudos de investigação de complexos de metaloproteínas em que é necessário se preservar a interação entre os metais e as proteínas o ideal é que a técnica de separação não separe o metal de interesse do composto ao qual se encontra ligado (ASHCROFT, 2005). Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a ICP-MS tem sido empregada em estudos visando obter informações sobre a distribuição do peso molecular de complexos metalo-proteínas (SADI *et al.*, 2002; MARTINO *et al.*, 2002; FARRARELLO *et al.*, 2002; WUILLOUD *et al.*, 2004a; WUILLOUD *et al.*, 2004b; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2004a; MUÑOZ *et al.*, 2005; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2005).

Para enfrentar o novo desafio da química analítica: identificar e entender os mecanismos de interação entre íons metálicos e macromoléculas, além das técnicas de separação já mencionadas, são necessárias técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar espécies elementares, presentes nos tecidos biológicos, em concentrações em ordem de grandezas de ng L^{-1} . A aquisição deste tipo de dado é possível com técnicas hífenadas (acopladas) que combinam técnicas de separação de alta resolução com técnicas de detecção elementar de alta sensibilidade (SZPUNAR, 2005).

Várias técnicas têm sido empregadas na identificação e detecção de metaloproteínas. Particularmente como técnicas para a identificação destacam-se a espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) (ASHCROFT, 2005). Espectrometria de massas com tempo de voo e ionização/dessorção da matriz assistida por ablação a laser (MALDI-TOF-MS) e ressonância magnética nuclear (NMR) (GARCIA *et al.*, 2006).

Em estudos visando à especiação química, as técnicas mais empregadas na determinação elementar são a espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (SZPUNAR, 2000; WIND & LEHMANN, 2004; FELDMANN, 2005). Essas técnicas se destacam pela versatilidade na possibilidade da hífenação. A(s) técnica(s) hífenada(s) a ser(em) escolhida(s) depende(m) do objetivo da investigação, do tipo de matriz e das propriedades físico-químicas do analito. As vezes não é possível a separação e

detecção em linha, como quando é empregado eletroforese em gel de poliacrilamida na separação seguida pela realização da detecção das espécies metálicas (GARCIA, *et al.*, 2006; SZPUNAR, 2000). Uma característica que pode tornar uma técnica vantajosa é a possibilidade de determinações multielementares.

A espectroscopia de absorção atômica tem sido empregada majoritariamente como técnica monoelementar. Entretanto, já há equipamentos no mercado que permitem a detecção de vários elementos simultaneamente. Espectrômetro de absorção atômica com chama pode ser acoplado diretamente a sistema de separação como HPLC. As vazões da amostra nessa técnica são compatíveis com a típica vazão e com a composição da fase móvel, embora o acoplamento de técnicas de separação como HPLC-FAAS não seja a primeira opção de quem pretende determinar complexos de metaloproteínas devido à baixa sensibilidade da técnica (SZPUNAR, 2000).

No caso da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, que tem sensibilidade relativamente alta, o acoplamento à técnica de separação é dificultado devido ao caráter de descontinuidade dos processos de separação e determinação. No entanto, determinações de metaloproteína “off-line” já foram propostas (CABEZUELO *et al.*, 1997).

Os baixos limites de detecção proporcionados pela ICP-MS a tornaram uma ferramenta poderosa e desejada nos laboratórios de química analítica, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de pesquisas envolvendo especificação (HEBERT, 2002).

O acoplamento de equipamentos de ICP-MS com sistemas de separação como cromatografia à líquido (LC), cromatografia à gás (CG) ou eletroforese capilar (CE) para espécies contendo íons metálicos ou mesmo não metálicos como o fósforo e o enxofre, é relativamente simples (SZPUNAR, 2000; MATSURA *et al.*, 2001; CABAÑERO *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2004; FELDMANN, 2005; MITRA, 2005; CABAÑERO *et al.*, 2005, PINHEIRO *et al.*, 2005; CÁMARA *et al.*, 2005a).

3.1.3 – Aspectos nutricionais dos minerais

Em termos nutricionais, as metaloproteínas são importantes como fonte protéica e principalmente como fonte de metais de alta biodisponibilidade, sendo que o processo de cozimento (ou manipulação) dos alimentos pode tornar não biodisponível ou destruir as metaloproteínas (COZZOLINO, 2005).

Há mais de um século, o papel desempenhado pelos elementos metálicos nos organismos vivos vem despertando interesse nas comunidades científicas (IYENGAR *et al.*, 1998). Diversos processos biológicos que ocorrem nos organismos humanos, tais como a ação das metaloenzimas, podem ser afetados devido a carência ou ao excesso de alguns elementos metálicos. Em outros elementos ainda não se conhecem todos os efeitos que podem provocar aos seres humanos (TSALEV, 1984; GOYER, 1995).

Fisiologicamente importantes, elementos a níveis de traços são comumente encontrados nos organismos vivos associados com macromoléculas, principalmente proteínas, que são complexos responsáveis por funções específicas associadas a processos bioquímicos (SZPUNAR & LOBINSKI, 1999; RAAB & BRÄTTER, 1998). A concentração de um ou mais destes complexos metálicos muda muitas vezes de maneira característica durante os processos fisiológicos. Tais mudanças podem ser sutis o suficiente que não serão discriminadas do erro analítico como, por exemplo, somente a concentração total é determinada (RAAB & BRÄTTER, 1998). Enquanto alguns elementos traço como Hg, Pb, Cd ou As podem ser altamente tóxicos para os seres vivos, outros considerados essenciais tais como Fe, Zn, Cu e Se podem ser considerados tóxicos quando em elevadas concentrações (GOÑI *et al.*, 2002). Neste contexto, a qualidade nutricional dos alimentos está relacionada não só a concentração dos minerais como também à concentração e ao tipo de proteínas presentes. Determinação da digestibilidade dos nutrientes empregando digestões enzimáticas com pepsina e pancreatina, simulando processos que ocorrem no sistema digestivo do indivíduo tem sido freqüentemente empregada na avaliação do valor nutricional dos alimentos (PROMCHAN & SHIOWATANA, 2005).

3.1.4 – Especificação química

Informações sobre a distribuição dos elementos nos alimentos é importante e necessária para estimar a absorção de elementos essenciais e avaliar os potenciais riscos à saúde causados pela exposição a elementos tóxicos. Diversos elementos essenciais presentes nos alimentos são estudados, mas o Fe é sem dúvida um dos mais investigados devido a problemas de saúde pública causado pela anemia, que se caracteriza pela deficiência de ferro no organismo. (KANNAMKUMARATH *et al.*, 2004; WROBEL *et al.*, 2003; VONDERHEIDE *et al.*, 2002; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2002; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2001).

3.1.5 – Biodisponibilidade

Boa parte das informações descritas neste item da revisão foram encontradas a partir da leitura de um livro publicado recentemente por Cozzolino (COZZOLINO, 2005). Nessa referência é possível encontrar informações não só sobre os conceitos básicos, mas também informações de caráter científico sobre pesquisas desenvolvidas recentemente visando a compreensão da biodisponibilidade dos nutrientes.

O termo biodisponibilidade foi proposto pelo Food and Drug Administration (FDA-EUA) dos Estados Unidos para a área de farmacologia, com o objetivo de estabelecer a proporção em que determinada substância ativa era absorvida da forma farmacêutica, alcançava a circulação e tornava-se disponível no sítio de ação, e a razão na qual isto ocorria (SHETH, 1974).

Na década de 1980 esse termo passou a ser utilizado também na área de nutrição, a partir do conhecimento de que a simples presença do nutriente no alimento ou na dieta ingeridos não garantia sua utilização pelo organismo. Essa utilização dependeria da forma química, da quantidade e da presença de ligantes e de outros nutrientes nos alimentos que são ingeridos ao mesmo tempo (COZZOLINO, 2005).

Definições do termo biodisponibilidade foram criadas e modificadas ao longo dos últimos anos. A definição vigente do termo foi proposta na conferência internacional sobre biodisponibilidade realizada em 1997 em Wageningen, Holanda:

“refere-se à fração de qualquer nutriente ingerido que tem o potencial para suprir demandas fisiológicas em tecidos alvos” (WIENK *et al.*, 1999).

Mais recentemente, em 2001, no congresso sobre biodisponibilidade, foi concluído que os estudos sobre biodisponibilidade devem considerar três aspectos: bioconversão, bioeficácia e bioeficiência.

Bioconversão: definida como a proporção do nutriente ingerido que estará biodisponível para a conversão em sua forma ativa (TANUMIHARDJO, 2002).

Bioeficácia: definida como a eficiência com a qual os nutrientes ingeridos são absorvidos e convertidos à forma ativa do nutriente (Van LIESHOUT *et al.*, 2002).

Bioeficiência: definida como a proporção da forma ativa convertida do nutriente absorvido que atingirá o tecido alvo (MOLLOY, 2002).

Na literatura é possível encontrar estudos relatando a biodisponibilidade de vários elementos, sendo que estes estudos se concentram principalmente na avaliação da toxicidade de elementos como o As, Se e Hg que apresentam elevada toxicidade ao organismo (CABAÑERO *et al.*, 2004; CABAÑERO *et al.*, 2005, PINHEIRO *et al.*, 2005; CÁMARA *et al.*, 2005, MATSURA *et al.*, 2001).

Dentre todos os elementos nutricionalmente importantes, o ferro está entre os mais investigados. A diversidade e essencialidade das funções às quais o ferro se encontra relacionado tornaram esse micronutriente entre os mais estudados e melhor caracterizados quanto ao seu metabolismo. Atualmente, a anemia, causada pela deficiência de ferro, é um problema de saúde pública mundial (COZZOLINO, 2005). De acordo com a WHO/UNICEF (WHO/UNICEF, 1998), a deficiência de ferro é a mais grave deficiência elementar nutricional no mundo e é a principal causa de anemia entre as crianças, adolescentes e mulheres em idade fértil. O valor nutricional do ferro em humanos é dependente da sua fonte de dieta, porque diferentes alimentos podem conter diferentes formas químicas e isso determina sua biodisponibilidade. De uma forma geral, o Fe-heme é acentuadamente absorvido que as demais formas de Fe não-heme em que esse elemento pode ser encontrado (HARRINGTON *et al.*, 2001).

A absorção do Fe-heme é relativamente independente da composição da refeição e é pouco afetada por fatores facilitadores ou inibidores da alimentação. A absorção de Fe-heme também é menos influenciada pelo estado nutricional do indivíduo. Em relação à absorção do Fe não-heme, muitos fatores ligados ao indivíduo

e à dieta precisam ser considerados, como por exemplo, a secreção gástrica de ácido clorídrico, necessária para a solubilização dos sais de ferro e para a manutenção do ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}), que pode ser o primeiro fator causador de anemia em pacientes com acloridria, que possuem baixa capacidade de absorver o Fe não-heme (COZZOLINO, 2005).

3.1.6 – Métodos de avaliação da biodisponibilidade e especiação

Os métodos espectrofotométricos provavelmente estejam entre os pioneiros em diversas áreas da química analítica e também visando a especiação química. Nesse contexto, investigações buscando informações sobre a fração iônica solúvel de Fe(II) e Fe(III) ou biodisponível de ferro em diversos alimentos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos (CUBADDA, 2004). O desenvolvimento de novos equipamentos como ICP-MS e a possibilidade de acoplá-los a sistemas de separação como os sistemas cromatográficos têm permitido obter cada vez mais informações sobre a distribuição de espécies metálicas ligadas a proteínas. Compostos esses até então poucos conhecidos ou de comportamento pouco conhecido durante a etapa de processamento dos alimentos, por exemplo.

MATSURA *et al.* (2001) propuseram a determinação e a especiação multielementar em extratos de folhas de chá preto por ICP OES e ICP-MS acoplados a coluna cromatográfica de exclusão por tamanho. Com esse procedimento foi possível obter informações sobre a distribuição do peso molecular dos complexos metaloprotéicos extraídos das infusões dos chás. CÁMARA *et al.* (2005), determinaram por FAAS e GFAAS a concentração e a biodisponibilidade de Ca, Fe, Zn e Cu em diferentes tipos de refeições. A biodisponibilidade foi estimada medindo a fração mineral solúvel ou dialisável resultante da digestão gastrointestinal *in vitro* das refeições. WUILLOUD *et al.* (2004) desenvolveram experimentos visando a especiação de elementos essenciais e tóxicos ligados a fração protéica em diferentes cogumelos por coluna de exclusão por tamanho acopladas a detectores UV e ICP-MS. Nesse trabalho foi possível determinar a distribuição do peso molecular de vários complexos metaloprotéicos presentes nos cogumelos comestíveis estudados.

HARRINGTON *et al.* desenvolveram um método visando a determinação quantitativa de ferro ligado a mioglobina em diferentes alimentos por LC-HR-ICP-MS (HARRINGTON *et al.*, 2001; HARRINGTON *et al.*, 2004). Nesses trabalhos são descritos procedimentos de extração, separação e quantificação de Fe-mioglobina em alimentos crus e processados, sendo observado que a extração para alimentos processados foi, para quase todos os casos, inferior a 10 %. Quando a carne foi cozida, duas novas espécies de Fe-proteína foram encontradas, não sendo definido se esses Fe ligado a essas novas espécies eram ou não biodisponibilizados para o organismo na alimentação.

A biodisponibilidade de um elemento é dependente da forma química ou espécie à qual esse está ligado. Um outro importante parâmetro a ser considerado é a condição a que a(s) espécie(s) química(s) e(são) submetida(s). Muitas vezes antes do alimento ser consumido ele é submetido a condições extremas de processamento, como é o caso do cozimento que pode tornar a espécie química em uma forma não disponível ao organismo (DUMONT *et al.*, 2006).

PURCHAS *et al.* (2004) observou que a proporção de Fe-heme solúvel diminuiu de 65 % em carne crua para 22 % quando a carne é cozida a 60 °C e que quanto maior a temperatura de cozimento, maior é a redução na concentração de Fe-heme. No entanto, nesse trabalho não foram realizados estudos para avaliação da biodisponibilidade das espécies.

3.2 - OBJETIVOS

Estudar a biodisponibilidade de Fe ligado a proteínas em diferentes alimentos, crus e processados.

Avaliar possíveis mudanças químicas das espécies após o cozimento dos alimentos.

Determinar o teor total dos analitos por ICP-MS e a especiação empregando SEC acoplada a detectores UV e ICP-MS.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida na Universidade de Aberdeen, Escócia, nos laboratórios coordenados pelo professor Dr. Jörg Feldman tendo o mesmo colaborado intensamente para o desenvolvimento do trabalho. A colaboração da Dra Andrea Raab também foi fundamental para a realização do trabalho.

3.3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 - Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Os padrões de proteínas usados para identificar o peso molecular das proteínas foram preparados a partir de cianocobalamina (1,35 kDa), citocromo (13 kDa), mioglobina (17 kDa), Cu,Zn-superóxido dismutase (31 kDa), albumina (69 kDa) e creatinina (113 kDa), adquiridas da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Tris(hidroximetil)aminometano (Lancaster), cloreto de sódio e ácido clorídrico (ambos adquiridos da Fisher Scientific), ácido nítrico (65 % m/v, Aristar[®]) e peróxido de hidrogênio (30 % m/m, Fluka) também foram usados. Solução estoque individual contendo 1.000 mg L⁻¹ de Fe (Spex Samplepre, Metuchen, EUA) foram usada para preparo das soluções de referência.

3.3.2 – Amostras

Amostras de carne, alga marinha (NORI), cereal tipo CHOCO Flakers, refrigerante IRN-BRU e dieta suplementar tipo SOLOTRON[®] foram adquiridas no mercado local de Aberdeen, Escócia.

A amostra de carne foi dividida em duas porções, sendo que uma parte foi analisada na forma crua e outra parte foi cozida seguindo as recomendações contidas no livro para cozimento de carne (MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION, 1997). Uma chapa quente foi pré-aquecida até aproximadamente 180 °C, e em seguida a carne em forma de carne foi frita por 30 min, de forma “bem passada”. A temperatura

interna da carne durante o cozimento manteve-se em aproximadamente 80°C. Ambas as porções da carne, crua e cozida, foram refrigerada até as determinações realizadas em no máximo 24 h..

Amostra de alga marinha seca também foi dividida em duas porções, sendo que 9 g de alga foi cozida em 150 mL de água a aproximadamente 100 °C durante 20 min. Após o cozimento, a água foi dispensada e a amostra pesada novamente e então congelada até ser analisada.

As amostras de refrigerante, dieta suplementar e cereal que são consumidas da forma em que são adquiridas, não foram submetidas a processos de cozimento, sendo submetidas apenas aos processos de extração antes de serem analisadas.

Uma amostra de músculo de peixe, material de referência certificado, Dogfish (DORM-2, National Research Council, Canadá) foi usada para avaliar a exatidão do método empregado na determinação total.

3.3.3 – Instrumentação

A homogeneização das amostras foi realizada empregando um homogeneizador tipo Ultra-Turbax T8 (IKA[®], WERKE), sendo esse instrumento foi limpo com detergente neutro e, em seguida, com a solução extratora Tris para evitar possíveis contaminação das amostras com o equipamento.

Na centrifugação foi empregada uma micro centrífuga de alta velocidade (CE 39 MSE Micro, SANYO).

Na digestão total das amostras foi empregado um sistema de microondas com cavidade MARS 5, (CEM, EUA) equipado com sensor de temperatura e pressão.

Nas determinações dos teores totais dos analitos nos diferentes extratos foi empregado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (Spectromass 2000, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha), equipado com câmara ciclônica resfriada à água e nebulizador tipo Meinhard. As condições de operação do equipamento estão descritas na **Tabela 3.1**.

Na separação das espécies foi utilizado um sistema de HPLC comercial (Agilent 1100) equipado com coluna de exclusão por tamanho, Tricorn Superdex, SEC

7510/300GL (SIZE, Pharmacia EUA). A determinação das espécies foi realizada empregando um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente ICP-MS, Agilent 7500c, (Agilent, EUA).

Na extração das espécies foi utilizado um agitador magnético com uma chapa quente sobre o qual foi colocado um béquer com água, sendo o sistema de aquecimento regulado até a temperatura da água atingir $37 \pm 1,0$ °C. Então os tubos com as amostras eram colocados em contato com a água em agitação constante até o final da extração. A temperatura era monitorada a cada 5 min para oscilações maiores que 1,0 °C.

3.3.4 - Extração das espécies elementares

Para os procedimentos de extração, 0,5 g de alga cozida, carne crua e carne cozida, 0,5 mL de refrigerante ou 0,1 g de alga crua, dieta suplementar ou cereal foram homogeneizadas (com homogeneizador que também funcionava como triturador) por 5 min a 4 °C com 5 ml de tampão Tris $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, pH 7,3, e completados o volume para 10 mL. A temperatura foi mantida a 4 °C para evitar possíveis alterações na estrutura das proteínas. Os extratos foram centrifugados a 13000 rpm e o sobrenadante recolhido e refrigerado por no máximo 24 h até as determinações. A centrifugação a alta velocidade permite a separação da gordura dos demais componentes da mistura.

As soluções de fluido gástrico simulado foram preparadas de acordo com a Farmacopéia americana, USP, 2001 (ROCKVILLE, 2001): 2,0 g de cloreto de sódio e 3,2 g de pepsina foram dissolvidos em água, adicionados 7 mL de ácido clorídrico concentrado e o volume completado para 1000 mL com água.

As digestões *in-vitro* com fluido gástrico simulado foram realizadas de acordo com procedimento descritos por MILLER *et al.*,1981: às amostras (0,5 g de alga cozida, carne crua ou cozido ou 0,1 g de alga crua) foram adicionadas 150 µL de solução de pepsina preparada recentemente, completado o volume para 5 mL com água e incubadas por 2 h a $37 \pm 1,0$ °C. Então, 0,1 mL de solução de EDTA $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram adicionados e o volume completado para 10 mL com solução tampão

Tris pH 7,3, para que o pH da solução fosse mantido. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 13000 rpm e o sobrenadante recolhido e estocado sob refrigeração até as determinações.

3.3.5 - Determinação da concentração total dos analitos

A 100 mg das amostras e do material de referência certificado (DORM-2, dogfish muscle), foram adicionados 2 mL de ácido nítrico e 1 mL de peróxido de hidrogênio. Essa mistura foi deixada por 24 h à temperatura ambiente e, em seguida submetida a digestão em forno de microondas (MARS 5) de acordo com programa de aquecimento desenvolvido nas quatro etapas descritas a seguir: 1) 300 W durante 10 min à 50 °C; 2) 600 W durante 10 min a 75 °C; 3) 600 W durante 60 min a 95 °C; 4) 0 W durante 40 min com temperatura programada para 25 °C, a potência fornecida pelo equipamento é de 630 W - esse procedimento é utilizado na rotina do laboratório onde os experimentos foram realizados. Ao final das digestões, as amostras foram diluídas para 20 mL com água e guardadas refrigeradas até as determinações. Diluições posteriores foram efetuadas para adequar a concentração das soluções à faixa de calibração do instrumento. Soluções de referência foram preparadas a partir de solução estoque 1000 mg L⁻¹. Os analitos nas concentrações 0,5; 1,0; 5,0; 20,0; 50,0; e 100,0 µg L⁻¹ Fe foram adicionados aos extratos das digestões da amostra assistida por radiação microondas aos extratos com tampão Tris e fluido gástrico simulado para que fossem preparadas as soluções de referências para obtenção da curva de calibração.

As determinações das concentrações totais dos analitos presentes nos extratos das amostras digeridas por aquecimento com radiação microondas e também nos extratos das amostras submetidas a procedimento de extração e digestão com fluido gástrico simulado foram realizadas por ICP-MS (Spectromass 2000) equipado com uma câmara de nebulização do tipo ciclônica e um nebulizador do tipo concêntrico Meinhard. As condições de operação do ICP-MS estão descritas na **Tabela 3.1**. O método das adições de analito foi utilizado para a calibração. As medidas foram realizadas pelo menos em triplicatas. A sensibilidade do ICP-MS foi checada diariamente, usando procedimentos padrão e otimizados e, sempre que necessário,

com o emprego de solução de As e In na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação da sensibilidade.

TABELA 3.1 - Parâmetros do ICP-MS Spectromass 2000 empregados para a determinação total de analitos.

Parâmetros do ICP-MS	
Potência (W)	1350
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1});	0,85
Vazão do gás de nebulização (L min^{-1})	0,95
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Meinhard
Parâmetros MS	
Isótopos monitorados (m/z)	^{57}Fe

3.3.6 - Especificação das metaloproteínas

Na separação das metaloproteínas foi empregada uma coluna de exclusão por tamanho, Superdex 75 SEC-column. A distribuição do peso molecular das espécies foi estimada usando padrões de proteínas de peso molecular conhecido que variou de 1,4 a 113 kDa. Sistema de HPLC comercial (Agilent 1100) com uma alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ foi usado. As separações foram realizadas usando como fase móvel uma solução tampão Tris $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3 a uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Um detector ultravioleta foi usado para avaliar o perfil das proteínas. As medidas das absorvâncias foram realizadas a 280 nm .

A saída do detector UV foi conectada diretamente ao nebulizador do ICP-MS (Agilent 7500c). A sensibilidade do ICP-MS foi checada diariamente, usando procedimentos padrão e otimizados e, sempre que necessário, com o emprego de solução de As e In na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação da sensibilidade. As condições de operação do equipamento e do sistema cromatográfico estão descritas na **Tabela 3.2**. Uma solução de ródio $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi usada para avaliar possíveis mudanças na ionização das espécies causadas por interferência de matriz. Essa solução

foi adicionada ao eluente da coluna via confluência do tipo T-pieces conectada antes do nebulizador. A **Figura 3.1** mostra o esquema completo do sistema SEC-UV-ICP-MS montado nas condições em que foram realizadas as determinações.

Todas as amostras foram injetadas ao menos três vezes para determinar o tempo de retenção e a área de pico. A altura de pico foi usada para quantificar o complexo Fe-mioglobina eluído da coluna. Adições de mioglobina aos extratos foram realizadas para quantificar a concentração da espécie Fe-mioglobina. A estabilidade da espécie Fe-mioglobina durante os procedimentos de extração foi testada submetendo-se o padrão de mioglobina ao procedimento de extração a que foram submetidas as amostras.

TABELA 3.2 - Parâmetros instrumentais dos detectores UV e ICP-MS (Agilent 7500c) e do sistema HPLC com SEC.

ICP-MS	
Potência (W)	1350
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹);	0,95
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,80
Parâmetros MS	
Nebulizador	Meinhard
Isótopos monitorados (m/z)	⁵⁷ Fe
HPLC (Agilent 1100)	
Coluna	Superdex 75 SEC-column
Faixa de calibração (kDa)	1,35-113
Fase móvel	Tampão Tris-HCl 5,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ , pH 7,3
Vazão do gás de nebulização (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (μL)	100
Comprimento de onda do UV (nm)	280 nm

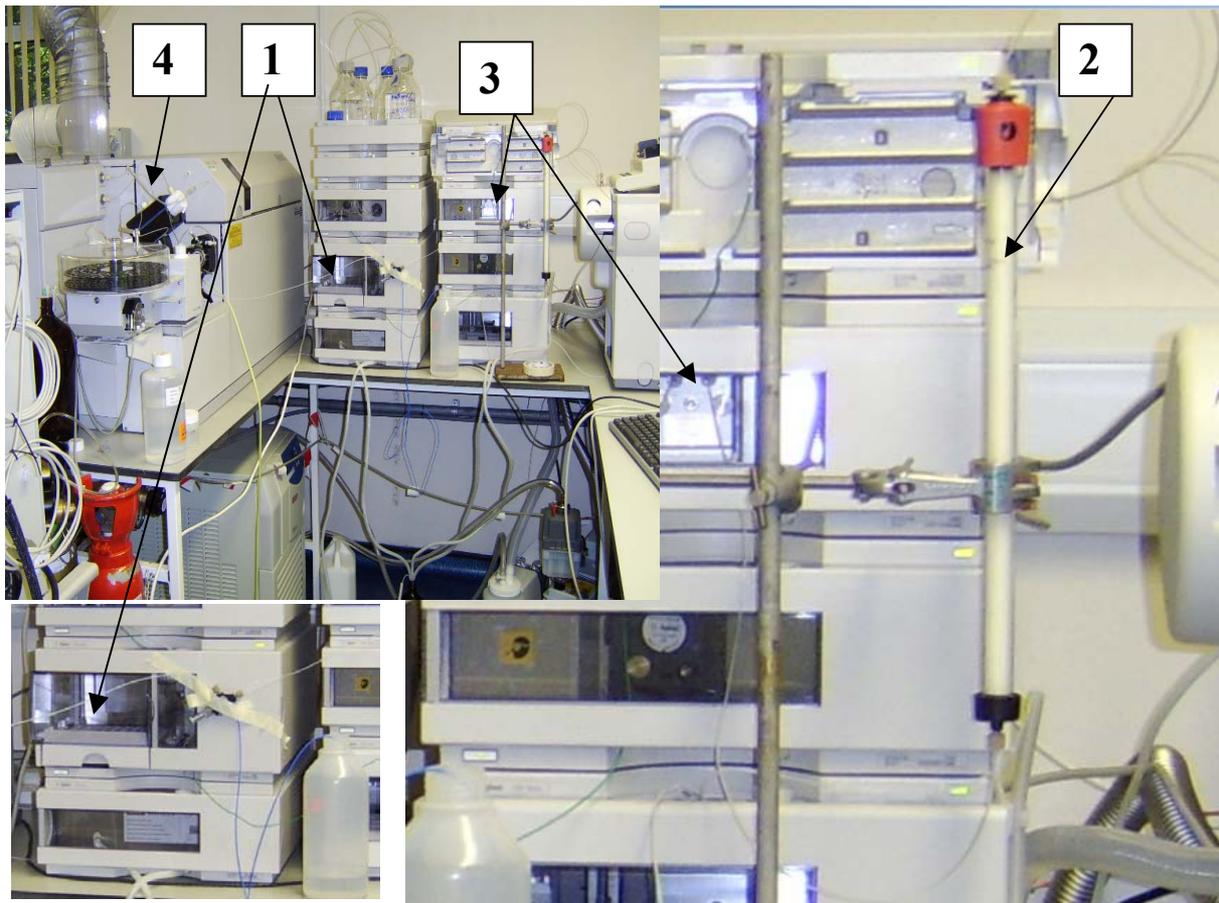


FIGURA 3.1 - Sistema SEC-UV-ICP-MS montado nas condições em que foram realizadas as determinações: 1) autoamostrador; 2) coluna de exclusão por tamanho; 3) detector ultravioleta e; 4) ICP-MS.

3.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 – Procedimento de extração

Durante todo o procedimento de extração das proteínas a temperatura foi mantida a aproximadamente 4 °C para evitar possíveis mudanças na estruturais que eventualmente pudessem ocorrer caso as amostras fossem manipuladas à temperatura ambiente.

A centrifugação dos extratos à baixa temperatura e a alta velocidade (13000 rpm) permitiu a separação da mistura em 3 fases: a) gordura fase sólida depositada as parte superior ao sobrenadante; b) fase líquida que provavelmente continha a maioria das proteínas e fase essa isolada para as determinações e; c) sólido depositado no fundo do frasco de centrifugação.

A separação da gordura, ainda durante a centrifugação, simplificou o procedimento de extração, uma vez que dispensou a necessidade de digestões enzimáticas posteriores como descritas em trabalho realizados por DUMONT *et al.*, (2006), ou procedimento de extração de gordura como o realizado por ALMELA *et al.*, (2005).

3.4.2 – Concentração total dos elementos nas amostras analisadas

Na **Tabela 3.3** são apresentadas as concentrações totais de Fe determinadas em diferentes alimentos. A seleção desses elementos se deu em função de sua importância nos alimentos, seja como essenciais, seja como potencialmente tóxicos. Além desses, fatores como a disponibilidade de solução de referência, disponibilidade de equipamento com possibilidade de determinações multielementares e sensibilidade para detectá-los nas respectivas amostras analisadas também foram considerados antes das análises.

As amostras de carne e alga foram pesadas antes e depois de cozidas para que fossem avaliadas as variações na concentração dos analitos durante o processo de cozimento. As demais amostras, refrigerante, suplemento alimentar e cereal foram simplesmente pesadas e digeridas na mistura oxidante de ácido nítrico/peróxido à

temperatura ambiente por 24 h e depois submetida ao aquecimento assistido por radiação microondas. Depois de 24 h de contato das amostras com a mistura oxidante (ácido nítrico/peróxido) as amostras apresentavam-se totalmente dissolvidas na solução, mas com coloração amarelada, indicando que parte da matéria orgânica ainda se encontrava em solução. Após a mistura ser submetida a digestão com aquecimento assistido por radiação microondas, as amostras apresentavam-se totalmente límpidas com características de amostras totalmente digeridas. Certamente esse procedimento não é o mais indicado para digestão assistido por radiação microondas, pois há na literatura vários procedimentos de digestão cujo tempo total de digestão é inferior a 30 min. No entanto, vale salientar que esse procedimento já era estabelecido como rotina no laboratório onde o trabalho foi desenvolvido.

Para corrigir possíveis interferências causadas pela presença de matriz da amostra nas análises por ICP-MS, as análises foram realizadas aplicando-se o método de adições de analito. Os valores de concentração dos analitos determinados nas amostras estudadas estavam em concordância com os valores certificado no material de referência, o que indica que a alternativa usada solucionou potenciais interferências.

As amostras de suplemento alimentar, refrigerante, cereal e alga tinham os valores de concentração para alguns analitos, principalmente ferro, informados no rótulo. Os valores determinados estão quase sempre relativamente próximos aos valores informados pelo fabricante (**Tabela 3.3**).

A concentração de Fe determinada na amostra de carne crua (426 g) foi de $40,1 \pm 1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ (**Tabela 3.3**), e na amostra de carne cozida (260 g) a concentração de Fe determinada foi de $51,4 \pm 2,4 \text{ mg kg}^{-1}$. Após o processo de cozimento, a amostra de carne perdeu 39,1 % da massa original (provavelmente água ou gordura) e a concentração total de Fe aumentou apenas em 20,4 % quando comparado à carne crua, indicando que a perda de Fe durante o processo de cozimento foi de 18,7 %.

Para as amostras de alga marinha, a amostra crua quando em contato com a água, absorveu água equivalente a ~5 vezes o valor da massa inicial, sendo que 9,24 g de amostra foram submetidas ao procedimento de cozimento e ao final do processo a massa da amostra após o descarte da água sobrenadante a massa da amostra remanescente foi de 49,50 g. Na amostra de alga crua a concentração de Fe foi de $285,21 \pm 4,18 \text{ mg kg}^{-1}$ (**Tabela 3.3**), já na amostra cozida a concentração de Fe

encontrada foi de $28,70 \pm 1,09 \text{ mg kg}^{-1}$. Após o cozimento a massa da amostra aumentou em 5,4 vezes em relação à massa inicial enquanto a concentração de ferro diminuiu em 9,9 vezes, ou seja, aproximadamente 50 % do Fe total da amostra foi perdido durante o cozimento. A liberação do ferro provavelmente foi causada pela extração dos compostos Fe-proteínas durante o cozimento em água fervendo na forma de uma cocção. A mesma tendência de diminuição da concentração durante o cozimento foi observada para os demais elementos (**Tabela 3.3**).

TABELA 3.3 - Concentração total de Fe nas amostras de alimentos. Determinações realizadas por ICP-MS nas condições de operação descritas na TABELA 3.1.

Amostra	Fe(mg/kg)	Fe (mg/kg)
DORM-2	*143 ± 10	132,1 ± 2,6
Carne crua	-	40,14 ± 1,68
Carne cozida	-	51,40 ± 2,37
Alga crua	**200	285,2 ± 4,2
Alga cozida	-	28,7 ± 1,1
Suplemento alimentar	**13846	14925 ± 367
Cereal	**79	76,2 ± 3,2
Refrigerante	**4,2	5,0 ± 0,2
Padrão de mioglobina	**2500 - 3200	3146 ± 151

*Valor certificado, **valor informado pelo fabricante

3.4.3 – Determinação da concentração total dos analitos nos extratos empregando tampão Tris e digeridos com fluido gástrico simulado

Os extratos resultantes da extração com tampão Tris e da digestão com fluido gástrico simulado, utilizados nas análises de especiação também foram submetidas a análises para a determinação do teor total dos analitos presentes nesses extratos. As determinações totais também foram realizadas aplicando-se o método das adições de analito, uma vez que os extratores usados (tampão Tris e fluido gástrico simulado) tornavam a solução relativamente complexa, podendo causar interferências de matriz. Os resultados são apresentados na **Tabela 3.4**. Os percentuais de recuperação, também mostrados na **Tabela 3.4** são comparados aos teores totais dos analitos presentes nas amostras e descritos na **Tabela 3.3**.

Comparativamente ao teor total de Fe contido nas amostras, a eficiência de extração do Fe na carne crua com tampão Tris foi de 69 %. Essa recuperação é menos eficiente que a recuperação de 100 % mencionada por HARRINGTON *et al.* (2001 e 2004), que utilizaram tampão fosfato com adição de cianeto de potássio como complexante. No entanto, para a carne e para a alga cozidas, a recuperação foi de aproximadamente 30 %. Nesse caso, a eficiência de extração foi relativamente superior às descritas por HARRINGTON *et al.* (2004), que conseguiram recuperações inferiores a 10 % para as amostras de alimentos processados, incluindo diferentes tipos de carnes. O tampão Tris foi utilizado pois já era estudado e aplicado eficientemente na extração de proteínas no laboratório onde o trabalho foi desenvolvido. Além disso, é uma alternativa à utilização do cianeto de potássio, que apresenta elevado grau de periculosidade aos usuários quando não utilizado de forma adequada.

Nas amostras de alga crua e cozida, as recuperações de Fe foram de 26,8 % e 17,5 % respectivamente. Essas recuperações foram menos eficientes que as extrações com NaOH e HCl realizadas por WUILLOUD *et al.*, (2004) em estudos realizados com amostras de cogumelos. No entanto, foram superiores às obtidas quando água foi empregada como extrator, conforme resultados apresentados pelos mesmos autores.

Nos extratos de digestão com fluido gástrico simulado foi utilizada a enzima digestiva pepsina, o que implica numa maior disponibilização dos analitos para a solução. No caso das amostras analisadas, as recuperações foram sempre superiores às extrações realizadas empregando tampão Tris, o que está de acordo com o esperado, uma vez que com o fluido gástrico simulado o que se tem é uma digestão protéica e não simplesmente uma extração.

Os percentuais de recuperação do Fe em relação ao Fe total nas amostras de carne crua, carne cozida, alga crua e alga cozida foram 97,8; 97,0; 47,6 e 22,8 %, respectivamente (**Tabela 3.4**). A eficiência de disponibilização do Fe para a solução pela digestão com fluido gástrico simulado ocorre principalmente em função da forma de Fe nesse tipo de amostra, que se encontra majoritariamente ligado a mioglobina, que é digerida pelo fluido gástrico.

No caso da carne cozida, a disponibilização do Fe para a solução já é um indício de sua biodisponibilidade na amostra. Isso é importante para solucionar dúvidas quanto à indisponibilidade de algumas espécies durante o processo de cozimento (HARRINGTON *et al.*, 2004).

Para as amostras de cereal, refrigerante e suplemento alimentar, a eficiência de extração com tampão Tris foi de aproximadamente 61 %. Nessas amostras, o Fe é adicionado na forma inorgânica, o que implica que pode ser solubilizado sem a necessidade de uma digestão com fluido gástrico, sendo a solubilização dependente apenas do pH do meio. Enquanto o Fe^{2+} é extremamente solúvel em pH próximo da neutralidade, como é o caso do tampão Tris $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3, o Fe^{3+} é praticamente insolúvel nesse pH. No entanto, valores elevados de espécies solúveis de ferro Fe^{3+} podem ser obtidos com a adição à solução de um complexante forte, como por exemplo o EDTA (CRICHTON, 2001). Nesse caso, quando as extrações são realizadas com tampão Tris $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3, ou quando a amostra é submetida a digestão com fluido gástrico e em seguida o pH é corrigido para 7,3 com solução tampão Tris pH 7,3, o Fe^{3+} pode permanecer insolúvel e não ser disponibilizado para a solução. Isso explicaria a baixa eficiência de extração no caso das amostras de cereal e suplemento alimentar descritas acima. Para solucionar o problema, a extração dos analitos das amostras de cereal e suplemento alimentar foi realizada em meio de

solução EDTA 5 mol L⁻³. Com esse procedimento, a eficiência de extração foi superior a 96 % (**Tabela 3.4**).

Os desvios padrão relativos foram menores que 5 % para as extrações realizadas com tampão Tris e quase sempre superiores a 5 % quando as amostras foram submetidas à extração com fluido gástrico simulado. Nesse caso há mais etapas de manipulação das amostras, o que pode ter causado a maior imprecisão das medidas.

TABELA 3.4 - Concentração total de Fe nas soluções resultantes da extração com tampão Tris 5,0x10⁻³ mol L⁻¹, pH 7,3 e da digestão com fluido gástrico simulado.

Amostra	Fe (mg/kg)	Recuperação (%) [*]
Carne crua, extração com tampão	27,7±1,5	69
Carne cozida, extração com tampão	15,5±1,1	31
Alga crua, extração com tampão	75,8±6,6	27
Alga cozida, extração com tampão	5,1±0,5	18
Carne crua, digestão gástrica	38,0±3,9	98
Carne cozida, digestão gástrica	49,8±3,5	97
Alga crua, digestão gástrica	142,2±0,7	48
Alga cozida, digestão gástrica	6,5±0,8	23
Cereal, extração com tampão	10,9 ± 0,7	14
Cereal, digestão gástrica	73,1±0,4	96
Suplemento alimentar, extração com tampão	3029±95	20
Suplemento alimentar, digestão gástrica	13887±425	93
Refrigerante, extração com tampão	0,6 ± 0,1	12
Refrigerante, digestão gástrica	4,9±0,2	98

^{*}, Percentual dos analitos extraídos quando comparados ao teor total presente nas amostras e apresentados na **Tabela 3.3**. nd, não determinado.

3.4.4 – Especificação das metaloproteínas por SEC-UV-ICP-MS

Nas análises de especificação de metaloproteínas os detectores UV e ICP-MS foram seqüencialmente acoplados para que fossem realizadas medidas das espécies provenientes da coluna de separação por exclusão por tamanho. As medidas de absorvância foram feitas no comprimento de onda 280 nm para que fossem detectadas as diferentes proteínas provenientes da coluna. WUILLOUD *et al.*, (2004) usando uma coluna similar (Superdex 75), avaliaram três diferentes tipos de fase móvel: tampão Tris, pH 8,0, tampão fosfato pH 7,5 e tampão ácido 3-ciclohexaamino-1-propanosulfônico (CAPS), pH 10 e concluíram que quando usaram o tampão Tris como fase móvel obtiveram a melhor resolução no menor tempo.

No presente trabalho, boas separações foram obtidas quando a fase móvel utilizada foi o tampão Tris na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O mesmo tampão, mas na concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, chegou a ser testado, mas as replicatas de injeção de uma mesma amostra não apresentavam boa repetibilidade dos tempos de retenção.

Os perfis do cromatograma das proteínas resultantes da injeção dos extratos de uma amostra de carne crua e da injeção de uma amostra de carne cozida, ambos em meio de tampão Tris na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, são mostrados na **Figura 3.2**. É possível se constatar significativas diferenças entre os dois perfis, indicando que o processo de cozimento causa mudanças nas proteínas. A proteína pode não estar sendo destruída durante o cozimento, mas a desnaturação pode alterar a estrutura tridimensional da proteína e essa passaria a ser eluída em um tempo diferente daquele se a proteína permanece com a estrutura original. Uma outra consequência da desnaturação pode ser a liberação dos metais que se encontram ligados por interação química à proteína, que em alguns casos são os responsáveis pela estrutura tridimensional da mesma.

Como já discutido no item 3.4.1, o cozimento da amostra de carne provocou uma perda de aproximadamente 39 % da massa original, provavelmente na forma de água ou gordura. Na **Figura 3.2** é possível observar que um grupo de proteínas de peso molecular estimado em 86,6 kDa e outro estimado em 17,1 kDa (provavelmente

mioglobina), diminuíram a intensidade de absorbância quando comparado à carne cozida. Isso pode ser em função da desnaturação da proteína devido ao calor no processo de cozimento.

Já para um grupo de proteínas de peso molecular estimado em 2,8 kDa, houve aumento significativo na intensidade de absorbância, que pode ser devido a esse grupo de proteína não sofrer alterações em suas estruturas devido ao aquecimento durante o cozimento ou, resultar da degradação de proteínas de pesos moleculares maiores. Nesse caso, como houve perda de massa, esse grupo de proteína aumentou a concentração na massa resultante do cozimento.

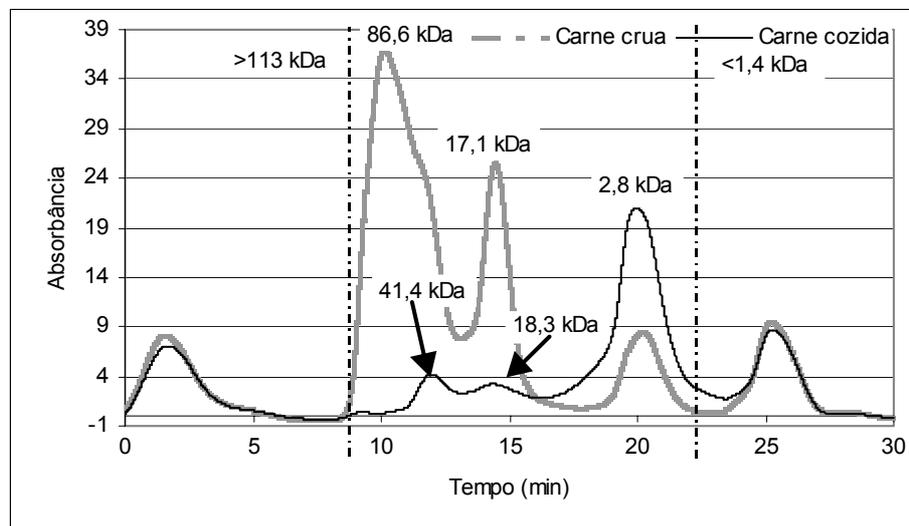


FIGURA 3.2. Cromatográfico das proteínas resultantes da injeção dos extratos de uma amostra de carne crua e da injeção de uma amostra de carne cozida, ambos em meio de tampão Tris $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Sinal monitorado em 280 nm.

3.4.5 – Calibração (ou estimativa) da distribuição do peso molecular das espécies na coluna de exclusão por tamanho

A coluna de exclusão por tamanho foi calibrada utilizando-se os seguintes padrões de proteínas de peso molecular conhecido: cianocobalamina (1,35 kDa), citocromo (13 kDa), mioglobina (17 kDa), Cu-Zn-Superoxido dismutase (31 kDa),

albumina (69 kDa) e creatinina (113 kDa). A calibração da coluna ajuda estimar a massa molecular dos compostos presentes na amostra e auxilia na identificação de complexos de metaloproteínas desconhecidos, para os quais padrões não estão disponíveis (HARRINGTON, 2001). A curva de calibração mostrada na **Figura 3.3** apresenta uma correlação linear entre o tempo de eluição e o log do peso molecular dos padrões injetados na coluna. A ferritina, padrão de peso molecular de 440 kDa, também foi injetada na coluna, mas no entanto eluiu junto com o volume morto da coluna. Padrões de pesos moleculares inferiores a 1,4 kDa não foram injetados.

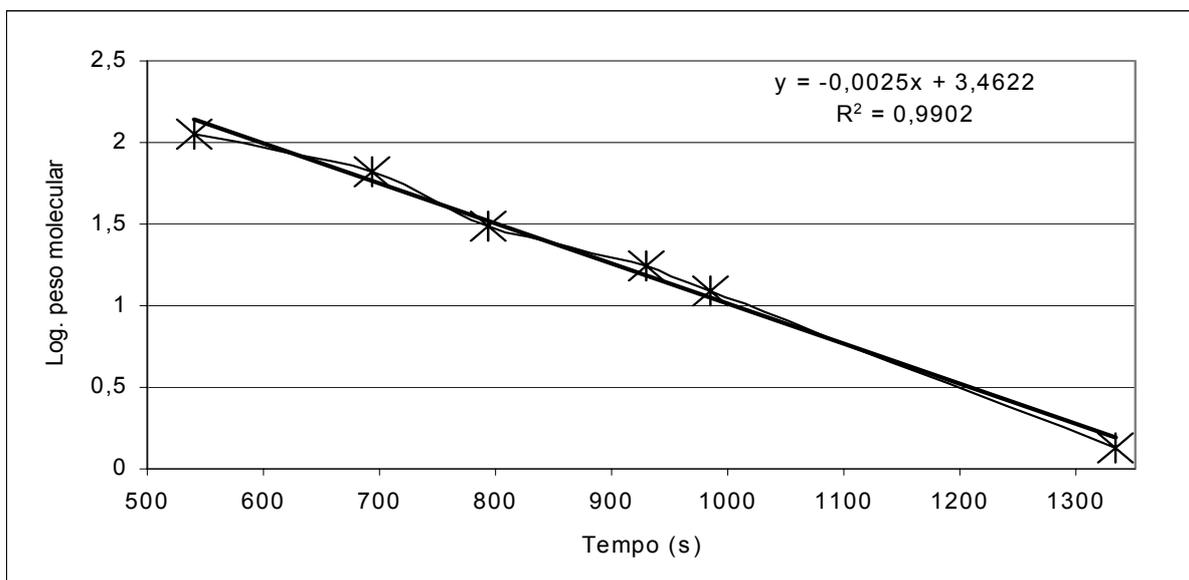


FIGURA 3.3 - Curva de calibração da coluna de exclusão por tamanho (SEC).

3.4.6 – Estudo de avaliação da estabilidade da mioglobina

A mioglobina é uma importante fonte de Fe-heme em alimentos como a carne e, durante a manipulação dos alimentos esse composto pode sofrer alterações na estrutura original. Parâmetros como a temperatura do ambiente pode influenciar na estabilidade do composto durante procedimentos de extração em laboratório. Para avaliar a estabilidade da mioglobina durante a extração, uma solução do padrão de mioglobina 740 mg L^{-1} foi submetida às mesmas condições de extração a que foram submetidas as amostras analisadas e depois resfriada até a análise. Uma outra solução do padrão na mesma concentração foi preparada e injetada imediatamente na coluna cromatográfica. A **Figura 3.4** mostra que nem a concentração de Fe-mioglobina nem a estrutura da proteína foram alteradas nas condições em que a proteína foi manipulada.

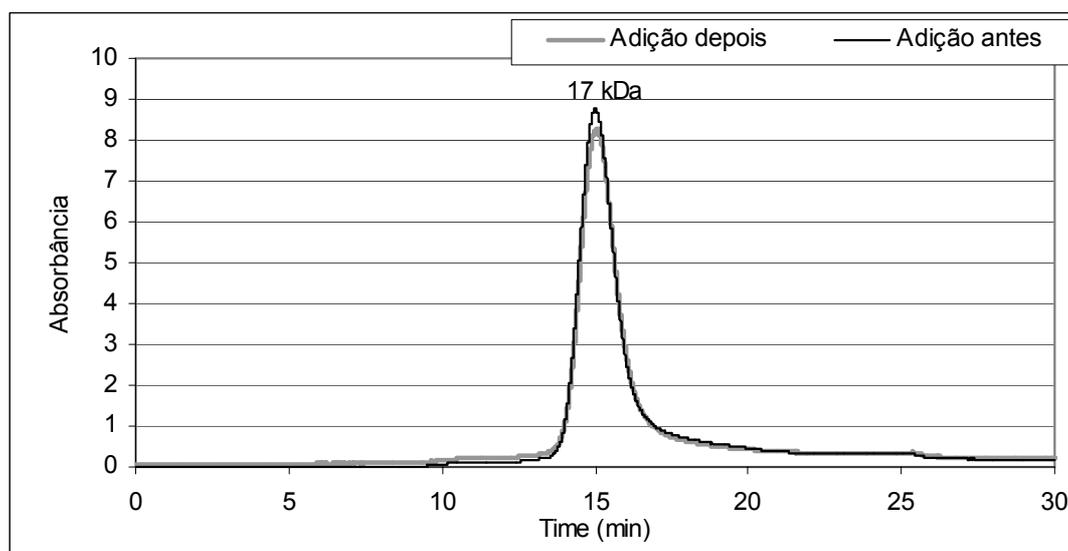


FIGURA 3.4.- Perfil do cromatograma obtido de uma solução de mioglobina submetida às condições de extração e de uma solução de mioglobina preparada imediatamente antes de ser injetada na coluna. Soluções preparadas com $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ tampão tris pH 7.3.

3.4.7 – Estudo de quantificação da mioglobina

Teoricamente em sistema de separação empregando coluna de exclusão por tamanho não há interações químicas entre a fase móvel e a fase estacionária da coluna. Como a mioglobina é a principal fonte de Fe-heme nos alimentos de origem animal, soluções com concentrações diferentes de mioglobina foram adicionadas ao extrato de carne e injetadas na coluna para que fosse construída uma curva de calibração e a mioglobina pudesse ser quantificada. A **Figura 3.5 a** mostra o perfil do cromatograma para injeção na coluna de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 0,74 g L⁻¹ de padrão de Fe-mioglobina adicionados ao extrato de carne cozida em meio de tampão Tris $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e a **Figura 3.5 b** mostra a curva de calibração construída a partir dos dados obtidos. A curva de calibração foi construída a partir da correlação entre a altura do pico da intensidade do Fe m/z 57 e da concentração de Fe-mioglobina adicionadas ao extrato da carne. Coeficiente de correlação de 0,994 foi obtido.

Considerando a calibração curva de calibração mostrada na Figura 3.5, foi possível estimar que aproximadamente 70 % do Fe-mioglobina foi perdido durante o processo de cozimento da carne. Esse valor foi obtido a partir da comparação das alturas dos picos dos extratos de carne crua e processada injetados no cromatógrafo (**Figura 3.6**). É preciso salientar que mudanças na estrutura da mioglobina provocadas por fatores como a temperatura podem provocar alterações no tempo de eluição e levar a conclusões errôneas sobre a concentração desse composto.

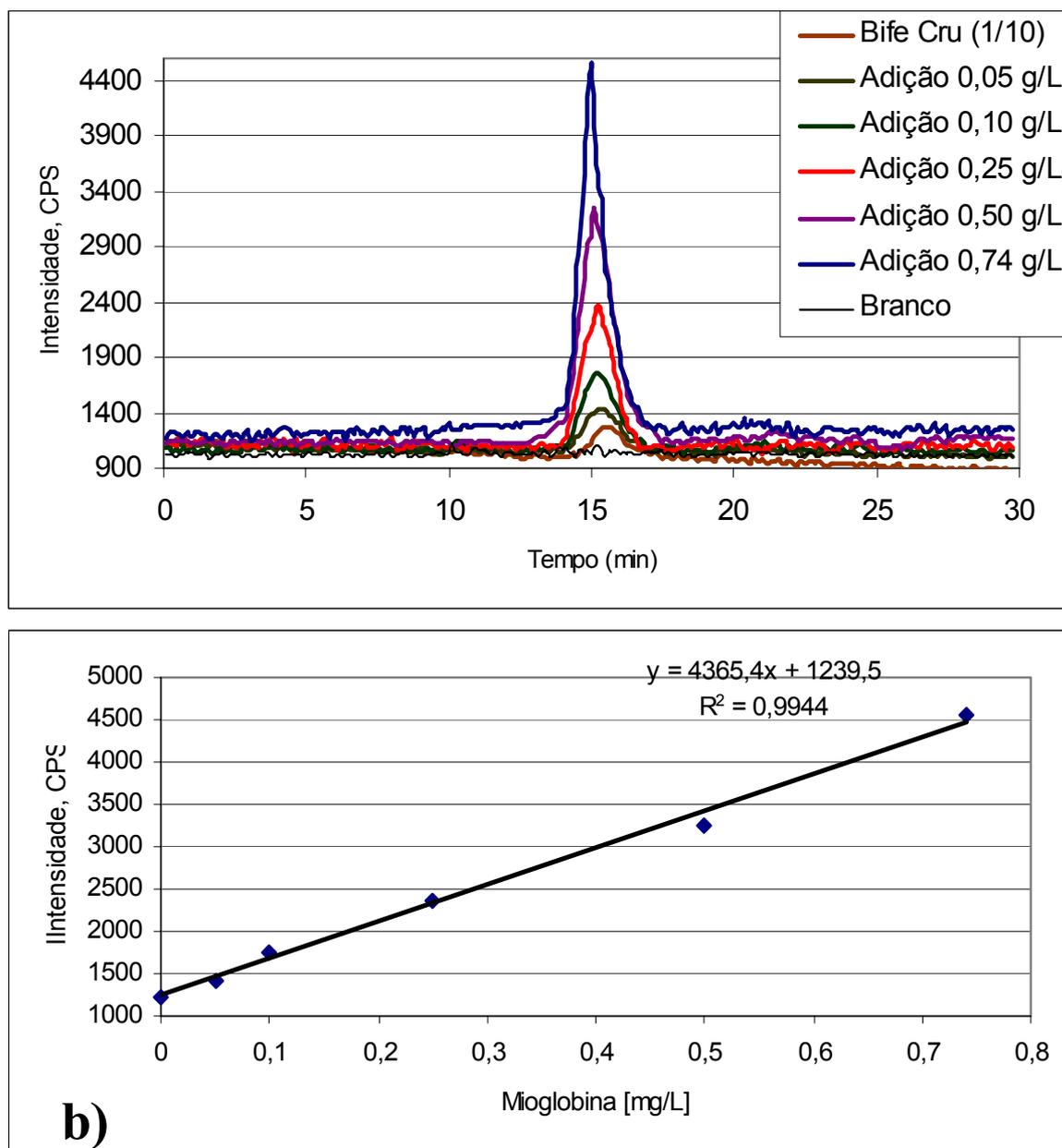


FIGURA 3.5 - Perfil do Cromatograma com injeção do extrato de carne crua e adição de 0,05; 0,01; 0,25; 0,50 e 0,74 g L⁻¹ de mioglobina; com 50×10^{-3} mol L⁻¹ tampão Tris pH 7,3. a) Cromatograma; b) Curva de calibração.

3.4.7 – Avaliação dos efeitos do cozimento sobre as metaloproteínas

Fe-proteína em carne crua e em carne cozida

Em trabalhos desenvolvidos por HARRINGTON *et al.*, (2001 e 2004) foi possível a quantificação de Fe-heme em carne crua usando uma coluna de exclusão por tamanho acoplada ao ICP-MS. Nesses mesmos trabalhos foi possível verificar que o Fe se encontra na carne crua totalmente ligado à mioglobina (17 kDa), sendo que após o cozimento da carne dois novos compostos (8,3 kDa e 4,8 kDa), além da mioglobina, são detectados, sendo que os dois novos compostos aumentam em concentração com o aumento da temperatura de cozimento. Nos trabalhos realizados por HARRINGTON *et al.*, (2001 e 2004), não foi possível quantificar a Fe-proteína eluído da coluna a partir dos alimentos processados. Três possíveis causas foram apontadas: 1) o ferro no extrato poderia estar na forma inorgânica e não poderia ser determinado pelo método desenvolvido; 2) o cozimento pode ter alterado a mioglobina, tornando-a menos acessível ao tampão extrator; 3) a Fe-proteína pode ter sido alterada pelo processo de cozimento de forma que não seja eluída nas condições do sistema cromatográfico usado.

Uma outra questão interessante a ser levantada, além das já discutidas anteriormente é: se há alterações tão significantes da Fe-proteína durante o cozimento, essa ainda se encontra biodisponível ao organismo nos alimentos submetidos ao cozimento?

Neste trabalho, para avaliar o efeito do cozimento na solubilidade e na biodisponibilidade de Fe nos alimentos, amostras de alimentos crus e processados foram submetidas à extração dos minerais com solução tampão e com fluido gástrico simulado. Após a digestão com o fluido gástrico (pH ~2), o pH dos extratos foi ajustado para 7,3 para evitar que a diferença no pH dos extratos pudesse influenciar no sistema cromatográfico de separação. A **Figura 3.6** mostra o perfil cromatográfico obtido com a introdução dos extratos de carne crua e cozida em meio de tampão Tris e em meio de fluido gástrico simulado. Os seguintes aspectos são considerados mais relevantes: (a) A concentração de Fe-proteína (provavelmente mioglobina), diminuiu

na carne cozida quando comparado à carne crua e essa diferença não pode ser atribuída à diferença de massa, uma vez que foram feitas as devidas correções; (b) um novo composto de Fe-proteína de peso molecular de 4,5 kDa apareceu no cromatograma do extrato de carne cozida e nesse caso há uma diferença em relação às observações de HARRINGTON *et al.*, (2001), que obtiveram dois novos compostos na carne cozida. Essa diferença pode ser em função de uma separação melhor dos compostos, uma vez que o tempo de eluição está relativamente longo; (c) os compostos de Fe-proteína tanto na carne cozida quanto na carne cozida são solubilizados e biodisponibilizados pelo fluido gástrico simulado, pois não há registro no cromatograma da presença desses compostos nos extratos, ou seja, o cozimento altera a estrutura do Fe-proteína, mas os compostos resultantes são biodisponibilizados pelo fluido gástrico.

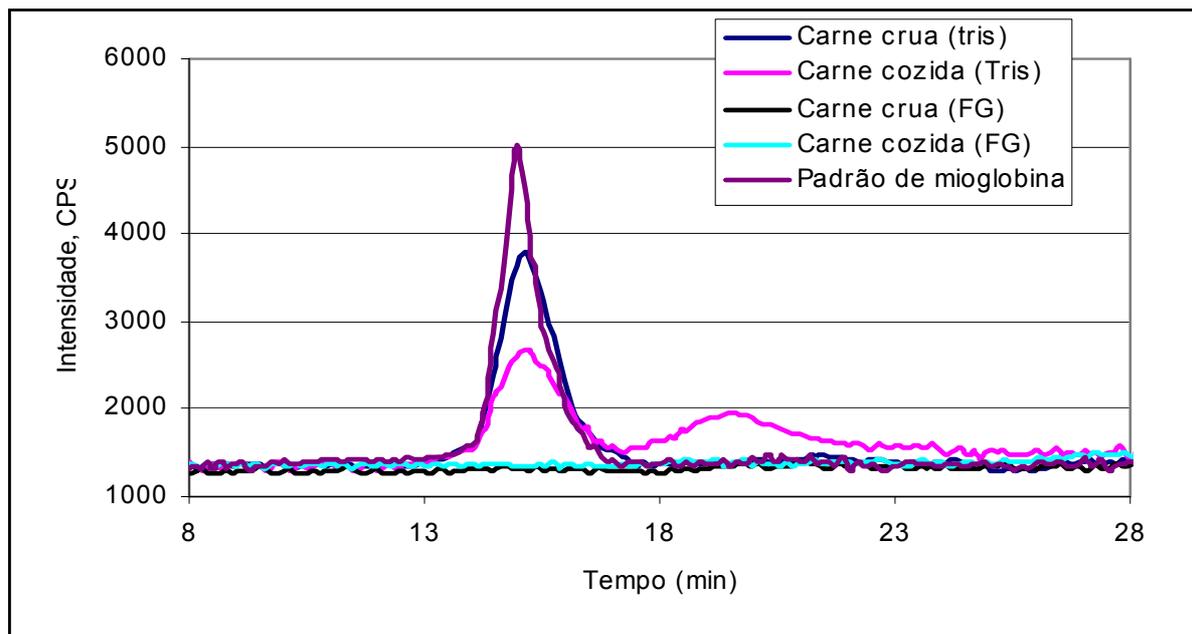


FIGURA 3.6 - Perfil do cromatograma após injeções dos extratos de carne crua e carne cozida a padrão de proteína em meio de: tampão Tris $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3; em meio de fluido gástrico simulado (FG); padrão de mioglobina em meio de tampão Tris pH 7,3.

Fe-proteína em alga crua e em alga cozida

Algas marinhas são usadas como fontes de alimentos em quase todo o mundo, tanto na forma de chá, como na culinária (em iguarias como Sushi e Sashimi etc.), tendo também aplicações industriais e como fertilizante. Os asiáticos são os maiores consumidores dessas plantas como alimento, onde o cultivo tem grande importância industrial (SEAWEED, 2006). No entanto, há preocupações quanto ao uso dessas plantas como alimento, uma vez que a concentração de As é elevada. Métodos têm sido desenvolvidos para especificação de As tanto na forma orgânica (ALMELA *et al.*, 2005) como na forma inorgânica (WUILLLOUD *et al.*, 2004).

No entanto, não há estudos visando a especificação dos nutrientes minerais nesses alimentos. O processo de cozimento na forma de cocção é recomendado na formulação de chás e no caso do preparo de iguarias são recomendados tanto a cocção quanto o aquecimento diretamente na chama. Ambos os processos podem provocar transformações ou extração das metaloproteínas presentes e tornar os minerais não-biodisponíveis.

Neste trabalho, possíveis transformações em metaloproteínas durante o processo de cocção de algas marinhas foram avaliados. A **Figura 3.7** apresenta o cromatograma das espécies Fe-proteínas presentes nos extratos de alga crua e cozida em meio de tampão Tris e em meio de fluido gástrico simulado.

Nos extratos de alga crua foram identificadas três espécies de Fe-proteínas de peso molecular na faixa de calibração avaliada (113 a 1,4 kDa): uma de peso molecular 86,5 kDa; uma de peso molecular igual ao da mioglobina (17 kDa, provavelmente é mioglobina) e outra de peso molecular 3,4 kDa. Após o cozimento, as três espécies de Fe mioglobina são destruídas ou têm a estrutura mudada de maneira que não são mais detectadas na faixa de calibração estudada no sistema de separação. No entanto, a concentração total de Fe na amostra cozida ainda representa 50 % quando comparada à concentração na alga crua (**Tabela 3.3**).

Quanto às espécies de Fe-proteína presentes na alga crua, é possível se observar que as de pesos moleculares 86,5 e 16,9 kDa são biodisponibilizadas pelo fluido gástrico e a espécie de peso molecular 3,4 kDa não sofre ação do fluido gástrico. Vale a pena salientar que em alimentos de origem vegetal a maior parte do Fe se encontra

na forma não-heme, principalmente ligada a fenóis e não é biodisponibilizado ao organismo.

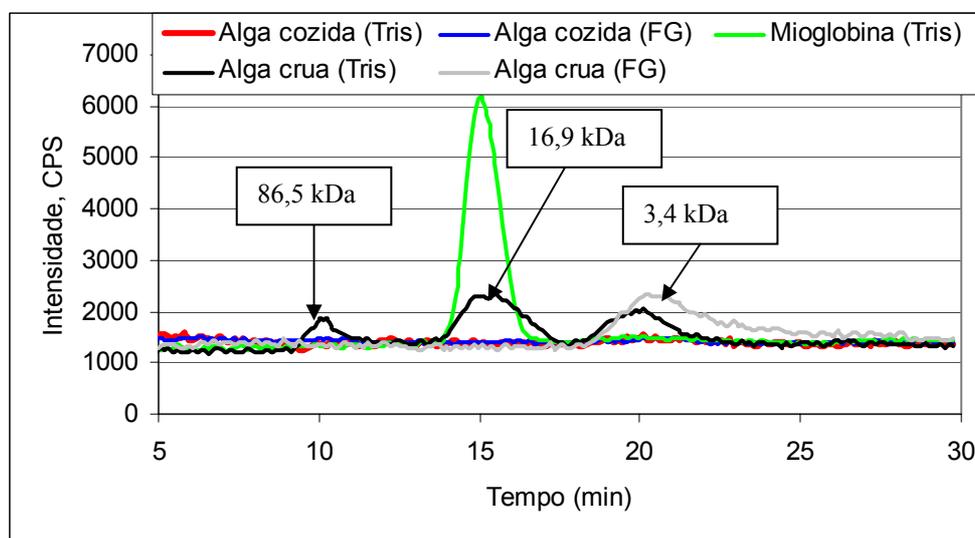


FIGURA 3.7 - Cromatograma após a injeção na coluna SEC dos extratos de: alga crua e alga cozida em meio de tampão Tris $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3 ; alga crua e alga cozida com fluido gástrico (FG); padrão de mioglobina em meio de tampão Tris.

Fe-proteína em extratos de cereal, suplemento alimentar e refrigerante

As amostras de cereais, suplemento alimentar e refrigerante são geralmente consumidas da forma como são adquiridas, ou seja, sem a necessidade de serem cozidas antes. Uma outra particularidade desses alimentos em relação às outras amostras (carne e alga) discutidas anteriormente é que nessas amostras o Fe é adicionado na forma inorgânica e possivelmente não se encontra ligado a proteínas.

Os cereais tipo flakers são apresentados como fonte de Fe, sendo indicado para serem consumidos principalmente por crianças e adolescentes nas refeições matinais. A concentração de Fe indicada pelo fabricante da marca analisada (CHOCO FLAKERS) é de 79 mg kg^{-1} e o valor determinado foram de $76,2 \pm 3,2 \text{ mg kg}^{-1}$, valor esse que está dentro da variação do valor determinado.

Na **Figura 3.8 a** é possível observar que há uma espécie de Fe-complexo de peso molecular 2,5 kD. Esse composto pode ser o Fe ligado a açúcares presentes na

formulação do alimento ou mesmo Fe-proteínas ou ainda Fe não-heme de origem vegetal presentes no cereal, pois uma espécie de Fe de peso molecular similar foi detectado no extrato de alga crua.

Em relação ao cromatograma obtido pela injeção do extrato de cereal submetido à digestão gástrica, não é possível fazer afirmações, pois o perfil do cromatograma da **Figura 3.8 a** apresenta variações de intensidade de tal forma que impede de fazer afirmações conclusivas a respeito de possíveis espécies de Fe presentes no extrato.

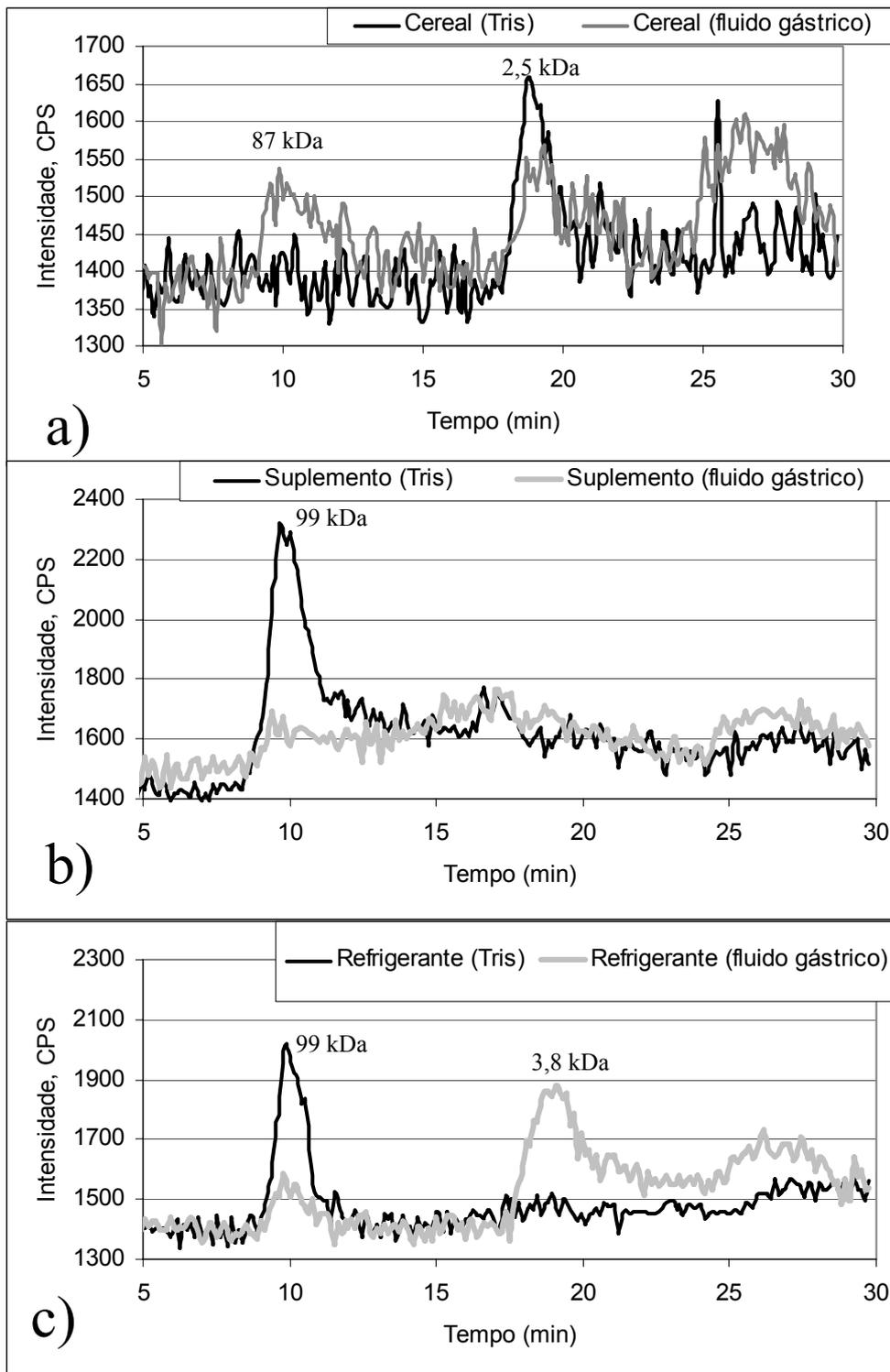


FIGURA 3.8 - Cromatograma após a injeção na coluna SEC dos extratos de: a) cereal, b) suplemento alimentar e c) refrigerante em meio de tampão Tris $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3 e em meio de fluido gástrico (FG).

No caso do suplemento alimentar, que é recomendado como fontes de Fe ($\sim 14000 \text{ mg kg}^{-1}$, indicado pelo fabricante), realmente foram encontradas elevadas concentrações ($\sim 15000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Fe, **Tabela 3.3**), mas como já mencionado anteriormente, o Fe no suplemento é adicionado na forma inorgânica. O cromatograma apresentado na **Figura 3.8 b** mostra que no extrato em meio de tampão Tris há uma espécie de Fe ligada a um composto de peso molecular 99,4 kDa. Já no extrato em meio de fluido gástrico não há evidência desse composto, o que é um indicativo de solubilização e biodisponibilidade do Fe ligado a esse composto.

Uma curiosidade que levou a se analisar o refrigerante (IRN-BRU) é que essa é uma bebida muito consumida no Reino Unido e há a idéia entre boa parte da população de que esse refrigerante é uma fonte de concentrações elevadas de Fe. Segundos alguns habitantes daqueles países, essa falsa idéia foi criada muito provavelmente a partir da similaridade das pronúncias entre as letras “IRN” e a palavra “iron”, ferro em inglês. No rótulo do refrigerante o fabricante já especifica que há somente 4 mg L^{-1} de citrato de ferro amoniacal.

No cromatograma obtido a partir da injeção dos extratos de refrigerante, **Figura 3.8 c**, pode-se observar, assim como no suplemento alimentar, que no extrato em meio de tampão Tris há uma espécie de Fe de peso molecular 99,4 kDa e que essa espécie foi parcialmente liberada após ser digerida pelo fluido gástrico. No entanto, no extrato em meio de fluido gástrico apareceu uma espécie de ferro ligado a um composto de peso molecular 3,8 kDa, que pode ser originário de uma fragmentação do composto presente no extrato em meio de tampão Tris. No caso do refrigerante, como o fabricante informa no rótulo que foi adicionado ferro na forma de citrato amoniacal (4 mg L^{-1}), foi preparada uma solução desse mesmo composto para que fosse verificado se a espécie de ferro presente no extrato era a espécie indicada pelo fabricante. No entanto, não foi detectado nenhum pico parecido com o mostrado na **Figura 3.8 c**.

3.5 – CONCLUSÕES

Os procedimentos de cozimento adotados para as amostras de carne e alga mostraram-se danosos tanto para as proteínas quanto para os metais ligados a proteínas.

No processo de cozimento da carne foi observado uma perda de ~ 18% do Fe total e no cozimento da alga a perda desse elemento foi de 50 %.

O sistema SEC-UV-ICP-MS mostrou-se adequado para estudar mudanças no perfil de proteínas durante o processo de cozimento.

O complexo Fe-mioglobina sofreu alterações durante o processo de cozimento e, no caso da carne, um composto de estrutura diferente do Fe-mioglobina original foi detectado nos extratos.

O procedimento de extração adotado pode não ser o adequado para a extração de outros grupos de metaloproteínas além dos detectados, havendo a possibilidade de se estudar outros meios extratores.

O procedimento de digestão gástrica com fluido gástrico simulado foi adequado para avaliar a biodisponibilidade *in vitro* do Fe-proteína nos extratos avaliados.

A digestão intestinal *in vitro* também pode ser adotada para obter mais informações em investigações sobre a biodisponibilidade.

Capítulo 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação das condições de operação do ICP OES já foi relativamente bem investigadas desde o surgimento da técnica, podendo-se pensar que pesquisas nesta área já estão esgotadas. No entanto, o desenvolvimento deste trabalho permitiu otimizar uma condição de operação do equipamento para determinações elementares em diferentes tipos de matrizes, sem a necessidade de operar o plasma em condições robustas.

A realização dos experimentos de forma sistemática, ou seja, aplicando planejamento fatorial, permitiu avaliar simultaneamente as interações das diferentes variáveis determinantes das condições de operação do ICP OES, melhorando a precisão dos resultados obtidos. Com experimentos realizados de forma univariada, poderia se chegar aos mesmos resultados ou similares, mas dificilmente se detectaria a influência de cada variável sobre as respostas avaliadas.

A elaboração de um protocolo de determinações (**Tabelas 2.18 e 2.19**) permite que o analista trabalhe em condições adequadas.

Estabelecendo um comparativo entre a metodologia desenvolvida no presente trabalho e métodos alternativos, para as mesmas determinações, foi possível avaliar a viabilidade econômica do ICP OES, com economia de 100 a 300 % em relação aos custos totais das determinações. Mesmo para determinação monoelementar, como por exemplo a determinação de boro.

A especiação de metaloproteínas e a avaliação de biodisponibilidade de minerais nos alimentos crus e processados foi a parte mais desafiante do trabalho, principalmente devido ao curto período de tempo para o desenvolvimento.

Os procedimentos de extração de proteínas poderiam ser mais enriquecedores em informações se outros meios extratores como ácido e base diluídos tivessem sido utilizados.

Possivelmente informações sobre mais espécies de metaloproteínas teriam sido obtidas com o uso de um equipamento com célula de colisão, que possibilitaria trabalhar com menores sinais de fundo, principalmente para elementos como o Fe.

A experiência de desenvolver parte do trabalho no grupo Trace Elements Speciation Laboratory Aberdeen (TESLA) foi enriquecedora, não só nos aspectos relacionados aos conhecimentos científicos adquiridos, mas também como contato com outras culturas, autoconfiança, bem como perceber que nossos laboratórios possuem condições de desenvolver pesquisas nos mesmos padrões de qualidade.

Capítulo 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. H.; DIEMIASZONEK, R.; JAROSZ, J.; MERMET, J. M.; ROBIN, J. & TRASSY, C. “Spectrometric study on radiofrequency induced plasma. 1. Analytical performance”. *Anal. Chim. Acta*, **84**: 271, 1976.

ALMELA, C.; LAPARRA, J. M.; VÉLEZ, D.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. & MONTORO, R. “Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: Characterization and bioaccessibility”. *J. Agric. Food Chem.* **53**(18):7344, 2005.

ASHCROFT, A. E. “Recent developments in electrospray ionisation mass spectrometry: noncovalently bound protein complexes”. *Nat. Prod. Rep.*, **22**:452, 2005.

BARNARD, T. W.; CROCKETT, M. I.; IVALDI, J. C.; LUNDBERG, P. L.; YATES, D. A.; LEVINE, P. A. & SAUER, D. J. “Solid-state detector for ICP-OES”. *Anal. Chem.*, **65**: 1231, 1993.

BATAL, A. & MERMET, J. M. “Influence of collision process on the energy-range of analytical lines in ICP-AES”. *Can. J. Spectrosc.* **27**: 37, 1982.

BENDER, D. A. & BENDER, A.E. *Nutrition: A Reference Handbook*. Oxford: Oxford University Press , 1997.

BRÄTTER, P.; BLASCO, I. N.; NEGRETTI DE BRÄTTER, V. E. & RAAB, A., “Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition”. *Analyst*, **123**: 821, 1998.

BRENNER, I. B. & ZANDER, A. T. “Axially and radially viewed inductively coupled plasmas - A critical review”. *Spectrochim. Acta B*, **55**: 1195, 2000.

BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T.; COLE, M. & WISEMAN, A. “Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasmas for multi-element analysis: Effect of sodium and calcium”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 897, 1997.

BRENNER, I. B.; ZISCHKA, M.; MAICHIN, B. & KNAPP, G. “Ca and Na interference effects in axially viewed ICP using low and high aerosol loadings”. *J. Anal. At. Spectrom.* **13**: 1257, 1998.

CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y. & CÁMARA, C. “Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method”. *Anal. Chim. Acta.* **526**: 51, 2004.

CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y. & CÁMARA, C. “Study of mercury-selenium interaction in chicken liver by size exclusion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **20**: 847, 2005.

CABEZUELO, A. B. S.; GONZALEZ, E. B., & SANZ-MEDEL, A. “Quantitative studies of aluminium binding species in human uremic serum by fast protein liquid chromatography coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry”. *Analyst* **122**: 573, 1997.

CÁMARA, F. & AMARO, M. A. BARBERÁ, R. & CLEMENTE, G. “Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility method”. *Food Chem.* **92**: 481, 2005a.

CÁMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R. & LAGARDA, M. J. “Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus” *Eur. Food Technol.* **221**: 768, 2005b.

CARRÉ, M.; LEBAS, K.; MARICHY, M.; MERMET, M.; POUSSEL, E. & MERMET, J. M. “Influence of the sample introduction system on acid effect in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **50**: 895, 1999.

COZZOLINO S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes, Manole, Barueri, SP, 2005.

CRICHTON, R. Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism. John Wiley & Sons, Chichester, England, 2001.

CUBADDA, F. “Inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of elements and elemental species in food: A review”. *J AOAC INTERN.* **87**: 173, 2004.

DAHLQUIST, R. L. & KNOLL, J.W. “Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry: analysis of biological materials and soil for major, trace and ultra trace elements”. *Appl. Spectrosc.* **32**: 30, 1978.

DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E. & MERMET, J. M. “Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers”, *Spectrochim. Acta B*, **56**: 101, 2001.

DUBUISSON, C.; POUSSEL, E. & MERMET, J. M. “Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in terms of signal-to-background ratio and matrix effects”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 281, 1997.

DUBUISSON, C.; POUSSEL, E.; TODOLI, J. L. & MERMET, J. M. “Effect of sodium during the aerosol transport and filtering in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”. *Spectrochim. Acta, Part B.* **53**: 593, 1998.

DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F. & CORNELIS, R. “Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to Crack?” *Food Chem.* **95**: 684, 2006.

FARINO, J.; MILLER, J. R.; SMITH, D. D. & BROWNER, R. F. “ Influence of solution uptake rate on signals and interferences in inductively coupled plasma optical emission spectrometry”. *Anal. Chem.* **59**: 2303, 1987.

FARRARELLO, C. N.; DE LA CAMPA, M. R.F.; SANZ-MEDEL, A. “Multielement trace-element speciation in metal- biomolecules by chromatography coupled with ICP-MS”. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 412, 2002.

FELDMANN, J., “What can the different current detection methods offer for element speciation?”. *Trends Anal. Chem.* **24**: 228, 2005.

GAINES, P. “Sample introduction for ICP-MS and ICP-OES”. *Spectrosc.* **20**: 20, 2005.

GARCIA, E. E.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. “Matrix effects on the determination of dysprosium, europium and ytterbium used as animal faecal markers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially- and radially-viewed configurations”. *J. Anal. At. Spectrom.* **16**: 825, 2001.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S. & ARRUDA, M. A. Z. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metalloproteins) in biological systems. *Talanta*, **69**: 1, 2006.

GISBERT-GONZÁLEZ, S. L. G & TORRES-MOLINA, F. T, “Zinc Uptake in five sectors of the rat gastrointestinal tract: kinetic study in the whole colon”. *Pharm. Res.*, Nova York, **13**: 1154, 1996.

GOLDWASSER, A. & MERMET, J. M. “Contribution of the charge-transfer process to the excitation mechanism in inductively coupled plasma atomic emission-spectroscopy”. *Spectrochim. Acta, Part B.* **41**: 725, 1986.

GÓMEZ, L. R.; MÁRQUEZ, G. D. & CHIRINOS, J. R. “Dual nebulizer sample introduction system for simultaneous determination of volatile elemental hydrides and other elements” *Anal. Bioanal. Chem.* **386**: 188, 2006.

GOÑI, I.; GUDIÉL-URBANO, M. & SAURA-CALIXTO, F. “In vitro determination of digestible and unavailable protein in edible seaweeds”. *J. Sci. Food Agric.* **82**: 1850, 2002.

GOY, S.; LANZISERA, D.; LOPEZ, K.; NOONAN, J. & REBELLO, J. “Which CCD detector is right for you?”. *Spectrosc.*, **13**: 36, 1998.

GOYER, R. A. “Nutrition and Metal Toxicity”. *Am. Clin. Nutr.* **61**: S646, 1995.

GREENFIELD, S.; JONES, I. L. I. & BERRY, C. T. “High-pressure plasmas as spectroscopic emission sources”. *Analyst*, **89**: 713, 1964.

GROTTI, M. & FRACHE, R. “Reduction of acid effects in inductively coupled plasma optical emission spectrometry using internal standards selected by principal component analysis”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**: 1192, 2003.

GROTTI, M.; LAGOMARSINO, C. & MERMET, J. M. “Effect of operating conditions on excitation temperature and electron number density in axially-viewed ICP-OES with introduction of vapour or aerosols”. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**: 963, 2006.

HANDS, E. S. Nutrients in food. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p315.

HARAGUCHI, H. “Metallomics as integrated biometal science”. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**: 5, 2004.

HARRINGTON, C. F.; ELAHI, S.; MERSON, S. A. & PONNAMPALAVANAR, P. “A method for the quantitative analysis of iron speciation in meat by using a combination of spectrophotometric methods and high-performance liquid chromatography coupled to sector field inductively coupled plasma mass spectrometry”. *Anal. Chem.* **73**: 4422, 2001.

HARRINGTON, C. F.; ELAHI, S.; MERSON, S. A. & PONNAMPALAVANAR, P. "Quantitative analysis of iron-containing protein myoglobin in different foodstuffs by liquid chromatography coupled to high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry". *J. AOAC INTERN.* **87**: 253, 2004.

HEBERT, C. G. Mass Spectrometry Basics. CRC Press, Boca Raton, Flórida. 2002

HUANG, M.; LEHN, S. A.; ANDREWS, E. J. & HIEFTJE, G. M. "Comparison of electron temperatures, gas kinetic temperatures, and excitation temperatures in argon ICPs operated at 27 and 40 MHz". *Spectrochim. Acta Part B* **52**: 1173, 1997.

IGLÉSIAS, M.; VACULOVIC, T.; STUDYNKOVA, J.; POUSSEL, E. & MERMET, J. M. "Influence of the operating conditions and of the optical transition on non-spectral matrix effects in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B* **59**: 1841, 2004.

INSTITUTE of Medicine. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, D.C., National Academy Press, p.442-501, 2001. Disponível em: <http://www.nutrisci.wisc.edu/NS623/drivitasum.pdf>. Acessado em 20/12/06

IUPAC, Analytical Chemistry Division, Commission on Spectrochemical and Optical Procedures for Analysis, " Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation". *Spectrochim. Acta B*, **33**: 242, 1978.

IVALDI, J. C. & TYSON, J. F. "Performance evaluation of an axially-viewed horizontal inductively coupled plasma for optical emission spectrometry". *Spectrochim. Acta B*, **50**: 1207, 1995.

IYENGAR, G. V. SUBRAMANIAN K. S. & WOITTIEZ J.R.W, Element Analysis of Biological Samples - Principles and Practice, CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1998.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A. P. & CARUSO, J. A. "HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut". *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 454, 2002.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G. & CARUSO, J. A. "Studies of various elements of nutritional and toxicological interest associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts". *J. Agric. Food Chem.* **52**: 5773, 2004a.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K. & CARUSO J. A. "Speciation of arsenic in different types of nuts by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1458, 2004b.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K. & WUILLOUD, R. G. "Studying the distribution pattern of selenium in the nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS". *Talanta* **66**: 153, 2005.

KRIS-ETHERTON, P. M.; ZHAO, G. X.; BINKOSKI, A. E.; COVAL, S. M. & ETHERTON, T. D. "The effects of nuts on coronary heart disease risk". *Nutr. Ver.* **59**: 103, 2001.

LONNERDAL, B. "Dietary factors influencing zinc absorption". *J. Nutr.*, 130: 1378S, 2000.

MA, R.; McLEOD, C. W.; TOMLINSON, K. & POOLE, R. K. "Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry". *Electrophoresis*, **25**: 2469, 2004.

MANDEL, J. & STIEHLER, R. D. "Sensitivity – a criterion for the comparison of methods of test". *J. Res. Natl. Bur. Std.*, 53: 155, 1954.

MARTINO, F. A. R.; SANCHEZ, M. L. F. & SANZ-EDEL, A. "Multi-elemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS". *J. Anal. Atom. Spectrom.* **17**: 1271, 2002.

MASSON, P. “Matrix effects during trace element analysis in plant samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with axial view configuration and pneumatic nebulizer”. *Spectrochim Acta Part B* **54**: 603, 1999

MATSURA, H.; HOKURA, A.; KATSUKI, F.; ITOH A. & HARAGUCHI, H. “Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography”. *Anal. Sci.* **17**: 391, 2001.

MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION. A Consumer Guide to cooking British Meat, London, UK, 1997.

MERMET, J. M. “Is it still possible, necessary and beneficial to perform research in ICP-atomic emission spectrometry?”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **20**: 11, 2005.

MERMET, J. M. “Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics”. *Anal. Chim. Acta*, **250**: 85, 1991.

MERMET, J. M. “Ionic to atomic line intensity ratio and residence time in inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry”. *Spectrochim. Acta Part B*, **44**: 1109, 1989.

MERMET, J. M. “Revisitation of the matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: the key role of the spray chamber”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**: 419, 1998.

MERMET, J. & M. POUSSEL, E. “ICP emission spectrometers: 1995 Analytical figures of merit”. *Appl. Spectrosc.*, **49**: 12, 1995.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R. & VAN CAMPEN, D. “A comparison of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals” *Am. J. Clin. Nutr.* **34**:2257, 1981.

MITRA, S. K. Speciation Analysis of Volatile Organotin Compounds in Andfill Gas and Digested Sewage Sludge. School of Engineering and Physical Sciences, Department of Chemistry, University of Aberdeen, 2005. Tese de doutorado, 185 p.

MOLLOY, A. M. "Folate bioavailability and health". *Internat. J. VIT. NUTR. RES.* **72**: 46, 2002.

MONTASER, A. Inductively coupled plasma mass spectrometry. Wiley-VCH, Inc. New York. 1998.

MUÑOZ, A. H. S. & KUBACHKA, K.; WROBEL, K.; CORONA, F. G.; YATHAVAKILLA, S. K. V.; CARUSO, J. A. & WROBEL, K. "Metallomics approach to trace analysis in *Ustilago maydis* using cellular fractionation, atomic absorption spectrometry, and size exclusion chromatography with ICP-MS detection". *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 5138, 2005

NOGUEIRA, A. R. A. & SOUZA, G.B. "Manual de Laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos". Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2005.

PINHEIRO, M. C. N.; MÜLLER, R. C. S.; SARKIS, J. E.; VIEIRA, J. L. F.; OIKAWA, T.; GOMES, M. S. V.; GUIMARÃES, G. A.; NASCIMENTO, J. L. M. & SILVEIRA, L. C. L. "Mercury and selenium concentrations in hair sample of women in fertile age from Amazon riverside communities". *Sci Total Environ.* **349**: 284, 2005.

POUSSEL, E.; MERMET, J. M. & SAMUEL, O. "Simple experiments for the control, the evaluation and the diagnosis of inductively coupled plasma sequential systems". *Spectrochim. Acta B*, **67**: 743, 1993.

PROMCHAN, J. & SHIOWATANA, J. "A dynamic continuous-flow dialysis system with on-line electrothermal atomic-absorption spectrometric and pH measurements for in vitro determination of iron bioavailability by simulated gastrointestinal digestion". *Anal. Bioanal. Chem.* **382**:1360, 2005.

PURCHAS, R. W. RUTHERFURD, S. M. PEARCE, P. D. VATHER, R. & WILKINSON, B. H. P. “Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle”. *Meat Science* 68: 201, 2004.

RAAB, A. & BRÄTTER, P. “Separation of metalloprotein complexes in serum by size-exclusion chromatography - Optimisation of the separation parameters retention behaviour and recovery employing radiotracers”. *J. chromatogr. B* 707: 17, 1998.

ROCKVILLE, M. D. United States Pharmacopeial Convention (2001).

ROMERO, X.; POUSSSEL, E. & MERMET, J. M. “The effect of sodium on analyte ionic line intensities in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: influence of the operation conditions”. *Spectrochim. Acta Part B* 52: 495, 1997.

RONCEVIC, S. & SIROKI, M. “Effects of low acetic acid concentrations in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”. *J. Anal. At. Spectrom.* 9: 99, 1994.

SADI, B. B. M.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S.;S.; CASTILLO, J. R. & CARUSO, J. A. “SEC-ICP-MS studies for elements binding to different molecular weight fractions of humic substances in compost extract obtained from urban solid waste”. *J. Environ. Monit.* 4: 1010, 2002.

SEAWEED SITE: http://www.seaweed.ie/uses_general/default.lasso. Accessed in 16/01/2007.

SHETH, U. K. “ Bioavailability – Plea for a rational approach”. *Ind. J. Pharmac.* 6:54, 1974.

SILVA, F. V. Avaliação de Procedimentos para Preparo de Amostras Visando Determinação Multielementar por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma

Acoplado Indutivamente. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 125 p.

SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations". *Spectrochim. Acta B*, **57**: 1905, 2002.

SKOOG, D. A.; HILLER, F. J. & NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental, 5ª ed, Bookman, Porto Alegre, 2002.

STEWART, I. I. & OLESIK, J. W. "The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively plasma sample introduction". *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**: 1249, 1998.

SZPUNAR, J. & LOBINSKI, R. "Species-selective analysis for metal-biomacromolecular complexes using hyphenated techniques". *Pure. Appl. Chem.* **71**: 899, 1999.

SZPUNAR, J. "Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques". *Analyst*, **125**: 963, 2000.

SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. & ANDREAS, P. "Hyphenated Techniques for elemental speciation in biological systems". *Appl. Spectrosc.* **57**: 101A, 2003.

SZPUNAR, J. "Metallomics: a new frontier in analytical chemistry". *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 54, 2004.

SZPUNAR, J. "Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics", *Analyst*, **130**: 442, 2005.

TANUMIHARDJO, S. A. “Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: Bioavailability to bioconversion to bioefficacy”. *Internat. J. VIT. NUTR. RES.* **72**: 40, 2002.

THOMPSON, M. & BARNES, R. M. “Analytical performance of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, IN: *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*. MONTASER, A.; GOLIGHTLY D. W. (Eds). New York, VCH Publishers Inc., p.249-293, 1992.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G. & BURGESS, K. “The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry”. *Spectrosc.*, **15**: 33, 2000.

TODOLÍ, J. L. & MERMET, J. M. “Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction”. *Spectrochim. Acta Part B*, **54**: 895, 1999.

TREVIZAN, L. C.; VIEIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. “Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer”. *Spectrochim. Acta* , **60**: 575, 2005.

TSALEV, D. L. *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice*, Vol. I e II, CRC Press, Inc. Florida, 1984.

van LIESHOUT, M.; WEST, C. E.; PERMAESIH, D.; MUHILAL.; WANG, Y.; SUN, Y.; van BREEMEN, R. B.; CREEMERS, A. F. L. VERHOEVEN, M. A. & LUGTENBURG, J. “Bioefficacy of beta-carotene in spinach and pumpkin consumed by Indonesian children”. *J. NUTR.* **132**: 2987S, 2002

VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H. & QUAGGIO, J. A. *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*. Campinas, Instituto Agrônômico, 2001. p. 285.

VANHOE, H.; SAVERWIJNS, S.; PARENT, M.; MOENS, L. & DAMS, R. “Analytical characteristics of an inductively coupled plasma mass spectrometer with a nebulizer spray system”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**: 927, 1995.

VIEIRA, E. C.; KAMOGAWA, M. Y.; LEMOS, S. G.; NOBREGA, J. A. & NOGUEIRA, A.R.A. “Decomposição de amostras de solos assistida por radiação microondas: Estratégia para evitar a formação de fluoretos insolúveis. *R. Bras. Ci Solo*, **29**: 547, 2005.

VONDERHEIDE, A. P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH. S. S.; BHYMER, C.; MONTES-BAYON, M.; DE LEON, C. P. & CARUSO. J.A. “Characterization of selenium species in brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS”. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5722, 2002.

WENDT, R. H. & FASSEL, V. A. “Induction-coupled plasma spectrometric excitation source”. *Anal. Chem.*, **37**: 920, 1965.

WHO/UNICEF (1998). International Nutritional Anemia Consultive Group. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. Washington, DC: International Life Science Institute.

WIENK, K. J. H.; MARX, J. J. M. & BEYNEN, A. C. “The concept of iron bioavailability and its assessment”. *EUR. J. NUTR.* **38**: 51 1999.

WIND, M., & LEHMANN, W.D. “Element and molecular mass spectrometry”. *J. Ana. At. Spectrom.*, **19**: 20, 2004.

WOLF, B. “The determination of boron in soil extracts, plant materials, composts, manures, water and nutrient solutions”. *Soil Sci. Plant Anal.*, **2**: 363, 1971.

WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S. & CARUSO, J. A. “Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts”. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**: 133, 2003.

WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S. S. & CARUSO, J.A. “Multielemental speciation analysis of fungi porcini (*Boletus edulis*) mushroom by size exclusion liquid chromatography with sequential on-line UV-ICP-MS detection”. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1315, 2004a.

WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S. S. & CARUSO, J. A. “Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS”. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**: 495, 2004b.

WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S.;S. & CARUSO, J.A. “Speciation of essential and toxic elements in edible mushrooms: size-exclusion chromatography separation with on-line UV-inductively coupled plasma mass spectrometry detection”. *Appl. Organometal. Chem.* **18**: 156, 2004.