

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

**Teores dos Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos na
Rastreabilidade da Carne Bovina**

Caio Fernando Gromboni

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

Orientadora: Prof. Dra. Ana Rita Araujo Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira-Filho

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2012**

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

G875te

Gromboni, Caio Fernando.

Teores dos elementos químicos essenciais e tóxicos na rastreabilidade da carne bovina / Caio Fernando Gromboni. - São Carlos : UFSCar, 2012.

103 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química analítica. 2. Preparação de amostra (Química analítica). 3. ICP-MS. 4. Quimiometria. 5. Carne bovina. I. Título.

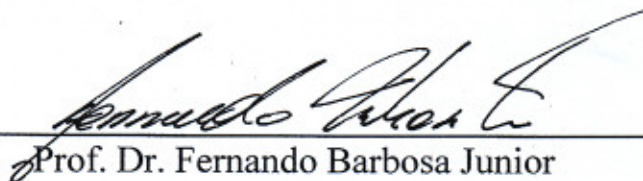
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Caio Fernando Gromboni**, realizada em 15 de fevereiro de 2012:*



Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



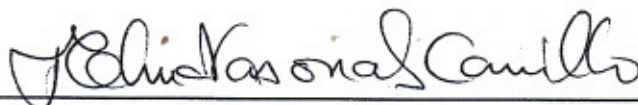
Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior



Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini



Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins Carrilho

**Aos meus pais, Fernando e
Regina, meus exemplos de vida e
meus heróis, aos meus irmãos Murilo,
Pedro Paulo e João Felipe e a minha
esposa Juliana, meu tudo.**

**“...E no meio do verde, com bando de passarinhos
Hoje vive cantando a glória de quem o curou...”**

João Antonio Eguea

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus pela oportunidade, pela força e por tudo.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pela orientação, por me acolher, pelo conhecimento, paciência, apoio e amizade. E à Embrapa, pela oportunidade de usufruir suas dependências e infra-estrutura.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira-Filho pela ajuda essencial no desenvolvimento do trabalho e pelas sugestões para a tese, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pela colaboração no decorrer do trabalho e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa, por todos ensinamentos no início de tudo, quando estava começando a apreender como era a vida no laboratório e pela participação na banca avaliadora do doutorado, com sugestões para correção do trabalho.

Aos Profs. Dr. Fernando Barbosa Júnior, Dr. Pedro Sergio Fadini e a Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins Carrilho, pelas contribuições na defesa e na correção da tese.

Aos meus pais, minha esposa Juliana (meu tudo), meus irmãos e a minha família incluindo tios, tias, primos, primas e meus avós, pela torcida, incentivo, amor, e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida e serem o alicerce da minha estrutura.

Aos amigos da vida acadêmica Rodolfo (pela ajuda nos dados e as risadas de sempre), Nayara (pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental), Fernanda e Márcio, Wlad e Jota, Eveline e Víctor, Patrícia e Danilo, Clarice e Pedro, Carlinha e Rodrigo, Silmara e Lúcio e todos os demais integrantes do GAIA pelas discussões, sugestões e colaboração, o meu mais sincero agradecimento por tudo que vivi com vocês.

Aos companheiros do ex-GAIA com os quais tive o prazer de conviver em especial a minha mãe científica Carla, o Sherlan, o Edvan, a Edilene, a Lilian e a Cláudia.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo auxílio técnico, especialmente à Cristina, ao Gilbertinho, ao Marcão, ao Vitor, e a todos os estagiários que passaram pelo laboratório de nutrição animal e solos, pela amizade e contribuições significativas ao desenvolvimento do trabalho.

Aos grandes amigos de Jaú e Mineiros que sempre me receberam de braços abertos, com muita cerveja e vários churrascos nos meus regressos ao lar, em especial Cleber e Camila, Gabriel, Fabiano, Tiago, Silas, Bruna, Lucas e a minha sogra e meu sogro por disponibilizarem o espaço para a maioria das confraternizações.

Aos amigos feitos no departamento de química da UFSCar e na Embrapa Pecuária Sudeste durante o período de realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade e especialmente às secretárias da pós, Ariane, Cristina e Luciane.

A todos os quais eu cometi a injustiça de não listar acima ficam meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

- ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente
- ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente
- PCA: Análise de componentes principais
- HCA: Análise hierárquica de agrupamentos
- PNCRC: Plano nacional de controle de resíduos de contaminantes
- TMAH: Hidróxido de tetrametilamônio
- GF-AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
- CRI: Interface de colisão e reação do ICP-MS
- PD: Grupo genético Pé-duro
- CX: Cruzado cujo pai é Canchim
- AX: Cruzado cujo pai é Angus
- LX: Cruzado cujo pai é Limousan
- BX: Cruzado cujo pai é Bonsmara
- WX: Cruzado cujo pai é Wagyo
- TCR: Teor de carbono residual

RESUMO

TEORES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS E TÓXICOS NA RASTREABILIDADE DA CARNE BOVINA. Esta tese teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias para determinação de elementos químicos essenciais e tóxicos em amostra de carne bovina (*Longissimus dorsi*) e a identificação de possíveis correlações entre as informações obtidas. Assim, visou-se a rastreabilidade das amostras, em especial aquelas de gado Nelore pertencentes ao projeto “BifeQuali”, em desenvolvimento na Embrapa que objetiva a melhoria da qualidade da carne nacional. Foram otimizadas e avaliadas três diferentes estratégias de preparo de amostra: extração alcalina, extração ácida e digestão assistida por radiação micro-ondas, empregando amostra de fígado bovino certificado (NIST 1577b), sendo a decomposição assistida por radiação micro-ondas adotada como padrão para a decomposição das 650 amostras disponíveis para o trabalho. Para as quantificações foram utilizadas a espectrometria de massa e de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-MS e ICP OES, respectivamente). Os elementos químicos quantificados por ICP-MS foram As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se e V; já por ICP OES foram Ca, K, Mg, Na, P, S e Zn. A utilização de padrão interno (Sc, Y e Bi) contribuiu para a exatidão e precisão das quantificações. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente e para as análises de componente principal (PCA) foi desenvolvida uma planilha para realizar varredura espectral de 250 comprimentos que compreendiam o intervalo de 167 a 770 nm, empregando ICP OES. Os resultados demonstraram que a safra em que o animal foi criado mostrou-se como parâmetro importante, formando os agrupamentos correspondentes às duas safras analisadas, fato que indica que os fatores climáticos afetam o perfil dos elementos químicos e na qualidade da alimentação do rebanho. Além disso, o local de confinamento também se apresentou como uma condição importante, mostrando o agrupamento de acordo com o local onde os animais eram confinados. As análises de PCA e as análises estatísticas indicaram existir correlação entre Na e K com a maciez da carne, sendo que quanto maior a concentração desses, menor será a força de cisalhamento, ou seja, maior será a maciez do contra-filé.

ABSTRACT

LEVELS OF ESSENTIAL AND TOXIC CHEMICAL ELEMENTS OF TRACEABILITY IN BEEF. The objective of this work was to develop methodologies for the determination of inorganic constituents in meat sample and the study of correlations between samples with chemical elements profile, especially Nelore samples of project "BifeQuali" aimed at improving the quality of Brazilian meat. Three different strategies for sample preparation, basic extraction, acid extraction and microwave assisted acid digestion were optimized and evaluated, by using bovine liver certified reference material (NIST 1577b), and the decomposition assisted by microwave radiation chosen for the decomposition of 650 samples used in this work. For the measurements of chemical elements, mass spectrometry and optical emission inductively coupled argon plasma (ICP OES and ICP-MS, respectively) were used. The chemical elements quantified by ICP-MS were V, Mn, As, Co, Ni, Mo, Cd, Pb, Cr, Se and Fe, by ICP OES were Ca, K, Mg, Na, P, S and Zn. The use of internal standard (Sc, Y and Bi) contributed to the accuracy and precision of measurements. For principal component analysis (PCA) was developed a worksheet to perform the spectral scanning, monitoring 250 wavelength from 167 to 770 nm using ICP OES. The results showed that the crop that is bred proved to be an important variable, forming clusters corresponds to the two crops analyzed, which indicates that climatic factors affect the profile of chemical elements and the quality of nutrition. Moreover, the place of confinement is also presented as an important variable, showing the grouping according to the place where it was confined. Through PCA and analysis using SAS software was possible to observe the correlation between Na and K with the tenderness, and the higher the concentration of these, the lower the shear force, and the higher the tenderness.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 7 |
| 2.1. Preparo de amostras | 8 |
| 2.1.1. Extração | 9 |
| 2.1.2. Decomposição empregando forno micro-ondas..... | 14 |
| 2.2. Técnicas de determinação dos elementos químicos..... | 17 |
| 2.2.1. Espectroscopia de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES). | 18 |
| 2.2.2. Espectrometria de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS). | 21 |
| 2.3. Quimiometria e rastreabilidade..... | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 30 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1. Soluções e reagentes..... | 33 |
| 4.2. Amostras | 34 |
| 4.3. Instrumentação..... | 35 |
| 4.3.1. ICP OES..... | 35 |
| 4.3.2. ICP-MS..... | 36 |
| 4.3.3. Demais instrumentos utilizados..... | 37 |
| 4.4. Procedimento experimental..... | 37 |
| 4.4.1. Extração alcalina | 38 |
| 4.4.2. Extração ácida..... | 40 |
| 4.4.3. Digestão empregando forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos..... | 42 |
| 4.4.4. Espectros empregando ICP OES..... | 43 |
| 4.5. Tratamento dos dados..... | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 48 |
| 5.1. Extração alcalina | 49 |
| 5.2. Extração ácida..... | 56 |
| 5.3. Forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos..... | 66 |
| 5.3.1. Otimização da metodologia | 66 |
| 5.3.2. Quantificação dos elementos | 71 |
| 5.3.3. Análises de componentes principais | 73 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO..... | 89 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 92 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Histórico das amostras de carne bovinas analisadas pelo PNCRC | 5 |
| Figura 1. 2. Histórico das amostras de carne bovinas analisadas pelo PNCRC que excederam o limite máximo permitido para os contaminantes inorgânicos..... | 6 |
| Figura 2.1. Principais componentes de um ICP OES..... | 19 |
| Figura 2.2. Principais componentes do ICP-MS. Adaptado de www.ufscar.br/dq-gaia/images_2007/aula1811ICP-MS.ppt (cortesia Varian Inc) - acesso em 05/01/2012 | 23 |
| Figura 2.3. Esquema da interface em 90° C do ICP-MS Varian 820-MS | 24 |
| Figura 5.1. Extração alcalina empregando TMAH após ajuste de volume com solução Triton X-100 (0,01%) e variando-se a concentração do HNO ₃ : 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0% (v/v), respectivamente | 50 |
| Figura 5.2. Espectros de massa obtidos por ICP-MS de 10 amostras aleatórias de <i>Longissimus dorsi</i> de diferentes grupos genéticos e regiões após extração empregando TMAH..... | 55 |
| Figura 5.3. Espectros de massa total obtidos por ICP-MS para 25 amostras aleatórias de <i>Longissimus dorsi</i> após extração ácida com HNO ₃ | 62 |
| Figura 5.4. Espectros de massa de 0 a 100 u.m.a. obtidos por ICP-MS para 25 amostras aleatórias após extração ácida | 63 |
| Figura 5.5. “Scores” da PCA gerados a partir da matriz de dados obtida pela análise por ICP-MS no modo “full mass scan” empregando extração com ácido nítrico..... | 64 |
| Figura 5.6. “Loadings” da PCA gerados a partir da matriz de dados obtida pela análise por ICP-MS no modo “full mass scan” empregando extração com ácido nítrico) | 65 |
| Figura 5.7. Gráfico de “scores” (classe selecionada: região) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 650 amostras | 74 |
| Figura 5.8. Gráfico de loading obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 650 amostras. | 75 |
| Figura 5.9. Gráfico de “scores” (classe selecionada - a: sexo e b: confinamento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das amostras de São Carlos..... | 76 |
| Figura 5.10. Gráfico de “scores” (classe selecionada: região) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das amostras de Nelore..... | 77 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.11. Gráfico de “loadings” obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali. | 78 |
| Figura 5.12. Gráfico de “scores” (classe selecionada: progenitor) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali..... | 79 |
| Figura 5.13. Gráfico de “scores” (classe selecionada: Safra) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali..... | 80 |
| Figura 5.14. Gráfico de “scores” (classe selecionada: local de nascimento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali..... | 81 |
| Figura 5.15. Gráfico de “scores” (classe selecionada: local de confinamento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali..... | 82 |
| Figura 5.16. Gráfico de “loadings” da matriz de dados gerada pelas análises das 249 amostras de Nelore da Embrapa – Pecuária Sudeste. | 85 |
| Figura 5.17. Gráfico de “scores” (variável selecionada: Safra) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 249 amostras de Nelore de São Carlos pertencente ao projeto BifeQuali..... | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1: Parâmetros operacionais do ICP OES empregado nas determinações do perfil dos elementos químicos..... | 35 |
| Tabela 4.2: Parâmetros operacionais do ICP-MS empregado nas determinações do perfil dos elementos químicos..... | 36 |
| Tabela 4.3: Variáveis e níveis máximos e mínimos empregados no planejamento experimental da extração alcalina..... | 38 |
| Tabela 4.4: Planejamento experimental desenvolvido em amostra certificada de fígado bovino (SRM 1557-b) para otimização da extração alcalina..... | 39 |
| Tabela 4.5: Variáveis e valores mínimos e máximos empregado no planejamento experimental da extração ácida..... | 40 |
| Tabela 4.6: Planejamento experimental desenvolvido em amostra certificada de fígado bovino (SRM 1557-b) para otimização da extração ácida..... | 41 |
| Tabela 4.7: Programa de aquecimento do forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos..... | 43 |
| Tabela 4.8: Analito e respectivos comprimentos de onda (nm) utilizados para construção dos espectros empregando ICP OES visando a construção do modelo estatístico..... | 44 |
| Tabela 5.1: Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b), após extração empregando 75 mg de amostra + 1 mL de TMAH 50%, 12h de extração (com e sem agitação; ultra-som e aquecimento) e determinação por ICP OES..... | 51 |
| Tabela 5.2: Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de material de referência certificado (fígado bovino – SRM NIST 1577b), após experimentos do planejamento experimental realizando determinação por ICP OES..... | 52 |
| Tabela 5.3: Comparação dos sinais analíticos (contagens) para curva de calibração de 0 à 4 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na determinação de Cu^{63} | 53 |
| Tabela 5.4: Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de material de referência certificado (fígado bovino – SRM NIST 1577b) após extração empregando 50 mg de amostra + 1 mL de TMAH 50% por 6 horas com determinação por ICP-MS..... | 54 |

| | |
|---|----|
| Tabela 5.5a: Valores de recuperação (%) de Ca, Cu, Fe e K do planejamento experimental 2^{7-3} em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b) empregando ICP OES..... | 57 |
| Tabela 5.5b: Valores de recuperação (%) de Na, Mg, P e Zn do planejamento experimental 2^{7-3} em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b) empregando ICP OES..... | 58 |
| Tabela 5.6: Valores de recuperação dos analitos (%) empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com agitação e aquecimento por 45 minutos e quantificação por ICP OES..... | 59 |
| Tabela 5.7: Valores de recuperação dos analitos (%) empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com agitação e aquecimento por 45 minutos e quantificação por ICP-MS..... | 60 |
| Tabela 5.8: Teste de repetibilidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o procedimento empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com agitação e aquecimento por 45 minutos e realizando quantificação por ICP-MS (n=10)..... | 61 |
| Tabela 5.9: Teor de carbono residual (TCR) da otimização da metodologia de decomposição empregando forno de micro-ondas com rotor de 41 posições..... | 67 |
| Tabela 5.10: Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de referência certificada empregando digestão assistida por radiação micro-ondas com determinação por ICP OES (n=3)..... | 68 |
| Tabela 5.11: Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de fígado e músculo certificado após empregar digestão assistida por radiação micro-ondas com determinação por ICP-MS..... | 69 |
| Tabela 5.12: Teores máximos e mínimos de elementos químicos encontrados nas amostras, média dos teores apenas das amostras que contêm o analito e porcentagem de amostras em que o analito foi encontrado..... | 72 |
| Tabela 5.13: Análise de variância para avaliar os efeitos ambientais que influenciam os teores dos elementos químicos K, Na, Ca..... | 83 |
| Tabela 5.14: Análise estatística para avaliar a influência dos elementos químicos sobre a maciez de carne..... | 86 |

Introdução

1. Introdução

A carne é um alimento importante, pois é fonte de proteínas e vitaminas, além de possuir elementos químicos essenciais à nutrição humana sendo parte integrante do cardápio do brasileiro e de diversos países.

No cenário mundial, o Brasil apresenta o segundo maior rebanho de gado bovino, atrás apenas da Índia (ANUALPEC, 2011), sendo que no rebanho nacional existe a predominância de gados zebuínos, originários da Ásia, pois estes apresentam maior tolerância ao calor, resistência a parasitas e fertilidade quando comparados aos animais de origem européia.

Considerando toda extensão do território brasileiro, a raça Nelore se destaca em número de animais e em desempenho reprodutivo e produtivo, além de ser fundamental em cruzamentos com as raças de origem européia (RESTLE et al., 2000).

No estado de São Paulo, no ano de 2011, o preço da arroba do boi aumentou cerca de 50% desde o início do ano, e esse mesmo percentual foi repassado para o quilo da carne no varejo. Uma das explicações para este fato foi que neste ano também houve o aumento do consumo interno, impulsionado pela ascensão das classes C e D, pois a depender das exportações houve uma retração, sendo que o Brasil fechou o ano com menos 300 mil toneladas vendidas no exterior em relação ao ano anterior (2010). Trata-se de um recuo (superior a 25%) considerável em volume. Porém, o mercado interno absorveu esse excedente e pagou mais, tendo em média um consumo individual de 36,6 kg/ano (ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne).

Dos países importadores da carne bovina nacional *in natura*, a Rússia é o principal mercado, visto que as exportações para esse país ficaram próximas a 210 mil toneladas líquidas. Outros mercados que também se destacam são o Irã, Egito, Hong Kong, Venezuela, Chile e Arábia Saudita. Porém mercados importantes como Estados Unidos da América, União Européia, Japão e China não apresentam grande participação; parte por barreiras protecionistas e parte por barreiras sanitárias (ABIEC, 2011).

Os maiores concorrentes da carne nacional são a Austrália e a Índia, mas a qualidade da carne nacional tem ganhado destaque devido às melhorias observadas nos últimos anos, como a redução do tempo de abate, melhorias genéticas e o aumento da produtividade. Além disso, o Brasil apresenta abundância de mão-de-obra e terras baratas. Contudo, ainda existem países que não importam a carne nacional em virtude de barreiras econômicas ou sanitárias (BENDER-FILHO, 2006).

A melhoria da qualidade da carne surge como alternativa para agregar valor ao produto nacional frente a um mercado consumidor cada vez mais exigente e preocupado com a segurança alimentar e como forma de adquirir reconhecimento internacional ao produto.

Segundo SOFOS (2008), entre os desafios da carne para o século 21 está a necessidade de programas que visem a rastreabilidade da cadeia bovina e o controle de resíduos químicos na mesma. A rastreabilidade de acordo com a norma ISO8402 consiste na capacidade de traçar o histórico, a aplicação ou a localização de um item através de informações previamente registradas. Um programa de rastreabilidade permite a identificação individual de animais e o controle de informações desde o seu nascimento até o momento de distribuição da carne pós abate. Isso garante a origem do produto, o bem estar da criação, melhoras do controle sanitário e dificulta a ocorrência de fraudes, além de agregar valor ao produto e contribuir para o reconhecimento internacional (LUCHIARI, 2001).

Alguns episódios influenciaram na preocupação em relação à implementação desses programas, como por exemplo, a crise na Inglaterra devido à contaminação por Salmonela provinda de ovos (MATIC *et al.*, 1990); a encefalopatia espongiforme bovina, vulgarmente conhecida como doença da vaca louca ou BSE (do inglês: *bovine spongiform encephalopathy*), que assolou a Europa no final da década de oitenta e na década de noventa, tendo seu auge em 1992 (BRADLEY *et al.*, 2006) e a crise da dioxina também no mesmo continente (BERNARD *et al.*, 2002).

Como consequência desses episódios, foi publicada a regulamentação da Comissão Européia (EC) 820/97 que visava à implementação de programas de

rastreabilidade na cadeia produtiva da carne, que foi complementada pela lei EC 1760/2000, que relata a necessidade de controle individual de cada um dos animais.

No Brasil, em 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 1, de 9 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), a qual instituiu o Sistema de Identificação e Certificação de Origem Bovina e Bubalina (SISBOV) que existe até os dias atuais sendo gerenciado pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA); sendo revogada posteriormente pela Instrução Normativa nº 17, de 13 de julho de 2006 (BRASIL, 2006). O SISBOV é utilizado para a identificação e o controle do rebanho de bovino do território nacional, bem como o rastreamento do processo produtivo no âmbito das propriedades rurais. As informações coletadas pelo SISBOV colaboram para nortear a tomada de decisão quanto à qualidade do rebanho nacional e importado.

Em relação a resíduos químicos presentes na carne bovina, em 1961 a FAO (*Food and Agriculture Organization*) e a WHO (*World Health Organization*) estabeleceram o Codex Alimentarius, para elaborar a legislação alimentar internacional. Na União Européia, recentemente foi implantada uma nova legislação nº 1881/2006, que fixa os teores máximos de Cd, Hg, Pb e Sn, de maneira a reduzir a presença desses contaminantes em determinados alimentos a níveis tão baixos quanto razoavelmente possível segundo as boas práticas de fabricação. Essa legislação é ainda mais restritiva se comparada a anterior, nº 466/2001.

No Brasil, existe o plano nacional de controle de resíduos de contaminantes (PNCRC) que foi implementado no ano de 2002, onde é feito o controle de contaminantes orgânicos (anabolizantes e pesticidas) e de contaminantes inorgânicos (As, Cd e Pb), sendo que os valores são baseados no Codex Alimentarius. Segundo a instrução normativa nº 24, de 9 de agosto de 2011, os teores permitidos para esses contaminantes inorgânicos são de 1000 µg/Kg para As e Cd e 500 µg/Kg para Pb (BRASIL, 2011), sendo esses valores estipulados com base nas legislações americanas e européias. Até o presente momento já foram analisadas pelo PNCRC 4296 amostras para a pesquisa de contaminantes inorgânicos na espécie bovina, distribuídas no período conforme ilustra a figura 1.1.

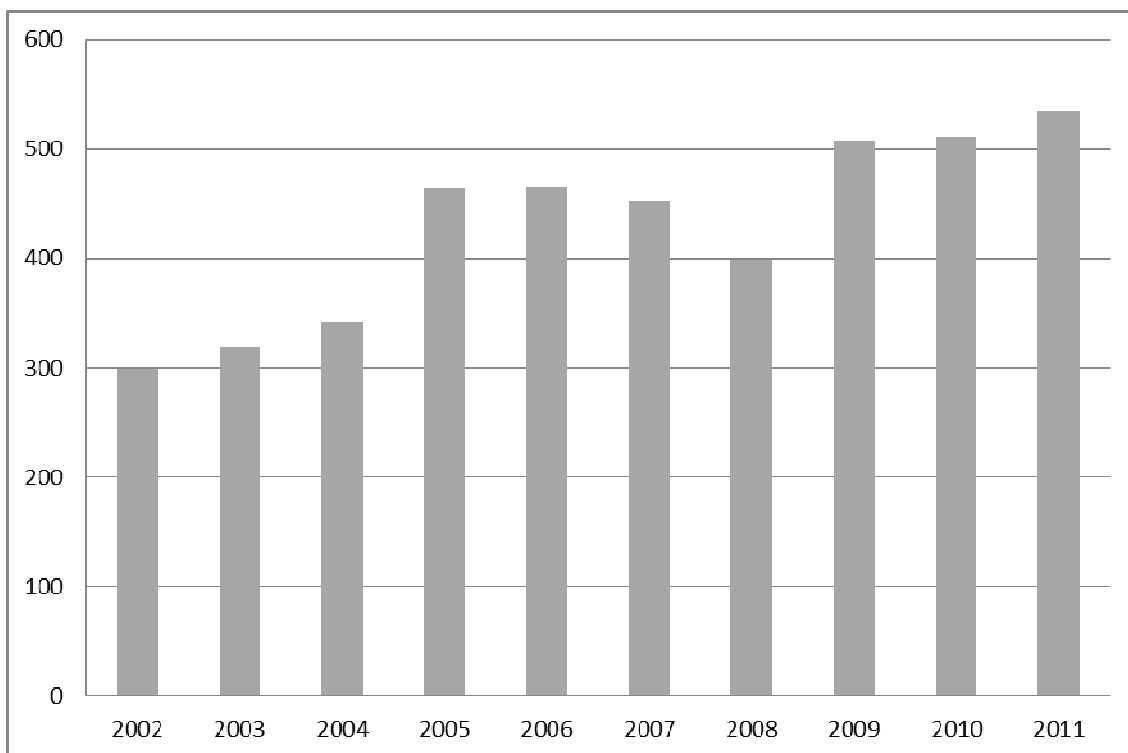


Figura 1.1. Histórico das amostras de carne bovina analisadas pelo PNCRC.

A figura 1.2 ilustra o número de violações de contaminantes inorgânicos que foram constadas no período de 2002 a 2011, sendo que foram detectadas um total de 24 não conformidades.

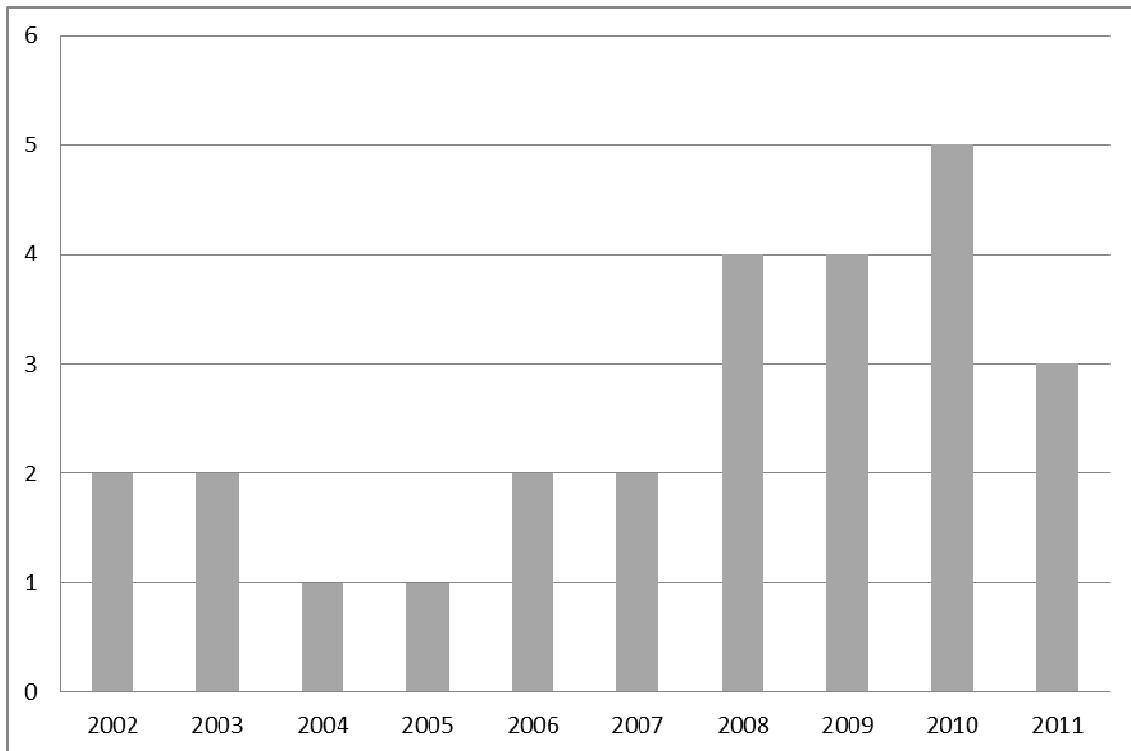


Figura 1.2. Histórico das amostras de carne bovina analisadas pelo PNCRC que excederam o limite máximo permitido para os contaminantes inorgânicos.

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar metodologias analíticas para determinação de macro, micronutrientes e contaminantes inorgânicos em amostras de carne bovina de diferentes grupos genéticos, provindos de quatro regiões brasileiras, e realizar estudos de rastreabilidade e associações de acordo com o perfil dos elementos químicos nas amostras.

Revisão bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estima-se que aproximadamente 50% de todas as medições realizadas no mundo inteiro utilizem a química como ferramenta (ZSCHUNKE, 2000); uma análise química necessita de métodos com confiabilidade que passa por um procedimento que apresente reprodutibilidade e repetibilidade, nesse sentido, a sequência analítica é composta por 8 etapas: definição do problema, escolha do método, amostragem, pré-tratamento da amostra, medida, calibração e avaliação dos resultados e ação (KRUG, 2008).

2.1. PREPARO DE AMOSTRAS

De acordo com AGAZZI E PIROLA (2000), o preparo de amostra pode variar desde análise direta (NOMURA & VITORIANO, 2010), diluição da matriz (CINDRIĆ *et al.*, 2011), extração (NASCENTES *et al.*, 2001) ou até a digestão parcial ou total da amostra (RODUSHKINA *et al.*, 2008), dependendo do objetivo da matriz e da análise química. Porém, geralmente, a maioria das técnicas analíticas utilizadas para determinação de elementos químicos inorgânicos requer que a amostra esteja em solução aquosa. Entre elas estão as técnicas espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente – ICP OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e espectrometria de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente – ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectroscopy*).

A etapa do preparo de amostra é de fundamental importância na análise química, uma vez que consome em média cerca de 60% do tempo total do processo, sendo responsável por 30% dos erros totais das determinações (OLIVEIRA, 2003). Em geral, busca-se a menor manipulação possível da amostra para minimizar as possibilidades de contaminação; reagentes e água de elevado grau de pureza, utilizados na proporção ideal para o processo visando uma geração menor de resíduos, menor gasto com reagentes e brancos controlados, além de

frascos descontaminados. Sendo a validação da metodologia uma etapa importante, normalmente realizada com materiais de referência certificados (BOCK, 1979).

Nesse trabalho foram empregados métodos de extração e decomposição para as amostras de carne bovina.

2.1.1. Extração

As técnicas de extração são consideradas brandas quando comparadas a outras formas de preparo de amostras, uma vez que não resultam na mineralização total da matriz, possuindo como objetivo principal a retirada do analito de interesse da matriz disponibilizando-o para posterior determinação.

Atualmente, existem diversas técnicas que podem ser utilizadas em extrações de elementos inorgânicos nas amostras biológicas dependendo da aplicação do estudo que será realizado. Existem técnicas de extração voltadas para a pré-concentração de analito, utilizadas quando o teor do mesmo normalmente está abaixo dos limites de quantificação da técnica que será empregada na determinação, como é o caso da extração empregando ponto nuvem (BEZERRA *et al.*, 2006) ou métodos de coprecipitação (OYMAK *et al.*, 2009); ou técnicas voltadas para extração sequencial com objetivo de analisar a disponibilidade dos elementos em diferentes frações, comumente aplicadas em análises de solo (LARNER *et al.*, 2008); também há extrações voltadas para estudos de especiação química, onde o objetivo da análise é não causar interconversões no número de oxidação do analito, necessitando de métodos brandos para remover o mesmo da matriz (GONZALVEZ *et al.*, 2009) e ainda extrações em fase sólida onde o analito é retido por um adsorvente e depois é eluído em uma fase móvel apropriada (TUZEN *et al.*, 2009), entre outras. Nesse trabalho será dado enfoque as extrações alcalinas e extrações ácidas, uma vez que o objetivo é a determinação total dos elementos inorgânicos e essas foram utilizadas durante o desenvolvimento.

As extrações alcalinas apresentam-se como uma interessante alternativa para o preparo de amostras de um grande número de analitos para

diferentes tipos de amostra e caracterizam-se geralmente por serem procedimentos de rápida execução (NÓBREGA *et al.*, 2006).

O hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) é uma base com fórmula $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ com pH alcalino (13,4-14,7), sendo comercializado de diferentes maneiras: em 10% ou 25% m/v em água ou 25% m/v em metanol. Dependendo do fabricante pode existir contaminação, gerando brancos com altos sinais que podem dificultar a determinação em baixas concentrações (NÓBREGA *et al.*, 2006). Trata-se de um reagente incolor que apresenta forte odor de amina, totalmente solúvel em água e estável em temperatura ambiente. Em relação à sua toxicidade existem poucos dados disponíveis, mas os vapores deste reagente podem causar irritação no nariz, garganta e sistema respiratório. Sua absorção através da pele pode levar a efeitos adversos.

Nesse trabalho, o TMAH foi empregado como um procedimento de extração; nesse caso o TMAH pode solubilizar completa ou parcialmente a amostra dependendo da matriz. O uso do TMAH para dissolução de materiais biológicos surgiu como alternativa à digestão convencional para determinação de compostos inorgânicos na década de 70 e a partir daí iniciou-se a sua inclusão como estratégia para o preparo de amostra (JACKSON, 1972). São encontradas aplicações na literatura em que esses procedimentos de extração podem ser realizados sem (BATISTA *et al.*, 2009) ou com aquecimento (TAGAMI *et al.*, 2006), ou até mesmo utilizando radiação ultrassônica (MELO *et al.*, 2005) ou micro-ondas (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2009).

UCHIDA *et al.* (1992) realizaram a determinação de 20 elementos empregando ICP OES em diversas amostras como cabelo, mexilhão, folhas de chá, farinha, arroz e fígado bovino, após realizar o preparo de amostra empregando TMAH e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); o procedimento foi realizado em aproximadamente 4 horas, sendo que parte do mesmo foi executado com aquecimento. Para solubilizar 50 mg das amostras foram empregados 1mL de TMAH (25% m v⁻¹) e EDTA 0,2 mol L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 8 – 9 com solução de HCl 3 mol L⁻¹. Após centrifugação foi realizado a leitura do sobrenadante.

Em outro trabalho, POZEBON *et al.*, (1998) realizaram a determinação de micronutrientes e contaminantes inorgânicos em amostras certificadas, incluindo músculo bovino; a técnica de determinação empregada foi atomização eletrotérmica e espectrometria de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ETV-ICP-MS). Na etapa de preparo de amostra foi realizado aquecimento à 90° C por 2 h e para o músculo bovino foi utilizado 2 µL por miligrama de amostra do TMAH 25% m v⁻¹. Os resultados demonstraram boa exatidão na recuperação dos teores certificados.

MATUSIEWICZ & GOLIC (2004) empregando espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) determinaram Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Sr, e Zn após realizarem o preparo de amostras de 250 mg com misturas de TMAH 25% m v⁻¹ que variaram de 2 à 4 mL. Após adição do TMAH as amostras foram posicionadas em um banho ultrassônico com 40 W de potência em tempos que variaram de 2 a 4 minutos e em seguida diluídas com água. Nesse estudo foram utilizadas amostras de lagostas, fígado bovino e leite em pó. Os autores relataram que a adição de padrão é recomendada, uma vez que a calibração em meio aquoso não apresentou resultados precisos.

Já BATISTA *et al.* (2009) descreveram um método para ser aplicado em amostras biológicas, incluindo-se fígado e músculo bovino entre as amostras certificadas analisadas. No procedimento é adicionado 1 mL de TMAH 25% m v⁻¹ à 75 mg de amostra, que é deixada em repouso por 12 horas. Em seguida o volume é ajustado para 10 mL empregando HNO₃ (0,5 v v⁻¹) e Triton X-100 (0,01 v v⁻¹). Nas determinações foi utilizado ICP-MS e os resultados demonstraram bons valores de recuperação para as amostras certificadas analisadas. Além disso, foi realizado um estudo de estabilidade da solução quando armazenada à - 20° C e o resultado demonstra que a solução pode ficar armazenada por até 3 dias.

Apesar de alguns experimentos relatarem a necessidade de um tempo elevado para o preparo da amostra, a frequência analítica pode ser bastante alta se for considerado que as amostras podem ser preparadas diretamente nos tubos de polipropileno, podendo, por exemplo, deixar centenas de amostras preparadas de um dia para o outro.

Também foi avaliado nesse trabalho extração em meio ácido. Essas extrações apresentam a vantagem de não necessitarem do ajuste do pH antes da determinação empregando técnicas espectroscópicas.

Para aplicações em solo, existe uma norma ISO 11466:1995 que especifica um método para a extração, com água régia, de elementos-traço em solos e materiais similares. A solução resultante do preparo é adequada para a determinação empregando técnicas de absorção e espectroscópicas.

MIYAZAWA *et al.* (1984) empregaram soluções de HNO₃, HCl, HClO₄ e H₂SO₄ em diferentes concentrações para extração em amostras de folha de café, soja e *Panicum maximum* empregando espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) para determinação de Ca, Cu, K, Fe, Mg, Mn, P e Zn. As soluções de HCl e HNO₃ 1 mol L⁻¹ apresentaram os melhores resultados se comparadas as demais, contudo os elementos Fe e P não apresentaram boas recuperações uma vez que estão ligados fortemente à matriz.

BARRETO *et al.* (2004) avaliaram a disponibilidade de metais em sedimentos durante 13 meses empregando técnicas de fluorescência de raios X e ICP OES. O preparo de amostra para as análises de ICP OES eram realizado através da extração empregando HCl. Contudo, os autores relataram que a extração sequencial foi mais eficiente do que a extração simples, uma vez que Al, Cr, Fe, Ni e Pb foram pouco extraídos provavelmente pelo fato de estarem ligados à óxidos e à matéria orgânica.

Já KILBRIDE *et al.* (2006) utilizaram como método de comparação um procedimento baseado em extração ácida e ICP OES para determinação dos teores totais de As, Cu, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em 81 amostras de solo. O objetivo dos autores era avaliar um equipamento portátil de fluorescência de raios X, mas o fato de utilizarem a extração como método de comparação demonstra a confiabilidade do método.

Também são relatados na literatura trabalhos que envolvem extração em conjunto com ondas ultrassônicas. SOUZA *et al.* realizaram a determinação de Cd, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Ti, V e Zn em petróleo após um tratamento com a adição de HNO₃ concentrado e aquecimento por 30 minutos à 85° C. Em seguida, a amostra foi adicionada em banho ultrassônico por 15 minutos para complementar o processo.

Para validar a metodologia foi utilizada a amostra NIST 1634c (*Trace Elements in Residual Fuel Oil*) e os valores de recuperação dos analitos ficaram entre 90 e 105%.

MANUTSEWEE *et al.* (2007) realizaram a extração adicionando à 0,5 g de amostra de peixe 2 mL de HNO_3 (4 mol L^{-1}), 2 mL de HCl (4 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A amostra foi sonicada por 30 min à 56°C . Cádmio e Cu foram determinados por absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e Zn por FAAS. Os autores utilizaram amostra certificada para validar a metodologia e os teores de recuperação variaram de 88 à 114% e os resultados encontrados não demonstraram diferença se comparados aos teores determinados após digestão empregando forno de micro-ondas.

Também existem trabalhos na literatura que realizam a comparação entre métodos de extração ácida e digestão total. SASTRE *et al.* (2002) compararam digestão total empregando micro-ondas e extração empregando água régia ou HNO_3 para amostras ambientais (solo, sedimentos, lama e material vegetal para os elementos Cd, Cu, Pb e Zn). Os métodos apresentaram resultados similares para os analitos, porém os autores ressaltaram que as extrações são mais rápidas e apresentam menor custo operacional.

Yafa & Farmer (2006) realizaram a digestão em forno micro-ondas e compararam os resultados obtidos com a extração com água régia seguindo metodologia ISO11466 para amostras de turfa para os elementos Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, P, Pb, S, Ti, V e Zn; ainda aplicaram as metodologias em material de referência certificado (SRM 1635). Os autores relataram que os valores encontrados pelas metodologias aplicadas no preparo são semelhantes; porém ressaltaram a necessidade de inclusão de HF para determinação de Al objetivando a dissolução completa dos aluminossilicatos.

As principais vantagens das técnicas de extração são a elevada frequência analítica e a facilidade para o preparo das amostras uma vez que é necessária a pesagem no frasco de polipropileno e ali é desenvolvido todo o preparo e posterior quantificação. Contudo, como não há mineralização total da amostra, ainda resta carbono no meio, que pode atuar como interferente nas técnicas espectroscópicas.

2.1.2. Decomposição empregando forno micro-ondas

As decomposições empregando forno micro-ondas baseiam-se na oxidação da matriz carbonácea convertendo-a em CO₂, H em H₂O, N em óxidos de nitrogênio e outros elementos em formas inorgânicas.

Na década de 70, ABU-SAMRA *et al.* (1975) utilizaram as micro-ondas como uma alternativa para decomposição de amostras. Os autores utilizaram um forno de micro-ondas caseiro para a digestão de amostras biológicas. Alguns anos depois, foram desenvolvidos fornos de micro-ondas comerciais adequados às condições mais drásticas de digestão e mais resistentes aos vapores ácidos. Com o passar dos anos, contínuos melhoramentos foram desenvolvidos, no sentido de aumentar a segurança do operador e a produção de materiais resistentes aos ácidos inorgânicos utilizados, sendo que atualmente existem controladores de pressão e temperatura para minimizar os riscos de explosão (KRUG, 2008).

Na década de 90, houve um aumento expressivo no número de metodologias que empregavam radiação micro-ondas para o preparo de amostras; além de procedimentos de extração para analitos orgânicos; dessa forma a utilização desses sistemas vem sendo amplamente realizada com diferentes tipos de aplicações (KRUG, 2008).

Quando um material não transparente às micro-ondas absorve esse tipo de radiação, pode sofrer um aumento considerável na sua temperatura devido, principalmente, à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando migração iônica e rotação de dipolos. Esses dois processos ocorrem quando as micro-ondas geradas no magnetron interagem com a solução de um ácido (ou mistura de ácidos) usado para a digestão da amostra de interesse.

Vários trabalhos na literatura, inclusive ARRUDA & SANTELLI (1997), apontam o aquecimento assistido por radiação micro-ondas como alternativa aos procedimentos convencionais de aquecimento, já que reduz o tempo de preparo de amostras como resultado das elevadas temperaturas e pressões que podem ser alcançadas em virtude dos frascos.

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que cobrem uma faixa de frequências de 300 a 300.000 MHz, sendo que os fornos de micro-ondas fabricados para uso doméstico ou em laboratório empregam micro-ondas com frequência de 2450 MHz, com potências que podem variar de 600 a 1400 W. Por exemplo, um equipamento moderno que opera com uma potência de 1400 W é capaz de fornecer aproximadamente 20.000 cal min⁻¹ (KRUG, 2008).

Uma forma de avaliar a eficiência da decomposição pode ser realizada determinando-se o teor de carbono residual, que pode interferir nos métodos de medida (WASILEWSKA *et al.*, 2002). GOUVEIA *et al.* (2001) com base em KRUSHEVSKA *et al.* (1992) propuseram um procedimento de determinação do teor de carbono residual empregando ICP OES e esse tem sido utilizado frequentemente pelo Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) do DQ/UFSCar, para a determinação de carbono residual de amostras orgânicas.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos em que se empregam radiações micro-ondas a diferentes tipos de matriz; alguns utilizam elevados volumes de ácidos, outros já empregam ácidos diluídos; uma compilação de procedimentos pode ser encontrada no CD-ROOM do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (2006).

Além disso, existem os sistemas de radiação focalizada, onde as micro-ondas são direcionadas para a amostra, esses sistemas possibilitam a digestão de maiores quantidades de amostras (GARCIA-REY *et al.*, 2003), porém existem relatos de perda de analito voláteis (COSTA *et al.*, 2009), tratando-se de um tema bastante controverso na literatura.

Nesses fornos de radiação focalizada, as micro-ondas produzidas pelo magnetron (gerador de ondas) são transferidas para um tubo metálico, denominado guia de ondas, que as conduz diretamente para o frasco reacional localizado dentro do forno (KINGSTON & JASSIE, 1988). A eficiência de absorção das micro-ondas pela amostra a ser decomposta é maior, pois há um melhor aproveitamento da radiação incidente.

Uma das vantagens de se realizar decomposições assistidas por micro-ondas à pressão atmosférica é a possibilidade de adição de reagentes durante o processo de digestão, aumentando assim sua eficiência. Outra vantagem do uso

do sistema com radiação focalizada é que podem ser empregadas maiores massas de amostras, pois os gases gerados são continuamente removidos, sem o risco de aumento de pressão. Contudo, para atingir temperaturas elevadas é necessário que seja adicionado H_2SO_4 , que possui ponto de ebulição elevado (KRUG, 2008).

Já nos sistemas fechados, que operam pressurizados, a radiação micro-ondas é distribuída pela cavidade. A massa de amostra acaba sendo um fator limitante, porém com técnicas analíticas que apresentam baixos limites de detecção e quantificação esse problema tende a ser solucionado.

SUN *et al.* (1997) realizaram a decomposição de tecido de ostra e fígado bovino certificado empregando digestão em forno micro-ondas e HNO_3 ; H_2O_2 e HF. Para digestão de 0,5 g de amostra foram utilizados 10 mL de HNO_3 (70%) e 0,5 mL de HF concentrado. Ao término da digestão foram adicionados 5 mL de H_2O_2 e 10 mL de solução de H_3BO_3 (4% m v^{-1}). Assim como Yafa & Farmer (2006), observaram a necessidade da adição de HF para obterem bons resultados de recuperação para o Al. Para os outros 14 elementos determinados, os teores foram condizentes com os valores dos materiais certificados.

DEMIREZEN & URUÇ (2006) realizaram determinações de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Se em amostras de peixe, carne e produtos à base de carne. Foram selecionadas 34 amostras e essas foram digeridas em forno fechado com adição de 10 mL de HCl em um programa de 30 min. Segundo os autores, os valores encontrados demonstraram diferenças significativas nas concentrações de carne e de peixe, sendo que os teores de Fe se apresentam acima dos valores permitidos pela legislação da comissão europeia.

A utilização de ácidos diluídos em forno de micro-ondas surgiu como alternativa uma vez que o consumo de reagentes é menor, gerando menores custos, resíduos e brancos com sinais analíticos menores.

ARAÚJO *et al.* (2002) avaliaram a eficiência da digestão ácida assistida por micro-ondas de plantas utilizando diferentes concentrações de HNO_3 com H_2O_2 pela medida do conteúdo de carbono residual usando ICP OES. Neste trabalho os autores observaram que as plantas poderiam ser eficientemente digeridas em frascos de micro-ondas fechado usando uma solução de HNO_3 (2 mol L^{-1}).

Em trabalho desenvolvido por GONZALEZ *et al.* (2009), foi realizado um estudo para verificar o efeito de várias concentrações ácidas (2,0, 7,0 e 14,0 mol L⁻¹) na digestão com micro-ondas de amostras de origem animal e vegetal. Neste trabalho verificou-se que o emprego de soluções 7 mol L⁻¹ de HNO₃ propiciou a recuperação de analitos com quantidades de carbono orgânico residual menores quando comparado aos resultados obtidos com o ácido concentrado, resultando em menor consumo de reagentes e geração de resíduos.

Desenvolvimentos recentes aumentaram a frequência analítica dos fornos de micro-ondas. Empresas comerciais lançaram rotores com mais de 40 frascos que operam a baixa pressão. Contudo, esses frascos, apresentam como fator limitante a massa e o tipo de amostra que pode ser utilizada visando uma decomposição eficiente.

Nesse trabalho foi utilizado forno comercial com rotor de 41 frascos, que segundo o fabricante pode operar até 200°C e p = 20 bar, sendo indicado para preparo de amostras ambientais (solo, lama, águas residuais), de amostras biológicas (tecidos, alimentos, rações, plantas, produtos agrícolas), entre outras aplicações (<http://www.salmenkipp.nl/images/stories/multiprep-41.pdf>).

2.2. Técnicas de determinação dos elementos químicos

Após a etapa do preparo de amostra, a determinação do analito é o passo subsequente. Trata-se de uma etapa importante na análise química, pois está diretamente relacionada com os resultados que serão gerados.

Técnicas como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS), ICP OES ou ICP-MS são utilizadas em determinações de elementos presentes em baixa concentração, devido à maior precisão dos resultados e à alta sensibilidade. Dentre essas técnicas espectroscópicas, o ICP-MS apresenta destaque por possuir sensibilidade superior ao ICP OES, maior frequência analítica quando comparado ao GF-AAS, e por ser uma técnica multielementar e simultânea. Já o ICP OES também é uma técnica multi-elementar que contribui na diminuição do tempo das análises.

2.2.1. Espectroscopia de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES)

Na década de 1860, o químico Robert Bunsen (1811-1899) e o físico Gustav Robert Kirchhoff (1824-1887) observaram que certas substâncias emitiam cores características quando aquecidas em uma chama. A partir de suas observações, sistematizaram as bases da espectroscopia na análise química.

Cem anos depois, em 1960, a capacidade multielementar e simultânea atraiu a atenção para o ICP OES, sendo que os primeiros equipamentos comerciais foram introduzidos em 1974 e daí em diante foram realizados muitos desenvolvimentos e pesquisas visando aprimorar a instrumentação e a técnica tornou-se muito utilizada em análise de rotina (MONTASER & GOLIGHTLY, 1992; MERMET & POUSSEL, 1995).

Uma representação dos principais componentes de um ICP OES é mostrada na figura 2.1.

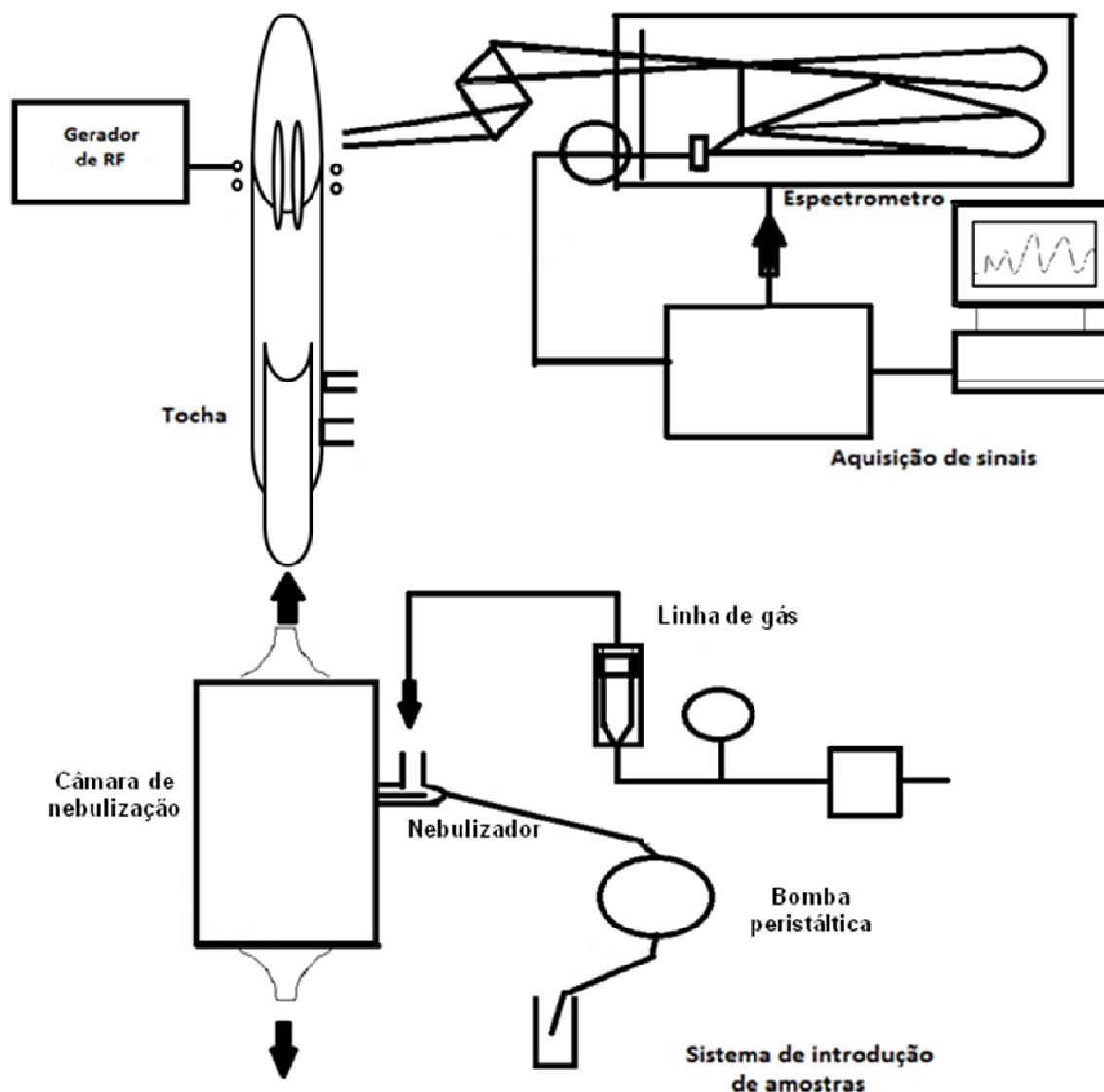


Figura 2.1 Principais componentes de um ICP OES.

Em ICP OES, geralmente a amostra é inserida no equipamento na forma líquida (GAINES, 2005). Ela é aspirada pela bomba de fluxo do equipamento (representada na figura pelo número 1), sendo conduzida até o nebulizador (número 2); lá em confluência com a linha de gás é convertida em aerossol e conduzida até a câmara de nebulização onde ocorre a separação das gotículas maiores das menores (DULUDE, 2008). Em geral as gotículas menores continuam percorrendo o caminho até o detector, geralmente cerca de 1 a 5%; após a passagem pela câmara de nebulização são conduzidas para a tocha (GAINES, 2005).

A tocha é composta por três tubos concêntricos de quartzo. Existe um fluxo principal de argônio ($\sim 12-17 \text{ L min}^{-1}$) que passa através da tocha entre o tubo externo e o tubo intermediário da mesma. Outro fluxo de gás suplementar ($\sim 1 \text{ L min}^{-1}$) passa entre o tubo intermediário e o tubo central sendo utilizado para introdução da amostra (HEBERT, 2002).

O plasma gerado na tocha é um gás parcialmente ionizado onde existem elétrons livres e íons positivos em movimento ao mesmo tempo. Quando o gás argônio passa pela tocha de quartzo e ocorre descarga elétrica de uma bobina de Tesla se inicia a ionização do gás formando o plasma. 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 (HUANG *et al.*, 1997).

No plasma ocorrem os processos de dessolvatação, vaporização, atomização e excitação e/ou ionização. Os átomos e os íons excitados retornam ao seu estado fundamental emitindo linhas em múltiplos comprimentos de onda, que são separados por um policromador e cujas intensidades são medidas por um sistema de detecção (DUBUISSON *et al.*, 1998).

Os equipamentos comerciais estão disponíveis em duas configurações: radial (tocha na posição vertical em relação ao sistema óptico) e axial (tocha na posição horizontal em relação ao sistema óptico). Os equipamentos com configuração axial, geralmente apresentam melhores limites de detecção e quantificação, contudo, são mais susceptíveis a interferências matriciais.

As interferências matriciais estão relacionadas a composição das amostras ou dos reagentes envolvidos no processo e podem causar supressão ou elevação do sinal analítico (IGLÉSIS *et al.*, 2004). Uma forma de atenuar esse tipo de interferência pode ser empregando o plasma em condições robustas, ou seja, com maior potência, aumentando o potencial energético e diminuição da vazão do gás de transporte, aumentando o tempo do analito na tocha.

Outros fatores também podem causar interferências na análise como a presença de elementos facilmente ionizáveis; diferenças na acidez que podem

causar alterações nas propriedades físicas e nos processos de atomização, excitação e ionização; além de emissões indesejáveis que podem ser geradas por compostos orgânicos residuais; formação de óxidos e recombinações; a compatibilização de matriz, o uso de padrão interno e adição de analito contribuem para a correção dessas dificuldades.

TREVISAN *et al.*, (2003) desenvolveram procedimentos para quantificação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de fígado bovino certificado empregando micro-ondas com radiação focalizada e ICP OES como técnica de determinação. Os teores de recuperação dos analitos mostraram a boa eficiência do processo.

WASILEWSKA *et al.*, (2002) realizaram a decomposição de amostras biológicas e determinaram As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Se e Zn e constatam que a presença de carbono interferia na medida de As e Se.

GOUVEIA *et al.*, (2001), desenvolvendo trabalho para quantificação de teores de carbono residual empregando ICP OES realizaram a digestão de amostras de fígado bovino em forno de micro-ondas com cavidade empregando HNO₃ e H₂O₂ e constataram que a sensibilidade do equipamento com configuração axial é maior do que o de configuração radial.

O ICP OES é uma técnica bem estabelecida, com limites de detecção e quantificação satisfatórios para a maioria dos elementos químicos e que fornece resultados precisos com rapidez o que torna um atrativo para determinação de metais.

2.2.2. Espectrometria de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS)

A espectrometria de massa acoplada ao plasma induzido (ICP-MS) foi proposta em 1980, durante o desenvolvimento da tese de doutoramento de Houk (HOUK *et al.*, 1980; HOUK, 1986; HOUK, 2000) sendo que no ano de 1983 foi lançado o primeiro equipamento comercial pela empresa canadense Sciex,

posteriormente Perkin-Elmer Sciex. Atualmente é uma técnica com expressivo número de equipamentos distribuídos por empresas, centros de pesquisa e universidades, porém que ainda apresenta um custo elevado.

A aceitação da técnica analítica pode ser justificada pela eficiente geração de íons monovalentes em um plasma induzido de argônio. Além disso, considerando-se o reduzido número de isótopos estáveis para cada elemento da tabela periódica, o espectro de massas gerado é relativamente simples e os íons são separados e detectados com alta sensibilidade em função da razão massa/carga.

A técnica apresenta-se como ideal, para determinação de elementos em baixa concentração, em função de sua alta sensibilidade; além disso, trata-se de uma técnica multielementar que contribui na diminuição do tempo da análise. O princípio de introdução da amostra e geração do plasma é similar ao descrito para o ICP OES, a amostra (geralmente em solução aquosa) é aspirada por uma bomba peristáltica, sendo nebulizada para dentro da câmara de nebulização e conduzida para a tocha onde ocorre os processos devido a grande quantidade de energia disponível; porém nessa técnica o interesse é pelos íons que são gerados no plasma e que devem ser conduzidos até o detector, onde é feito o monitoramento da razão massa/carga (m/z) selecionada pelo analista. A figura 2.2 ilustra as principais partes do equipamento.

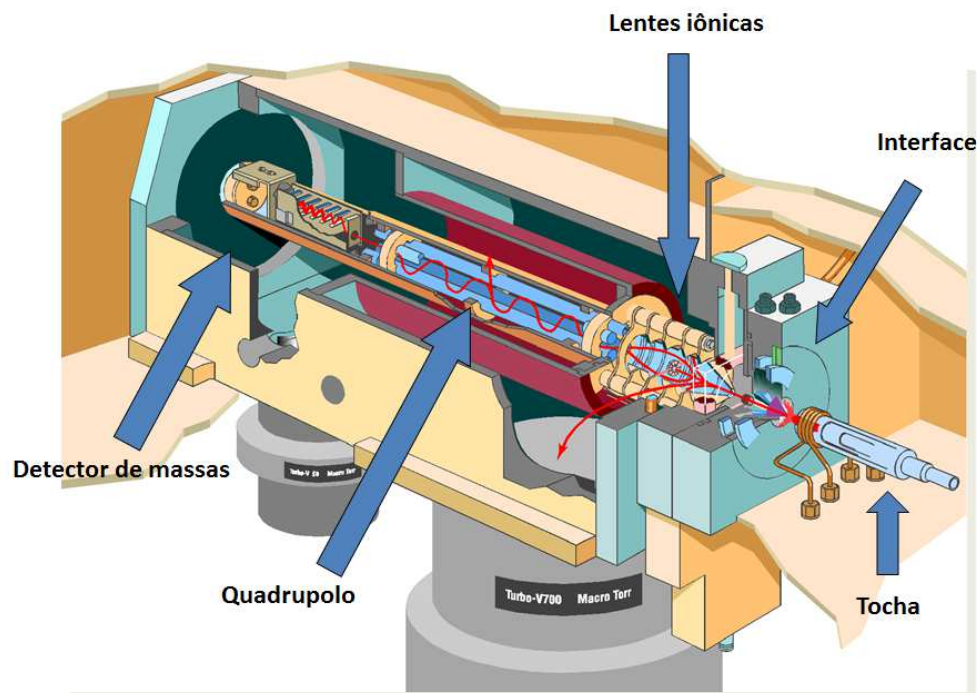


Figura 2.2. Principais componentes do ICP-MS. Adaptado de www.ufscar.br/dq-gaia/images_2007/aula1811ICP-MS.ppt (cortesia Varian Inc) - acesso em 05/01/2012.

Os íons gerados na tocha passam por uma interface composta por dois cones metálicos (cone de amostragem e o “skimmer”). Essa interface é crítica em ICP-MS uma vez que a tocha encontra-se à pressão ambiente e o espectrômetro opera à vácuo. Nesses cones existem pequenos orifícios no centro para permitir a passagem dos íons para o interior do equipamento.

No modelo utilizado no desenvolvimento desse trabalho, além dos cones exercerem esse papel de interface, eles possibilitam a inserção de gases colisionais ou reacionais (hidrogênio e ou hélio) para remoção de possíveis interferentes isobáricos que podem ter sido gerados até o momento, dando uma concepção diferenciada na interface, sendo conhecida como interface de reação e colisão (*Collision Reaction Interface – CRI*). Segundo o fabricante, esse novo arranjo possibilita promover processos colisionais e reacionais em um ambiente que ainda contém a alta densidade eletrônica e elevada temperatura, típicas do plasma. PEREIRA *et al.* (2010) discutem esse e outros fatores em um estudo para remoção de interferentes nas determinações de As e Se e constataram que a inserção dos

gases no “skimmer” é essencial. Em outros equipamentos a inserção de gases para remoção dos interferentes é realizada em uma câmara contendo um quadrupolo, hexapolo ou octapolo, podendo ser aplicado outros gases além de H₂ e He (BANDURA et al., 2001). Esses arranjos foram amplamente discutidos (TANNER et al., 2002; KOPPENAAL e EIDEN, 2004).

Além dessa diferença, no equipamento utilizado, a saída do “skimmer” e a entrada do espectrômetro de massa analisador estão configuradas em um ângulo de 90°. Os íons que emergem do “skimmer” são transferidos para a entrada do espectrômetro por um campo eletrostático parabólico gerado por uma lente iônica circular. A figura 2.3. ilustra essa proposta de interface.

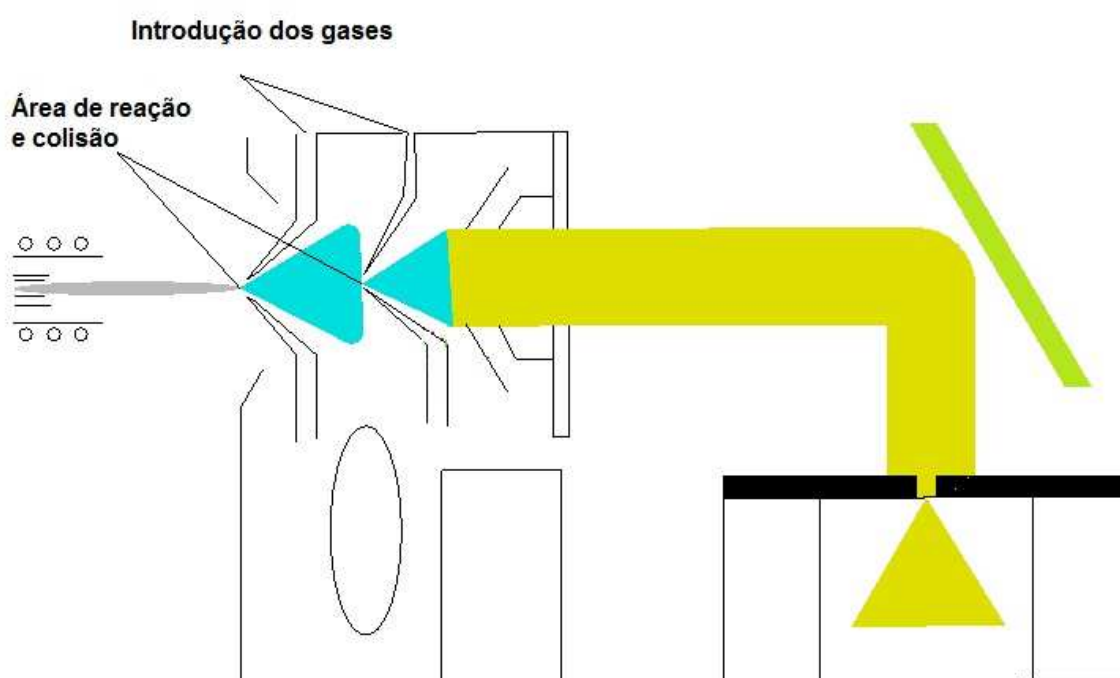


Figura 2.3. Esquema da interface em 90° C do ICP-MS Varian 820-MS.

Soluções ácidas extremamente corrosivas podem danificar os componentes da interface do ICP-MS, incluindo os cones e a interface de amostra, ou requerem o uso de materiais especiais, como Pt. Comparando com espectrometria de emissão óptica ou outras técnicas não baseadas em espectrometria de massa, este fato tem sido considerado como limitação inerente do emprego da técnica.

Além dos parâmetros de operação do plasma e da interface, a composição da amostra e os reagentes utilizados durante a etapa de digestão também influenciam os processos de geração de íons moleculares (VAUGHAN e HORLICK, 1986). TAN E HORLICK (1986) avaliaram os efeitos causados pelos HCl, HNO₃ e H₂SO₄ sobre os sinais de fundo dos espectros de massas em ICP-MS. Esse trabalho tem importantes implicações considerando-se o estabelecimento de estratégias de preparo de amostras visando determinações por ICP-MS, ficando evidente que idealmente deveria se utilizar apenas HNO₃ ou uma mistura composta por HNO₃ e H₂O₂. Atualmente, a digestão eficiente da maioria dos tipos de amostras orgânicas pode ser efetuada usando essa mistura de reagentes em frascos fechados com aquecimento assistido por radiação micro-ondas (KINGSTON e HASWELL, 1997).

Considerando-se a formação de íons moleculares, a determinação de vários isótopos pode ser criticamente limitada, principalmente se forem considerados equipamentos com baixa resolução, i.e. ICP-MS baseado em quadrupolo (Q-ICP-MS), como o utilizado nesse trabalho. Como exemplo de interferências que podem ocorrer, o ⁵¹V (99,76% de abundância natural), pode ser erroneamente determinado em função das interferências causadas pelo ³⁵Cl¹⁶O⁺ e pelo ³⁷Cl¹⁴N⁺; o ⁵²Cr⁺ (83,76%) pode sofrer interferências devido ao ⁴⁰Ar¹²C⁺, ³⁵Cl¹⁶O¹H⁺ e ao ³⁶S¹⁶O⁺, o ⁵⁶Fe⁺ (91,66%), sofre interferências do ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ e do ⁴⁰Ca¹⁶O⁺, etc.

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar essas interferências, entre as quais a seleção de outro isótopo para execução da medida (quando o elemento não for monoisotópico) ou por correção matemática dos sinais gerados para o branco e para a amostra (KRUSHEVSKA *et al.*, 1998). Alternativas propostas para eliminação dessas interferências em Q-ICP-MS são o plasma frio (“*cool plasma*”) e as interfaces com câmara dinâmica de reações ou colisões.

Após passagem pela interface, os íons são direcionados para o analisador de massas (no equipamento utilizado um quadrupolo); nessa etapa visa-se a remoção dos íons que não serão determinados; através de ação de campos eletromagnéticos somente o íon com a razão m/z selecionada é conduzido para o detector onde será realizada a quantificação.

2.3. Quimiometria e rastreabilidade.

O resultado gerado das determinações geralmente é utilizado para uma decisão em relação à problemática inicial. Quando o volume de dados gerados é expressivo e existem diversas variáveis que podem influenciar no sistema, a quimiometria surge como ferramenta que contribui para interpretação dos dados.

A quimiometria trata-se da utilização de estatística multivariada no estudo dos fenômenos químicos, sendo um termo introduzido por Swede Svante Wold e Bruce R. Kowalski em 1972.

As ferramentas quimiométricas têm sido usadas na química analítica para maximizar informações obtidas em uma análise. Elas podem ser empregadas desde o planejamento dos experimentos, visando a diminuição e direcionamento dos mesmos, até a análise dos dados, através das correlações entre os resultados obtidos.

Nesse sentido, muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se pode avaliar muitas variáveis simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. A conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas se constituem no momento na melhor alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema.

Entre os tratamentos realizados, a análise de componentes principal - PCA (*Principal Components Analysis*) e análise hierárquica de agrupamentos - HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) geralmente são empregadas para se ter uma análise inicial do conjunto de dados. PCA é usada para representar todas as variáveis estudadas em um número pequeno de dimensões, usualmente duas ou três, através de cálculos de combinação linear. HCA interconecta as amostras por suas similaridades, produzindo um dendograma, onde as amostras são agrupadas de acordo com as variáveis pré-selecionadas.

Levando em consideração o tema rastreabilidade, muitas vezes isótopos estáveis e as suas razões ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$, $^{86}\text{Sr}/^{87}\text{Sr}$) podem ser

um indicativo para as análises de origem geográfica de produtos como carne de cordeiro (CAMIN *et al.* (2007)), aspargos (SWOBODA *et al.*, 2008), entre outros. HEUMANN & VANHAECKE (2008) ressaltaram que o ICP-MS tem um importante papel nos estudos com isótopos, que podem trazer informações relevantes sobre as amostras.

CAMIN *et al.* (2007), estudaram a razão isotópica de H, C, N e S em amostras de carne de cordeiros de diferentes regiões da Europa. O estudo mostrou diferença significativa na composição das carnes, sendo que os isótopos de C e N foram influenciados pela alimentação dos animais e pelo clima e os isótopos de S foram correlacionados com a origem geográfica, de acordo com as análises de componentes principais realizadas pelos autores.

BAHAR *et al.* (2010), realizaram um estudo monitorando as razões isotópicas em amostras de carne orgânica selecionadas de duas redes de supermercados e de dois açougues certificados para esse tipo de carne. Amostras de carne convencional também foram selecionadas no estudo. Porém eles perceberam que efeitos relacionados à sazonalidade afetaram nas análises isotópicas das carnes do estudo.

Outras aplicações com diversas matrizes, também podem ser encontradas na literatura, GÜNTHER-LEOPOLD *et al.* (2008) realizaram a caracterização de combustíveis nucleares empregando ICP-MS e quimiometria. Os autores ressaltam a importância dos baixos limites de detecção da técnica e que isso contribuiu nas análises da composição isotópica; também é utilizado no trabalho análises de cromatografia líquida de alta eficiência e estudos com ablação laser. Existe diferença entre as concentrações dos óxidos de lantanídeos e na razão isotópica de Sr e Rb. Os resultados mostraram que a técnica espectroscópica é importante para a caracterização de materiais radioativos.

A razão isotópica de Sr também foi utilizada em análises quimiométricas de espargos da Hungria e da Eslováquia (SWOBODA *et al.*, 2008). As amostras mostraram uma separação bastante clara, o que evidencia a diferença entre as mesmas. Nesse mesmo estudo também foram incluídas amostras do Peru, Holanda e Alemanha, mas em um número limitado se comparada a dos países

principais, sendo que existem similaridades entre as amostras de aspargos alemães e holandesa.

Já a razão isotópica de Zn é relatada como um importante parâmetro em biogeociência, uma vez que ocorre variação natural na composição desse elemento em amostras geológicas e biológicas (CLOQUER *et al.*, 2008).

Além da rastreabilidade empregando medidas de razão isotópica existem outras possibilidades para tentar caracterizar as amostras, como por exemplo o teor total dos elementos químicos. BENICASA *et al.*, (2007) realizaram um estudo com amostras de azeite de oliva da Itália após determinação dos teores totais de 18 elementos químicos empregando ICP-MS. As amostras ficaram agrupadas em 8 conjuntos diferentes, sendo possível a construção de um modelo quimiométrico empregando análise linear discriminante para prever a origem geográfica do azeite, sendo os teores de As, Ca, Fe, Na e Sr os principais responsáveis pela separação.

FABANI *et al.*, (2010) realizaram um estudo empregando quimiometria e teores totais de Ca, Cr, Fe, K, Mg, Mn e Zn na identificação da origem de 31 amostras de vinhos argentinos. Também foram realizadas análises do solo e a combinação com a quimiometria foi relatada como uma poderosa ferramenta na identificação da origem, demonstrando uma clara separação das regiões nas análises de componentes principais.

GONZALVEZ *et al.* (2011) estudaram a origem geográfica de arroz baseada na composição elemento químico, para tanto selecionaram 107 amostras para a construção de um modelo quimiométrico de análise discriminante linear e utilizam 46 amostras para fazerem a validação. Na construção do modelo foram determinadas as concentrações totais de 32 analitos empregando ICP OES. Os lantanídeos, Cd e Co foram os principais responsáveis pela separação dos grupos de acordo com a região geográfica.

Outras estratégias também podem ser realizadas em estudos que visam correlacionar dados obtidos com as variáveis analisadas. Empregando características sensoriais, perfil de ácidos graxos e triacilglicerol, OLLIVIER *et al.*, (2006) montaram um modelo quimiométrico para diferenciar a origem de azeites franceses, sendo possível observar a separação dos azeites de acordo com a região

em que amostra foi produzida. Em outro trabalho, é apresentada uma revisão de métodos analíticos juntamente com ferramentas quimiométricas para a determinação da qualidade e identidade de produtos lácteos é apresentada por KAROUI & BAERDEMAEKER (2007). No trabalho é discutido o potencial de técnicas destrutivas e não destrutivas (técnicas espectroscópicas, infravermelho, ressonância magnética nuclear) para o controle da qualidade. Eles discutem que no processo de fabricação existem aspectos relacionados a culturas locais e regionais e que isso afeta as propriedades o que torna possível o monitoramento regional.

Em outro trabalho (LEBEQUE *et al.*, 2001) realizaram um estudo com 25 tipos de queijos através de análise sensorial. Nesse estudo foram selecionados 8 atributos para o painel sensorial em que os indivíduos deveriam dar nota de 0 – 9. Aplicando-se análise de PCA aos dados obtidos do painel sensorial, os autores puderam observar a formação de 5 grupos distintos de acordo com as informações levantadas, tais como umidade e elasticidade e concluíram que existiam diferenças significativas entre os grupos.

COZZOLINO *et al.*, (2008) empregaram análise de teores totais de 9 elementos químicos e espectroscopia por infravermelho próximo (NIR, “*near infrared*”) para construção de um modelo de calibração com o método mais usado em calibração multivariada, o PLS (regressão em mínimos quadrados parciais) para estudar possíveis correlações entre os teores dos elementos químicos e os espectros de NIR. Concluíram ser necessário maiores desenvolvimentos para deixarem a metodologia mais robusta.

A quimiometria possibilita uma análise geral dos dados contribuindo com informações que podem ser úteis na tomada das decisões referente ao estudo realizado, maximizando informações de maneira a facilitar a visualização, interpretação e compreensão dos dados, o que faz dela uma ferramenta importante para interpretação e análise dos dados.

Objetivos

3. Objetivos

O objetivo desta tese de doutorado foi desenvolver uma metodologia para quantificar e avaliar a presença de contaminantes inorgânicos e elementos essenciais em carne bovina de diferentes grupos genéticos, tipos de confinamento, safras e regiões brasileiras, com ênfase ao grupo genético Nelore da Embrapa Pecuária Sudeste e da Embrapa Gado de Corte; visando propor um modelo quimiométrico para a rastreabilidade de carne e identificar associações do perfil elemento químico em relação às características organolépticas.

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Soluções e reagentes

Durante a realização deste trabalho de doutorado foram utilizadas as soluções e reagentes descritos a seguir:

Água – água destilada e desionizada foram empregadas para o preparo de todas as soluções e diluições utilizadas (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) $((\text{CH}_3)_4\text{NOH})$ – da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) comercializado em meio aquoso foi utilizado na otimização dos processos de extração alcalina.

Triton X-100[®] $(\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n)$ – da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) foi utilizado como surfactante para manter a homogeneidade das amostras após as extrações alcalinas.

CFAC – da marca Spectrasol (Warwick, EUA) foi utilizada para o preparo de soluções de aminas terciárias na otimização dos processos de extração alcalina.

Ácido Clorídrico 37% (v/v) (HCl) – ácido da marca Merk (Rio de Janeiro, RJ) foi utilizado nos processos de extração. Esse ácido foi empregado após ser destilado com temperatura abaixo do ponto de ebulição.

Ácido Nítrico 65% (v/v) (HNO_3) – ácido concentrado da marca Synth (Diadema, SP) foi utilizado nos processos de extração e digestão das amostras, assim como para ajustar o pH das curvas analíticas de calibração. Esse ácido foi empregado após ser destilado com temperatura abaixo do ponto de ebulição.

Peróxido de Hidrogênio 30% (m/v) (H_2O_2) – o peróxido da marca LabSynth (Diadema, SP) foi utilizado nas extrações e decomposições.

Dihidrogenoftalato de Potássio $(\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K})$ – sais desse padrão primário não higroscópico da Nuclear (São Paulo, SP) foram empregados como composto orgânico padrão. Soluções de carbono de $100 - 20000 \text{ mg L}^{-1}$ foram utilizadas como

padrão de calibração para ICP OES, técnica empregada para determinação do teor de carbono em solução (GOUVEIA *et al.*, 2001).

Soluções padrão de referência – foram utilizadas na quantificação de metais por ICP OES e ICP-MS. Solução estoque com concentração de 1000 mg L⁻¹ da TecLab (Jundiaí, Brasil), foi diluída com solução de HNO₃ 1% (v/v), produzindo curvas analíticas de calibração adequadas à quantificação. Os padrões com concentrações na grandeza de µg L⁻¹ eram preparados no dia de sua utilização (Marconi, Piracicaba, SP).

4.2. Amostras

Nesse trabalho foram utilizadas 650 amostras de *Longissimus dorsi* (contra-filé) de animais provenientes de diferentes unidades da EMBRAPA: Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, São Paulo; Embrapa Gado de Corte, localizada em Campo Grande, Mato Grosso do Sul; Embrapa Meio-norte, localizada em Teresina, Piauí; e Embrapa Amazônia Oriental, localizada em Belém, Pará. Alguns dos gados tiveram o ciclo de vida completo dentro das unidades das Embrapa; outros cresceram em fazendas colaboradoras e tiveram a terminação nas Unidades de pesquisa. As amostras foram fornecidas pelo laboratório de carne da Embrapa Pecuária Sudeste

As amostras são de diferentes grupos genéticos como Nelore, Canchim, Pé-duro, Cruzados (representados pelo conjunto: AX, CX, LX, BX, WX – onde a primeira letra correspondente ao grupo genético do pai e o X é atribuído às características da mãe, sendo que as letras correspondem: A = Angus, C = Canchim, L = Limousain, B = Bonsmara, W = Wagyo e X = ½ angus ½ nelore ou ½ senepol ½ nelore).

As amostras de Nelore possuem uma maior gama de informações pois estão dentro de um projeto Macroprograma 1, que está inserido na rede “Bife de Qualidade”, financiado pela Embrapa no qual está sendo desenvolvida uma população da raça Nelore, onde estão sendo avaliadas medidas relacionadas à eficiência alimentar, produção e qualidade da carne (incluindo maciez de carne) e

perfil elemento químico, que faz parte do plano de ação do projeto. Esse conjunto de informações será utilizado em estudos quantitativos e moleculares, visando a recomendação de critérios de seleção para melhoramento da raça. Portanto, parte dos estudos foi voltada especificamente para as amostras de Nelore de São Carlos e de Campo Grande.

Também foram utilizadas amostras de referência certificada de fígado bovino (Bovine Liver NIST 1577b, National Institute of Standards and Technology, EUA) e músculo bovino (Bovine Muscle NIST 8414, National Institute of Standards and Technology, EUA) para validação e desenvolvimento da metodologia.

4.3. Instrumentação

4.3.1. ICP OES

Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) com visão radial (Vista RL, Varian, Mulgrave, Austrália) foi utilizado nas determinações de carbono residual e dos macronutrientes. Na Tabela 4.1 são listados os parâmetros instrumentais utilizados para as determinações.

Tabela 4.1. Parâmetros operacionais do ICP OES empregado nas determinações do perfil dos elementos químicos.

| Parâmetros instrumentais | ICP OES |
|---|---------------------------|
| Visão | Radial |
| Sistema Óptico | Echelle |
| Detector | Sólido CCD (167 – 785 nm) |
| Potência (kW) | 1,2 |
| Vazão gás auxiliar (mL min ⁻¹) | 1,5 |
| Vazão gás nebulização (mL min ⁻¹) | 0,7 |
| Câmara de nebulização | Sturman-Masters |
| Nebulizador | Ranhura em V |
| Altura de observação | 8 mm |
| Linhas espectrais (nm) | |

| | |
|----|---------|
| C | 193,027 |
| K | 769,897 |
| Mg | 279,553 |
| Ca | 396,847 |
| Na | 589,592 |
| P | 213,618 |
| S | 181,972 |

4.3.2. ICP-MS

Foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS) com visão axial (820-MS, Varian, Melbourne, Austrália) equipado com amostrador automático SP3, com nebulizador Seaspray e câmara de nebulização do tipo Scott. As condições de operação do equipamento encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros operacionais do ICP-MS empregado nas determinações do perfil dos elementos químicos.

| Parâmetros instrumentais | ICP-MS |
|--|---|
| Gerador de rádio-frequência (MHz) | 27 |
| Potência de rádio-frequência (kW) | 1,40 |
| Fluxo do plasma (L min ⁻¹) | 18,0 |
| Fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹) | 1,80 |
| Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹) | 1,0 |
| Fluxo do "sheat gas" (L min ⁻¹) | 0,18 |
| Fluxo de H ₂ na CRI (mL min ⁻¹) | 60 |
| Material dos cones de amostragem e "skimmer" | Ni |
| Modo de escaneamento | Peak Hopping (quantificação) "full mass scan" (espectros de fundo) |
| Dwell time (μs) | 10000 |

4.3.3. Demais instrumentos utilizados

Além do ICP OES e do ICP-MS, também foram utilizados para desenvolvimento desse trabalho de doutorado os instrumentos a seguir:

- Sistema para destilação de ácido em sub-destilação (Marconi, Brasil).
- Liofilizador (E-Savant, modelo Micromodulo, EUA), equipado com bomba Savant VLP 80 foi utilizado para liofilizar as amostras.
- Moinho criogênico para moagem das amostras com minimização das possibilidades de contaminação (IKA, modelo A11 basic, EUA).
- Banho Dubnoff - aquecimento com controle de temperatura e agitação (Novatécnica NT 232, Brasil).
- Forno de micro-ondas (Ethos 1, Millestone, EUA), equipado com rotor de 41 frascos de decomposição e sensor de temperatura.

4.4. Procedimento experimental

À medida que as amostras eram recebidas pelo laboratório de carne da EMBRAPA Pecuária Sudeste, as mesmas eram liofilizadas e moídas em moinho criogênico visando minimizar a possibilidade de contaminação. Em seguida eram armazenadas à vácuo em sacos plásticos e estocadas em freezer a – 80° C.

Foi realizada otimização para três tipos de preparo de amostras: extração alcalina, extração ácida e decomposição empregando micro-ondas com amostra de fígado bovino certificada (NIST 1577b). Após avaliar as metodologias, foi escolhido a que apresentou melhores resultados de recuperação dos elementos químicos e uma maior variedade de macro, micro e contaminantes inorgânicos recuperados.

4.4.1. Extração alcalina

Para testes iniciais foram adotados os reagentes CFAC e TMAH em meio aquoso. A metodologia empregando CFAC foi baseada na proposta por SANTOS *et al.*, (2002) e NÓBREGA *et al.*, (1997); porém nos trabalhos originais os autores empregaram amostras líquidas - leite, não sendo obtidos resultados satisfatórios no presente trabalho. Desta forma, optou-se por prosseguir a otimização apenas com TMAH.

Foram realizados testes univariados visando estudar a acidez do meio após a extração alcalina com TMAH baseado na proposta de BATISTA *et al.* (2009).

Para a otimização da extração alcalina empregando TMAH, foi montado um planejamento experimental 2^4 completo com um total de 16 experimentos para avaliar as melhores condições experimentais. Nesse planejamento foram consideradas as variáveis: massa de amostra, volume e concentração de TMAH e tempo de extração. A tabela 4.3 ilustra os valores mínimos (normalizados em -1) e máximos (+1) adotados nesse planejamento.

Tabela 4.3. Variáveis e níveis máximos e mínimos empregados no planejamento experimental da extração alcalina.

| Variável | (-1) | (+1) |
|--------------------------|------|------|
| Massa de amostra (mg) | 50 | 100 |
| Volume de TMAH (mL) | 1 | 2 |
| Concentração de TMAH (%) | 25 | 50 |
| Tempo (h) | 6 | 24 |

A amostra certificada era inserida em um tubo de polipropileno e o reagente era adicionado de acordo com o experimento proposto. A tabela 4.4 ilustra a possibilidade dos 16 experimentos.

Tabela 4.4. Planejamento experimental desenvolvido em amostra certificada de fígado bovino (SRM 1557-b) para otimização da extração alcalina.

| Experimento | Massa de amostra | Volume TMAH | Concentração de TMAH | Tempo |
|-------------|------------------|-------------|----------------------|-------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | +1 |
| 3 | -1 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | -1 | -1 | +1 | +1 |
| 5 | -1 | +1 | -1 | -1 |
| 6 | -1 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 |
| 8 | -1 | +1 | +1 | +1 |
| 9 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 |
| 11 | +1 | -1 | +1 | -1 |
| 12 | +1 | -1 | +1 | +1 |
| 13 | +1 | +1 | -1 | -1 |
| 14 | +1 | +1 | -1 | +1 |
| 15 | +1 | +1 | +1 | -1 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 |

O volume era ajustado para 10 mL com solução Triton X-100 (0,01% v/v) e HNO₃ (1,0% v/v). As amostras foram analisadas em ICP OES e ICP-MS, sendo que no ICP OES foram monitoradas duas linhas espectrais de cada analito e no ICP-MS foram escolhidos os isótopos mais abundantes e avaliada a necessidade de adição de H₂ ou He na CRI. As melhores condições foram estabelecidas baseadas na porcentagem de recuperação dos analitos de acordo com os valores que constam no certificado, sendo que a curva de calibração era realizada com compatibilização de matriz. Foram realizadas análises em ICP-MS no modo “full mass scan” da massa 2,49 até 256,847 com incrementos de massa de 0,025 u.m.a e quantificações dos analitos que foram possíveis de se recuperar com a metodologia desenvolvida nessas amostras.

4.4.2. Extração ácida

Para otimização da extração ácida foram selecionados HNO_3 (que apresenta alto poder oxidante) e HCl ; nesse processo também foi avaliada a necessidade de agitação e aquecimento dos tubos de polipropileno onde a extração era realizada. Isso foi possível devido a um banho de aquecimento com agitação disponível no centro de pesquisa, o qual foi adaptado para realizar a extração de até 60 amostras por batelada.

Além desses parâmetros, foram avaliadas a massa de amostra, o volume e a concentração do ácido e o tempo de extração, sendo montado um planejamento experimental fracionado 2^{7-3} num total de 16 experimentos. A tabela 4.5 ilustra os valores mínimos e máximos adotados das 7 variáveis dos experimentos.

Tabela 4.5. Variáveis e valores mínimos e máximos empregado no planejamento experimental da extração ácida.

| Variável | (-1) | (+1) |
|---|--------------|----------------|
| Massa de amostra (mg) | 100 | 200 |
| Tipo de ácido | HCl | HNO_3 |
| Volume de ácido (mL) | 5,0 | 10,0 |
| Concentração do ácido (mol L^{-1}) | 0,1 | 1,0 |
| Agitação | Sem | Com |
| Aquecimento | Sem | Com |
| Tempo (min) | 30 | 60 |

A tabela 4.6 apresenta os 16 experimentos que foram realizados na otimização da extração; após o procedimento de extração, se necessário o volume era ajustado para 10 mL.

Tabela 4.6. Planejamento experimental desenvolvido em amostra certificada de fígado bovino (SRM 1557-b) para otimização da extração ácida.

| Exp | Massa | Tipo de ácido | Volume ácido | Concentração do ácido | Tempo | Agitação | Aquec. |
|-----|-------|---------------|--------------|-----------------------|-------|----------|--------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Após a realização dos 16 experimentos, esses foram analisados em ICP OES. Com base nos resultados obtidos foi adotada a melhor condição para que fossem feitas as análises por ICP-MS.

Para otimização da metodologia de quantificação por ICP-MS foram avaliados a necessidade da utilização da CRI e os principais isótopos dos analitos de interesse. As curvas de calibração foram preparadas compatibilizando matriz. Foram realizadas análises no modo “*full mass scan*”, similar ao descrito anteriormente.

4.4.3. Digestão empregando forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos

Durante o desenvolvimento foi adquirido um forno micro-ondas com rotor que acomodava simultaneamente 41 frascos, fato que aumentou a frequência analítica do preparo. Baseado no manual do fabricante e desenvolvimentos de trabalho dentro da unidade de pesquisa (otimização multivariada para digestão de plantas forrageiras – realizado em conjunto com funcionária do centro de pesquisa) foram feitos experimentos univariados em amostras de contra-filé comercial buscando diminuir o volume de ácido recomendado pelo fabricante e identificar uma metodologia em que fosse possível eliminar a gordura que permanecia após os processos de digestão. Após a otimização da metodologia, a mesma foi aplicada a amostra de fígado certificado, sendo realizadas as avaliações das quantificações empregando ICP OES e das condições ideais para as determinações por ICP-MS.

Nessa etapa de otimização empregando ICP-MS, baseado no artigo de SALAZAR *et al*, (2011), iniciou-se o emprego de padrão interno para tentar melhorar as quantificações dos elementos presentes em menores concentrações, quais sejam os micronutrientes, tais como Mn, Cu, Co e Mo e os contaminantes tais como As, Cd e Pb. Foram avaliadas a adição de padrão interno (Sc, Y e Bi) após os procedimentos de digestão, na concentração final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. As amostras tinham o volume ajustado para 30 mL e em seguida eram realizadas as determinações.

O procedimento foi otimizado para uma massa de 100 mg com a adição de 2 mL de HNO_3 , 2 mL de H_2O_2 e 6 mL de H_2O para que se atingisse 10 mL que é o volume mínimo de operação do frasco para esse tipo de rotor. A tabela 4.7 apresenta o programa de micro-ondas que ficou estabelecido para as digestões.

Tabela 4.7. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos.

| Etapa | Tempo (min) | Potência (W) | T (°C) | Pressão (bar) |
|-------|-------------|--------------|--------|---------------|
| 1 | 10 | 1300 | 120 | 20 |
| 2 | 15 | 1500 | 170 | 20 |
| 3 | 35 | 1500 | 170 | 20 |

Após a digestão era adicionado os padrões interno Sc, Y e Bi (concentração final $10 \mu\text{g L}^{-1}$) e o volume ajustado para 30 mL para futuras quantificações.

As análises do teor de carbono residual da amostra foram realizadas com base no procedimento descrito por GOUVEIA *et al.*, (2001) empregando biftalato de potássio como padrão para o carbono e o comprimento de onda 193,027 nm para as quantificações por ICP OES.

Após realizada a avaliação das 3 metodologias (extração alcalina, ácida e digestão), o procedimento empregando micro-ondas com 41 frascos foi adotado como padrão e aplicado às 650 amostras disponíveis para análise. Inicialmente, foram realizadas análises em ICP-MS no modo “*full mass scan*”, conforme descrito anteriormente. Os analitos foram quantificados empregando ICP OES e ICP-MS. Além disso, foi proposta a utilização de uma planilha com 250 comprimentos de onda para realizar varreduras espectrais das amostras por ICP OES.

4.4.4. Espectros empregando ICP OES

Após desenvolvimento da metodologia de quantificação dos macroelementos químicos em ICP OES foi montado uma planilha com 250 linhas espectrais para obtenção de espectros por ICP OES. Nessa planilha foi incluída pelo menos uma linha de cada elemento que o equipamento permite analisar; as demais linhas foram escolhidas de forma que fosse possível montar um espectro que

cobrisse a região de 167 a 770 nm e considerando-se os valores de intensidade das linhas espectrais. A tabela 4.8 apresenta os elementos monitorados e o respectivo comprimento de onda. Para a realização dos espectros monitorava-se as intensidades dos sinais dos comprimentos de onda descrito na tabela para cada uma das amostras.

Tabela 4.8. Analito e respectivos comprimentos de onda (nm) utilizados para construção dos espectros empregando ICP OES visando a construção do modelo estatístico.

| Elemento | Comprimento de onda (nm) | | | | | | | | |
|----------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| Ag | 233,137 | 241,318 | 328,068 | 338,289 | | | | | |
| Al | 167,019 | 237,312 | 257,509 | 309,271 | 396,152 | | | | |
| Ar | 415,859 | 433,356 | 549,587 | 565,070 | 641,631 | 645,918 | 675,283 | 703,025 | |
| | 735,328 | 743,533 | | | | | | | |
| As | 188,980 | 193,696 | 197,198 | | | | | | |
| Au | 201,202 | 235,265 | | | | | | | |
| B | 182,577 | 249,678 | 249,772 | | | | | | |
| Ba | 233,527 | 455,403 | 493,408 | 585,367 | | | | | |
| Be | 313,042 | | | | | | | | |
| Bi | 195,406 | 222,821 | 223,061 | 306,771 | | | | | |
| Br | 447,261 | 457,574 | 635,073 | 663,162 | | | | | |
| C | 193,027 | 247,856 | | | | | | | |
| Ca | 211,276 | 393,366 | 396,847 | 422,673 | | | | | |
| Cd | 214,439 | 226,502 | 228,802 | 361,051 | | | | | |
| Ce | 385,432 | 391,274 | 395,253 | 401,239 | 413,380 | | | | |
| Cl | 741,412 | 771,758 | | | | | | | |
| Co | 228,615 | 230,786 | 238,892 | | | | | | |
| Cr | 205,560 | 206,158 | 267,716 | 285,567 | 357,868 | | | | |
| Cs | 697,327 | | | | | | | | |
| Cu | 213,598 | 223,009 | 324,754 | 327,395 | | | | | |
| Dy | 345,432 | 353,171 | 389,853 | 393,468 | | | | | |
| Er | 331,243 | 383,048 | | | | | | | |
| Eu | 737,022 | | | | | | | | |
| Fe | 234,350 | 238,204 | 259,837 | 259,940 | 263,105 | 373,713 | | | |

| | | | | | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ga | 229,417 | 287,423 | 417,204 | | | | | |
| Gd | 301,013 | 303,284 | | | | | | |
| Ge | 208,426 | | | | | | | |
| H | 434,047 | 486,133 | | | | | | |
| Hf | 264,141 | | | | | | | |
| Hg | 265,204 | 313,184 | 315,184 | 365,016 | | | | |
| Ho | 341,644 | 347,425 | 351,559 | | | | | |
| In | 230,606 | 271,027 | 283,690 | 293,263 | 303,936 | 325,609 | | |
| Ir | 205,116 | 269,423 | | | | | | |
| K | 404,721 | 766,491 | 769,897 | | | | | |
| La | 333,749 | 375,908 | 387,164 | 399,575 | 407,734 | 419,655 | 423,837 | 489,992 |
| Li | 460,289 | 610,365 | 670,783 | | | | | |
| Lu | 547,668 | | | | | | | |
| Mg | 279,553 | 280,270 | 285,213 | 299,199 | 305,299 | | | |
| Mn | 257,610 | 259,372 | 260,568 | 279,482 | | | | |
| Mo | 202,032 | 203,846 | 204,598 | 281,615 | 289,099 | 291,191 | 379,825 | |
| N | 174,213 | 174,465 | | | | | | |
| Na | 568,821 | 588,995 | 589,592 | | | | | |
| Nb | 295,088 | | | | | | | |
| Nd | 397,326 | 334,156 | | | | | | |
| Ni | 216,555 | 221,648 | 227,021 | 231,604 | | | | |
| O | 543,576 | 591,063 | 615,820 | | | | | |
| Os | 225,585 | | | | | | | |
| P | 177,434 | 178,222 | 213,618 | 253,561 | | | | |
| Pb | 182,143 | 217,000 | 220,353 | 239,379 | 261,417 | | | |
| Pd | 229,651 | 340,458 | 355,308 | 360,955 | | | | |
| Pr | 381,602 | 405,653 | 411,846 | | | | | |
| Pt | 203,646 | 273,396 | | | | | | |
| Rb | 727,999 | | | | | | | |
| Re | 227,525 | | | | | | | |
| Rh | 245,892 | 249,078 | 339,682 | 343,488 | 369,236 | | | |
| Ru | 267,876 | 349,894 | | | | | | |
| S | 180,669 | 181,972 | 182,562 | 189,965 | 191,406 | | | |
| Sb | 187,052 | 206,834 | 217,582 | 231,146 | | | | |

| | | | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Sc | 255,235 | 335,372 | 359,047 | 361,383 | 363,074 | 431,408 |
| Se | 185,457 | 196,026 | 199,446 | 203,985 | | |
| Si | 221,667 | 250,690 | 251,611 | 288,158 | | |
| Sm | 425,639 | 443,432 | | | | |
| Sn | 215,152 | 219,935 | | | | |
| Sr | 216,596 | 243,160 | 407,771 | 421,552 | | |
| Ta | 268,517 | | | | | |
| Tb | 329,307 | 367,636 | | | | |
| Te | 182,150 | 214,282 | 225,903 | 238,579 | | |
| Th | 269,242 | 274,716 | 401,913 | | | |
| Ti | 323,658 | 325,291 | 337,280 | | | |
| Tl | 190,794 | 276,789 | 351,923 | 377,572 | | |
| Tm | 317,282 | | | | | |
| U | 409,013 | | | | | |
| V | 292,401 | 309,310 | 311,070 | 311,837 | 319,068 | |
| W | 207,912 | | | | | |
| Y | 321,668 | 360,074 | 371,029 | 377,433 | 437,494 | |
| Yb | 297,056 | | | | | |
| Zn | 202,548 | 206,200 | 207,908 | 213,857 | 277,085 | |
| Zr | 343,823 | | | | | |

Após a otimização da metodologia para o preparo de amostra ficou estabelecido que as amostras fossem digeridas em forno micro-ondas e analisadas por ICP OES e ICP-MS.

4.5. Tratamento dos dados

Os dados obtidos no trabalho foram tratados empregando planilhas do Excel e Origin.

O programa Pirouette versão 4,0 foi utilizado para as análises de PCA que foram aplicadas à matriz de dados geradas por três procedimentos diferentes: (i) determinações dos elementos químicos, (ii) contagens correspondentes aos

espectros de massa obtidos no modo “*full mass scan*” e (iii) valores de intensidade obtidos pela varredura por ICP OES. Nas PCA's os dados foram auto-escalados quando tratavam-se de concentrações e centrados na média quando se tratavam de espectros.

Além disso, estudos de associação entre elementos químicos e propriedades organolépticas foram realizados para as amostras de Nelore de São Carlos e Campo Grande empregando o programa Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE INC., 2000). Para determinação de quais efeitos ambientais influenciam nos teores dos elementos químicos Ca, K e Na foi feita uma análise de variância utilizando o método PROC GLM do SAS incluindo os efeitos de local de nascimento, local de confinamento, estação de nascimento. A idade do animal no abate foi incluída como covariável. As análises foram realizadas pelo método da máxima verossimilhança restrita utilizando o programa SAS.

Nas análises para avaliar a influência dos elementos químicos sobre a maciez de carne, foi utilizado um modelo com os efeitos fixos de grupo de contemporâneos e genótipos do marcador. A idade do animal na data do abate, o pH, as concentrações de Ca, K e Na foram incluídos como covariáveis, além do efeito aleatório do touro (progenitor). Para formação dos grupos de contemporâneos, foram considerados os efeitos de local e mês de nascimento, local de confinamento e lote de abate. Em seguida foi realizada uma análise dos coeficientes de correlação de Pearson utilizando o método PROC CORR do SAS para os elementos químicos Ca, K e Na.

Resultados e discussão

5. Resultados e discussão

Inicialmente foram avaliados 3 métodos de preparo de amostras: extração alcalina, digestão ácida e digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade com base nos teores de recuperação dos analitos em amostra de fígado bovino certificado (NIST 1577b), sendo considerados exatidão, repetibilidade e a facilidade de operacionalização da metodologia, para ser aplicado nas amostras do presente trabalho.

5.1. Extração alcalina

Foram realizados testes empregando CFA-C e TMAH. Para os experimentos que empregavam CFA-C foram avaliados a massa de amostra, o volume de CFA-C, o valor do pH e o tempo de agitação; contudo, os resultados foram inferiores se comparados ao TMAH, provavelmente devido à complexidade do meio. Por esse motivo, os experimentos tiveram continuidade apenas com a utilização de TMAH.

Baseado no trabalho de BATISTA *et al.*, (2009) aplicando-se a condição adotada pelos autores (75 mg de amostra + 1 mL de TMAH 50%) foram realizados testes com amostras de contra-filé comercial visando aumentar a acidez do meio após o processo de extração. Os volumes eram ajustados para 10 mL com solução Triton X-100 (0,01% v/v), sendo que a concentração do HNO₃ foi variada. Foram avaliados meios ácidos com concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0% (v/v). A figura 5.1 ilustra os testes realizados.

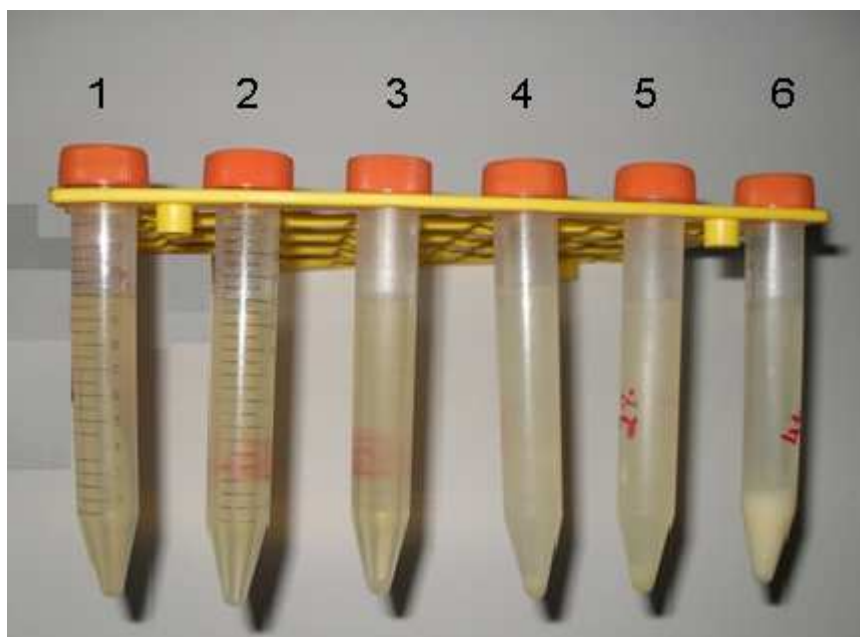


Figura 5.1. Extração alcalina empregando TMAH após ajuste de volume com solução Triton X-100 (0,01%) e variando-se a concentração do HNO_3 : 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0% (v/v), respectivamente.

O pH dos meios após a extração foi monitorado, sendo da esquerda para a direita respectivamente 13,2; 12,6; 12,0; 1,8; 1,5 e 0,8. É possível observar que com o aumento da acidez do meio (com a solução 1,5% - pH = 1,8), ocorre a precipitação das proteínas; esse fato pode dificultar a introdução da amostra, causando entupimento do nebulizador durante a análise por ICP-MS. Dessa forma seria necessária a adição de mais uma etapa durante o preparo, centrifugando a mistura e colhendo o sobrenadante para posterior análise aumentando a manipulação da amostra; além disso, analitos podem estar ligados à fração protéica a recuperação dos mesmos seria afetada. Dessa forma foi estipulado que, após a extração, o volume seria ajustado com solução Triton X-100 (0,01%) e HNO_3 (1,0%).

Foram realizados testes em amostra de material de referência certificado (fígado bovino - SRM NIST 1577b) e posterior quantificação por ICP OES, para verificar a necessidade de agitação e/ou o emprego de ultrassom e aquecimento. A extração foi realizada a partir de 75 mg de amostra com adição de 1 mL de TMAH 50%, sendo feito o ajuste de volume com solução de Triton X-100 (0,01%) e HNO_3 (1,0%). Na tabela 5.1 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 5.1 Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b), após extração empregando 75 mg de amostra + 1 mL de TMAH 50%, 12h de extração (com e sem agitação; ultra-som e aquecimento) e determinação por ICP OES.

| Analito | Recuperações (%) | | Ultra-som (1h) | Aquecimento (80°C) |
|------------|------------------|--------------|----------------|--------------------|
| | Sem agitação | Com agitação | | |
| Ca 396,847 | 96 | 113 | 110 | 128 |
| Cu 324,754 | 93 | 80 | 87 | 131 |
| Fe 238,204 | 73 | 94 | 90 | 106 |
| K 766,491 | 101 | 99 | 98 | 107 |
| Mg 279,553 | 73 | 90 | 89 | 100 |
| Na 588,995 | 107 | 99 | 97 | 108 |
| P 213,618 | 89 | 85 | 83 | 91 |
| Zn 213,857 | 102 | 97 | 95 | 102 |

Os resultados demonstram que a adição de alguma fonte de energia auxiliar (agitação, ultrassom ou aquecimento) melhora a recuperação de Fe e Mg; provavelmente devido ao fato desse elemento estar ligado fortemente à matriz. Para os demais analitos os teores de recuperação quando não utilizada outra fonte energética foram satisfatórios, sendo assim optou-se por não utilizar fonte de energia auxiliar e otimizar as demais condições de extração, aplicando planejamento fatorial.

A tabela 5.2 ilustra os resultados obtidos para o planejamento experimental realizado visando à otimização da metodologia.

Tabela 5.2 Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de material de referência certificado (fígado bovino – SRM NIST 1577b), após experimentos do planejamento experimental realizando determinação por ICP OES.

| Exp | Ca | Cu | Fe | K | Mg | Na | P | Zn |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 396,847 | 324,754 | 238,204 | 766,491 | 279,553 | 588,995 | 213,618 | 213,857 |
| 1 | 100 | 64 | 85 | 98 | 75 | 104 | 81 | 94 |
| 2 | 62 | 64 | 80 | 104 | 87 | 103 | 86 | 97 |
| 3 | 83 | 96 | 94 | 102 | 90 | 102 | 84 | 96 |
| 4 | 48 | 96 | 66 | 99 | 101 | 100 | 84 | 95 |
| 5 | 90 | 84 | 107 | 94 | 98 | 92 | 79 | 90 |
| 6 | 79 | 68 | 93 | 101 | 99 | 101 | 85 | 94 |
| 7 | 52 | 133 | 62 | 99 | 64 | 99 | 84 | 91 |
| 8 | 36 | 83 | 54 | 98 | 93 | 99 | 85 | 92 |
| 9 | 99 | 57 | 81 | 91 | 73 | 108 | 87 | 94 |
| 10 | 76 | 93 | 74 | 104 | 75 | 107 | 87 | 98 |
| 11 | 96 | 93 | 73 | 101 | 73 | 107 | 89 | 102 |
| 12 | 92 | 104 | 75 | 99 | 77 | 108 | 90 | 102 |
| 13 | 107 | 101 | 99 | 99 | 96 | 109 | 88 | 96 |
| 14 | 89 | 102 | 105 | 98 | 92 | 104 | 86 | 91 |
| 15 | 56 | 118 | 97 | 107 | 93 | 103 | 86 | 95 |
| 16 | 40 | 139 | 91 | 103 | 94 | 104 | 86 | 93 |

De maneira geral, os teores de recuperação dos elementos químicos ficaram na faixa de 90 a 110%. É possível observar para os analitos Ca e Fe que os experimentos realizados no tempo de 24 horas apresentaram baixos teores de recuperação se comparados aos de 6 horas; provavelmente eles sofrem hidrólise, fato que prejudica a recuperação desses elementos. O experimento 3, que utiliza 50 mg de amostra + 1 mL de TMAH 50% por 6 horas foi adotado para esse tipo de preparo de amostra. Se comparado ao trabalho de BATISTA *et al.*, (2009) a

diferença entre ambos experimentos está na massa de amostra. O experimento que corresponde ao proposto pelos autores do trabalho no planejamento experimental corresponde ao de número 11. Esse experimento também apresentou resultados de recuperação satisfatórios.

A amostra gerada pelo procedimento de extração 3 foi quantificada em ICP-MS, sendo avaliado, dependendo do analito, um ou mais isótopo e com ou sem adição de gás no “skimmer”. Trabalhos anteriores desenvolvidos dentro do grupo de pesquisa, que mostravam que a adição de gases no “sampler” não minimizava as interferências isobáricas (PEREIRA *et al.*, 2010). A tabela 5.3 mostra a diminuição do sinal do analito Cu^{63} quando utilizado o gás H_2 na CRI. Esse metal sofre interferência do poliatômico $\text{Ar}^{40}\text{Na}^{23}$, sendo que o argônio é constituinte do gás do equipamento e o Na da matriz.

Tabela 5.3. Comparação dos sinais analíticos (contagens) para curva de calibração de 0 à 4 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na determinação de Cu^{63} .

| Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Sem CRI | 60 mL min^{-1} de H_2 no “skimmer” | 80 mL min^{-1} de H_2 no “skimmer” |
|---|----------|---|---|
| 0 | 13153,2 | 87 | 11,5 |
| 0,04 | 25417 | 251,5 | 25 |
| 0,1 | 49551,9 | 436,5 | 41,5 |
| 0,15 | 103097,9 | 1399 | 167,5 |
| 0,2 | 90977,5 | 688,5 | 84 |
| 0,4 | 146262,3 | 917 | 109,5 |
| 1 | 584628,6 | 2836,5 | 302,5 |
| 2 | 1379053 | 7969,2 | 738 |
| 4 | 2688181 | 27580 | 2587,5 |

É possível observar a diminuição das contagens da ordem de 100 vezes quando é adicionado H_2 na vazão de 60 mL min^{-1} e da ordem de 1000 vezes

quando a vazão é aumentada para 80 mL min⁻¹. Isso evidencia que ocorre remoção do analito em conjunto com o interferente; essa estratégia é interessante de ser utilizada quando a razão sinal do analito / sinal do interferente for maior do que quando a CRI não é aplicada; dessa forma a tendência é que haja melhoras no limite de detecção e de quantificação. Dessa forma, foi adotada a vazão de 60 mL min⁻¹ para os analitos que necessitavam da adição de gases na CRI.

A tabela 5.4 mostra os teores de recuperação de diferentes analitos empregando diferentes condições quando foi aplicada a condição otimizada: 50 mg + 1 mL de TMAH 50% por 6 horas sendo realizado o ajuste de volume para 10 mL com solução Triton X-100 (0,01%) e HNO₃ (1,0%).

Tabela 5.4. Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de material de referência certificado (fígado bovino – SRM NIST 1577b) após extração empregando 50 mg de amostra+ 1 mL de TMAH 50% por 6 horas com determinação por ICP-MS.

| Analito | Sem gás | 60 mL min ⁻¹ H ₂ | 60 mL min ⁻¹ He |
|--------------------|---------|--|----------------------------|
| Cr ⁵² | X | X | X |
| Cr ⁵³ | X | X | X |
| Mn ⁵⁵ | 56,3 | 58 | 56,7 |
| Fe ⁵⁶ | X | 138 | 147,7 |
| Co ⁵⁹ * | 76,1 | 22,4 | 26,0 |
| As ⁷⁵ | X | X | 133 |
| Se ⁷⁸ | X | 123,6 | 80,8 |
| Se ⁷⁶ | X | X | X |
| Mo ⁹⁸ | 73,5 | 79,3 | 72,5 |
| Mo ⁹⁵ | X | 92,3 | 77,2 |
| Cd ¹¹² | 34,9 | 87,1 | 101,7 |
| Cd ¹¹⁴ | X | 65,7 | 54,2 |
| Pb ²⁰⁸ | 54,1 | 49,1 | 54,4 |

* - valor não certificado X – não foi possível a quantificação

Os resultados das quantificações mostraram-se bastantes críticos devido a baixa exatidão; não foi possível a determinação de alguns analitos, tais como Mn^{55} , Fe^{56} e Pb^{206} . Esse fato pode ser atribuído à complexidade do meio, mesmo sendo realizada a compatibilização de matriz. Muitas vezes a curva de calibração não apresentou valores de correlação satisfatórios; outras vezes o problema pode estar relacionado às interferências poliatômicas. Para esse tipo de interferência pode ser citado o caso da interferência na quantificação do Cr^{52} , uma vez que o meio da amostra é rico em carbono e o plasma é constituído de argônio, afetando criticamente na determinação desse isótopo ($Ar^{40}C^{12}$); ou ainda a determinação de As^{75} , que é afetada pela interação entre o argônio do plasma e o cloreto da amostra ($Ar^{40}Cl^{35}$); essa interferência merece destaque, uma vez que As é um elemento monoisotópico não sendo possível escolher outra m/z para ser monitorada.

Mesmo assim foram obtidos os primeiros espectros de massa das amostras aplicando no ICP-MS o modo “full mass scan”. A figura 5.2 apresenta os espectros de 10 amostras selecionadas aleatoriamente, que possuíam entre si diferenças de grupos genéticos e regiões.

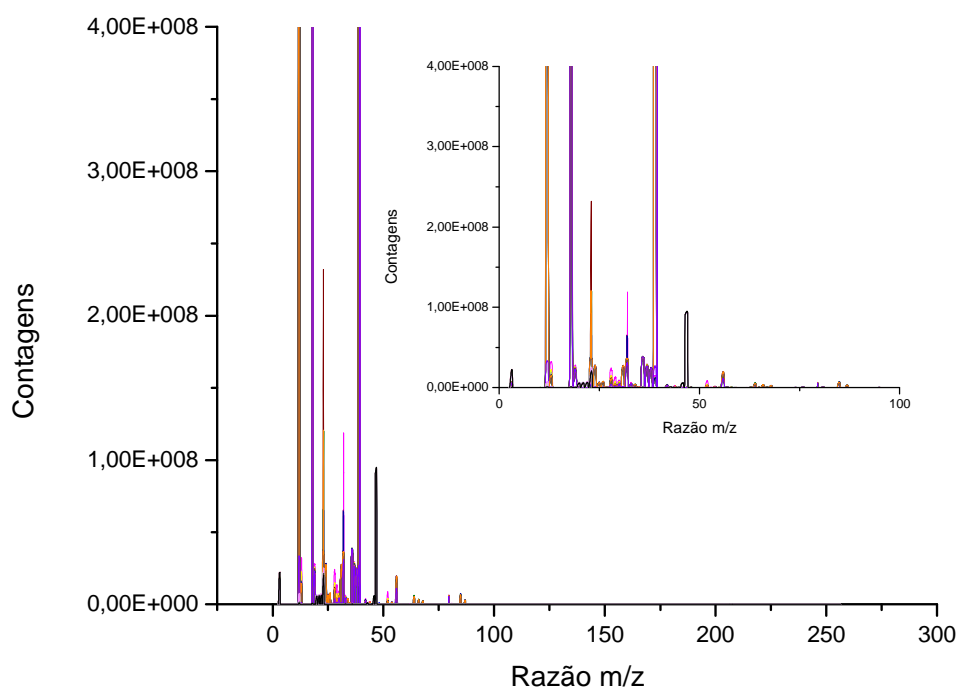


Figura 5.2. Espectros de massa obtidos por ICP-MS de 10 amostras aleatórias de *Longissimus dorsi* de diferentes grupos genéticos e regiões após extração empregando TMAH.

Por esses espectros é possível observar que existem diferenças entre os sinais das razões m/z . Seja no valor da intensidade ou na posição dos sinais. A observação dessas diferenças fica ainda mais evidente se analisado o intervalo de 0 a 100 m/z , localizado no canto direito superior da figura. Contudo, após esses testes iniciais, o equipamento perdeu sensibilidade, em razão da grande quantidade de leituras, o que provavelmente tenha sobrecarregado o detector. Esse fato motivou a busca por outra estratégia de preparo de amostra.

5.2. Extração ácida

A utilização da extração ácida foi uma alternativa avaliada nesse trabalho. Foram testados HNO_3 e HCl . O HNO_3 é interessante, pois além do seu poder oxidante, introduz no plasma apenas espécies que já existem no mesmo; já o HCl adiciona no plasma íons Cl^- , que pode se recombinar formando interferentes isobáricos ou causar interferência espectroscópica. As tabelas 5.5a e 5.5b demonstram os resultados dos teores de recuperação do planejamento experimental em amostra de referência certificado (fígado bovino – SRM NIST 1577b), que foi previamente utilizado na otimização da extração ácida para os macroconstituintes, quantificados por ICP OES.

Tabela 5.5a. Valores de recuperação (%) de Ca, Cu, Fe e K do planejamento experimental 2^{7-3} em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b) empregando ICP OES.

| Exp | Ca 396,847 | DPR (%) | Cu 324,754 | DPR (%) | Fe 238,204 | DPR (%) | K 766,491 | DPR (%) |
|-----|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|--------------|------------|
| 1 | 70,4 | 0,7 | 93,3 | 5,3 | 42,9 | 9,7 | 94,6 | 3,3 |
| 2 | 57,5 | 9,3 | 74,4 | 10,1 | 32,0 | 7,2 | 75,3 | 5,5 |
| 3 | 80,0 | 3,1 | 85,7 | 9,1 | 27,8 | 6,3 | 104,2 | 0,9 |
| 4 | 73,6 | 9,1 | 76,4 | 10,8 | 37,9 | 0,5 | 98,3 | 0,4 |
| 5 | 69,8 | 3,6 | 100,0 | 5,3 | 37,8 | 4,4 | 97,1 | 2,7 |
| 6 | 63,7 | 9,0 | 89,0 | 2,3 | 41,4 | 1,4 | 84,1 | 3,3 |
| 7 | 95,8 | 8,7 | 97,8 | 6,3 | 41,0 | 1,8 | 111,3 | 1,3 |
| 8 | 69,3 | 9,0 | 85,5 | 7,6 | 33,2 | 10,4 | 104,7 | 5,8 |
| 9 | 62,5 | 10,5 | 97,3 | 5,1 | 40,1 | 3,3 | 84,5 | 4,7 |
| 10 | 64,9 | 1,7 | 87,1 | 6,0 | 50,0 | 2,1 | 80,3 | 2,9 |
| 11 | 70,0 | 2,3 | 94,1 | 5,5 | 60,8 | 1,7 | 100,8 | 2,3 |
| 12 | 66,6 | 9,8 | 81,1 | 3,0 | 19,7 | 5,6 | 90,8 | 2,7 |
| 13 | 89,7 | 2,4 | 97,8 | 1,3 | 48,3 | 8,3 | 88,1 | 0,3 |
| 14 | 48,0 | 7,2 | 82,8 | 10,6 | 31,7 | 10,6 | 71,3 | 6,1 |
| 15 | 74,2 | 3,6 | 98,1 | 2,0 | 44,0 | 10,9 | 101,6 | 1,5 |
| 16 | 61,6 | 4,3 | 83,8 | 5,2 | 57,1 | 3,4 | 90,6 | 4,4 |

Tabela 5.5b. Valores de recuperação (%) de Na, Mg, P e Zn do planejamento experimental 2^{7-3} em amostra de referência certificada (fígado bovino – SRM NIST 1577b) empregando ICP OES.

| Exp | Na 588,995 | DPR (%) | Mg 279,553 | DPR (%) | P 213,618 | DPR (%) | Zn 213,857 | DPR (%) |
|-----|---------------|------------|---------------|------------|--------------|------------|---------------|------------|
| 1 | 103,4 | 3,4 | 101,7 | 3,2 | 76,0 | 3,4 | 105,1 | 4,9 |
| 2 | 88,7 | 6,0 | 80,9 | 6,4 | 59,0 | 6,8 | 86,0 | 7,6 |
| 3 | 97,7 | 1,1 | 95,5 | 1,2 | 72,9 | 3,0 | 96,5 | 3,0 |
| 4 | 93,2 | 0,2 | 85,6 | 0,3 | 67,3 | 9,6 | 91,6 | 1,4 |
| 5 | 107,3 | 2,5 | 101,7 | 4,2 | 77,6 | 4,1 | 104,9 | 6,8 |
| 6 | 100,6 | 3,9 | 89,6 | 3,5 | 70,6 | 4,3 | 95,2 | 5,5 |
| 7 | 104,6 | 1,4 | 102,9 | 0,7 | 79,6 | 1,4 | 103,0 | 0,9 |
| 8 | 101,2 | 5,6 | 87,5 | 6,5 | 71,7 | 9,3 | 93,6 | 5,8 |
| 9 | 96,4 | 4,9 | 88,5 | 5,1 | 70,2 | 4,0 | 94,1 | 5,1 |
| 10 | 98,9 | 4,2 | 84,7 | 2,9 | 71,2 | 4,8 | 89,0 | 3,0 |
| 11 | 96,9 | 2,1 | 96,8 | 2,6 | 86,2 | 2,4 | 94,1 | 3,9 |
| 12 | 91,9 | 3,3 | 80,5 | 2,7 | 73,8 | 3,3 | 84,8 | 4,1 |
| 13 | 103,6 | 1,0 | 97,4 | 0,4 | 80,3 | 1,0 | 102,1 | 0,7 |
| 14 | 84,9 | 9,3 | 82,1 | 9,8 | 68,9 | 11,2 | 91,2 | 9,7 |
| 15 | 103,8 | 1,1 | 98,6 | 2,0 | 79,1 | 2,0 | 96,0 | 2,5 |
| 16 | 88,5 | 6,4 | 81,4 | 4,2 | 74,8 | 5,4 | 81,9 | 4,1 |

Os valores de recuperação foram satisfatórios para a maioria dos analitos. Assim como relatado por MIYAZAWA *et al.*, (1984), a recuperação dos elementos Fe e P foram baixas devido ao fato desses analitos estarem fortemente ligados à matriz.

É possível observar que extração com HNO_3 apresenta, geralmente, teores de recuperação melhores do que se comparado ao HCl; também como condição geral, pode ser observada que massa menor de amostra e o aquecimento se mostraram como variáveis importantes para todos os analitos. Contudo, o volume

e a concentração do ácido, o tempo e a agitação variaram de acordo com os analitos. De maneira geral, para os elementos Ca, Cu, Zn, K, Na e Mg, as melhores condições foram obtidas quando foi empregado volume maior de ácido, concentração de ácido e tempo menores e com agitação. Já para Fe e P as melhores condições foram obtidas com menor volume de ácido e maior concentração ácida e tempo de preparo e, além disso, não houve necessidade de agitação. Dessa forma, foi proposto um experimento com condições intermediárias, empregando 100 mg de amostra, 7,5 mL de HNO₃ (0,5 mol L⁻¹) com agitação e aquecimento por 45 min. A tabela 5.6 ilustra a recuperação dos analitos empregando a condição intermediária.

Tabela 5.6. Valores de recuperação dos analitos (%) empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO₃ (0,5 mol L⁻¹) com agitação e aquecimento por 45 minutos e quantificação por ICP OES.

| Analito | Recuperação (%) | DPR (%) |
|---------|-----------------|---------|
| Ca | 88 | 5,2 |
| Cu | 103 | 2,3 |
| Fe | 60 | 4,7 |
| Zn | 107 | 2,5 |
| K | 107 | 3,2 |
| Na | 98 | 4,8 |
| Mg | 103 | 1,7 |
| P | 91 | 6,2 |

Em função dos resultados apresentados, essa condição foi adotada como padrão para os experimentos que empregavam extração ácida como estratégia de preparo de amostras. Essa condição foi utilizada para quantificações empregando ICP-MS, sendo avaliada a necessidade de aplicação da CRI para o procedimento. Os valores estão expressos na tabela 5.7.

Tabela 5.7 Valores de recuperação dos analitos (%) empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO₃ (0,5 mol L⁻¹) com agitação e aquecimento por 45 minutos e quantificação por ICP-MS.

| Analito | Sem gás | 60 mL H ₂ |
|--------------------|--------------|----------------------|
| Cr ⁵² | 75,7 ± 5,2 | 122,3 ± 7,8 |
| Cr ⁵³ | 103,9 ± 0,7 | 15,7 ± 9,3 |
| Mn ⁵⁵ | 114,4 ± 4,5 | 47,1 ± 4,2 |
| Co ⁵⁹ * | 106,9 ± 4,1 | 46,1 ± 4,8 |
| Cu ⁶³ | 97,1 ± 3,6 | 75,8 ± 4,6 |
| Cu ⁶⁵ | 106,7 ± 3,9 | 69,4 ± 3,0 |
| As ⁷⁵ | 119,9 ± 23,2 | 238,4 ± 42,1 |
| Se ⁷⁸ | 53,4 ± 1,1 | 34,3 ± 2,2 |
| Mo ⁹⁸ | 101,1 ± 0,1 | 43,7 ± 4,2 |
| Cd ¹¹² | 80,9 ± 1,5 | 125,2 ± 3,8 |
| Cd ¹¹⁴ | 90,1 ± 9,1 | 73,4 ± 2,5 |
| Pb ²⁰⁸ | 93,1 ± 12,8 | 160,3 ± 8,9 |

As quantificações sem CRI mostraram resultados satisfatórios; o isótopo Cr⁵³ apresentou melhores resultados de recuperação se comparado ao Cr⁵², podendo estar relacionado à presença do interferente Ar⁴⁰C¹², que afeta na quantificação do Cr⁵².

A metodologia otimizada apresentava potencial para ser adotada como estratégia para o preparo de amostra do trabalho, uma vez que se mostrava como um método rápido e com custo relativamente baixo. Para avaliar a repetibilidade do método o procedimento foi aplicado 10 vezes em uma mesma amostra de contra-filé comercial, onde os desvios padrão relativo observados durante as quantificações estão apresentados na tabela 5.8, assim como os limites de detecção e quantificação, sem o emprego da CRI.

Tabela 5.8 Teste de repetibilidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o procedimento empregando 100 mg de amostra com 7,5 mL de HNO₃ (0,5 mol L⁻¹) com agitação e aquecimento por 45 minutos e realizando quantificação por ICP-MS (n=10).

| Analito | desvio (%) | LOD (ng L ⁻¹) | LOQ (ng L ⁻¹) |
|-------------------|------------|---------------------------|---------------------------|
| V ⁵¹ | 15,5 | 0,063 | 0,211 |
| Cr ⁵³ | 15,4 | 0,212 | 0,707 |
| Mn ⁵⁵ | 12,4 | 0,009 | 0,031 |
| Co ⁵⁹ | 13,5 | 0,003 | 0,011 |
| Ni ⁵⁸ | 2,4 | 0,427 | 1,423 |
| Ni ⁶⁰ | 9,2 | 0,152 | 0,506 |
| Cu ⁶³ | 8,3 | 0,149 | 0,492 |
| Cu ⁶⁵ | 12,2 | 1,159 | 3,863 |
| As ⁷⁵ | 2,4 | 0,057 | 0,190 |
| Se ⁷⁸ | 12,7 | 9,852 | 32,840 |
| Mo ⁹⁸ | 4,8 | 0,023 | 0,075 |
| Cd ¹¹² | 6,6 | 0,370 | 1,235 |
| Cd ¹¹⁴ | 7,8 | 0,522 | 1,463 |
| Te ¹³⁰ | 13,1 | 0,278 | 0,928 |
| Ba ¹³⁸ | 4,5 | 0,010 | 0,035 |
| Pb ²⁰⁸ | 7,1 | 0,024 | 0,081 |

Em geral, apesar de se tratar de procedimento de extração e determinação de elementos presentes em baixas concentrações, os desvios entre as replicatas foram baixos e com valores aceitáveis, variando de 2,4 a 15,5 ng L⁻¹.

Essa metodologia otimizada foi aplicada a um lote aleatório contendo 25 amostras de 7 grupos genéticos diferentes (Nelore, Pé-duro – PD, Canchim, CX, AX, LX e Búfalo) de 4 regiões distintas (São Carlos, SP; Meio Norte, Piauí; Campo Grande, MS e Amazonas). Essas amostras foram analisadas em ICP-MS no modo

“full mass scan” e a matriz de dados gerada foi analisada por PCA, sendo que os dados foram auto escalados visando dar a mesma importância para cada um dos sinais gerados no espectro de massa. Os espectros obtidos podem ser observados na figura 5.3 e 5.4.

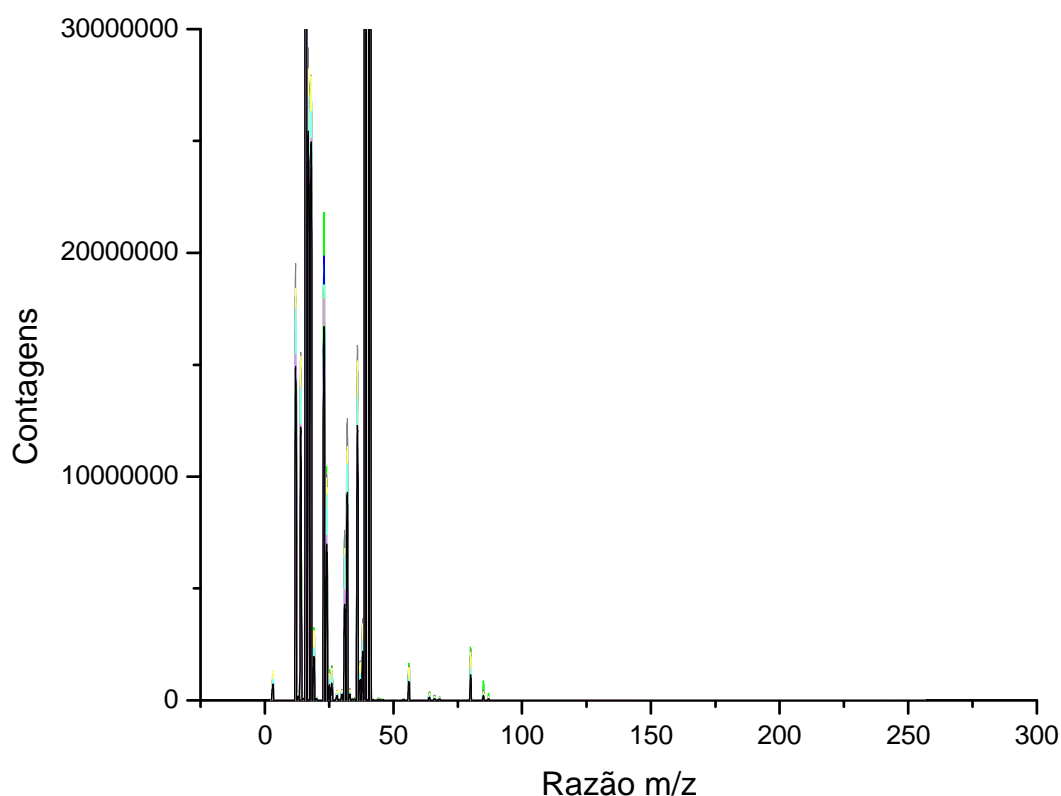


Figura 5.3. Espectros de massa total obtidos por ICP-MS para 25 amostras aleatórias de *Longissimus dorsis* após extração ácida com HNO_3 .

A figura 5.3 ilustra o espectro total com a massa variando de 2,49 até 256,4837 com incrementos de 0,025 u.m.a. Os sinais de maiores intensidade podem ser atribuídos a espécies que são encontradas em grande quantidade no meio (N^{14} , O^{16} , O^{16}H^1 , Ar^{38} , Ar^{39} , Ar^{40} , Ar^{40}H^1); já os sinais menores, em geral, são sinais correspondente aos elementos químicos que constituem a amostra (Al^{27} , Fe^{56} , Cu^{63} , Zn^{64} , Zn^{66} , entre outros). É possível observar uma maior aglomeração de sinais até a razão $m/z = 100$. A figura 5.4 apresenta o mesmo gráfico dando enfoque à região que apresenta a maior quantidade de sinais.

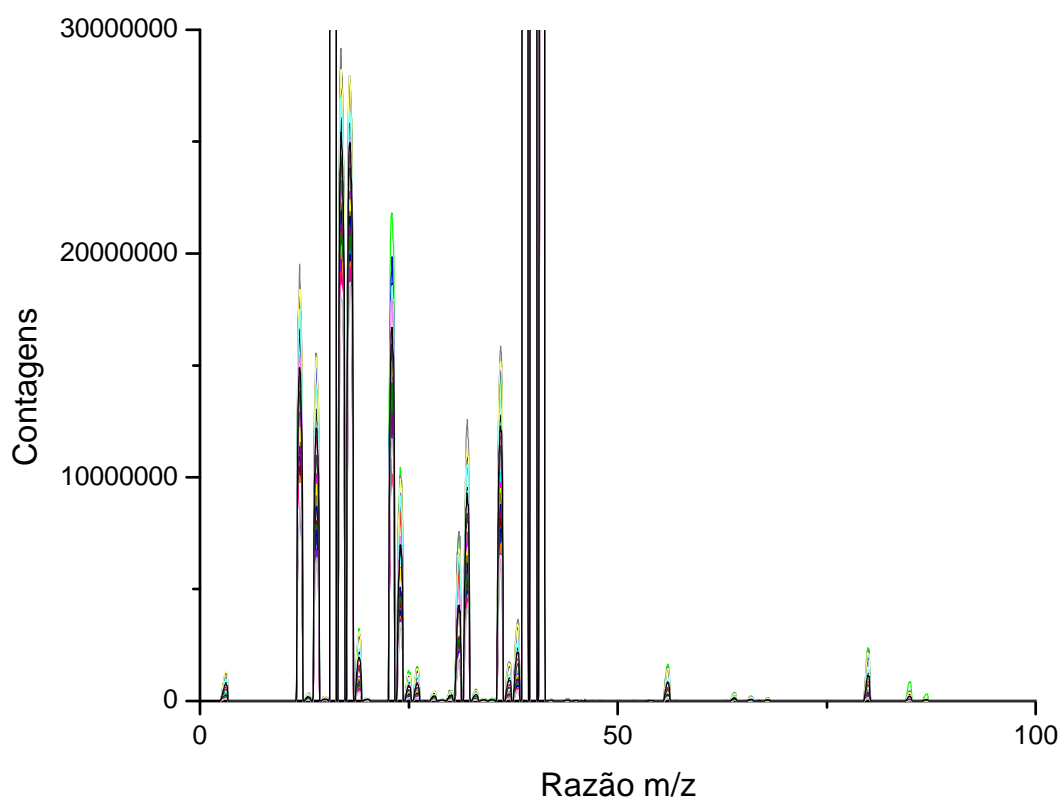


Figura 5.4. Espectros de massa de 0 a 100 u.m.a. obtidos por ICP-MS para 25 amostras aleatórias após extração ácida.

É possível observar diferenças nas intensidades dos sinais. Essas diferenças são responsáveis pelos agrupamentos quando se realiza a PCA. A figura 5.5 ilustra o gráfico de “scores” da PCA gerada a partir da matriz dos dados referentes a esses espectros.

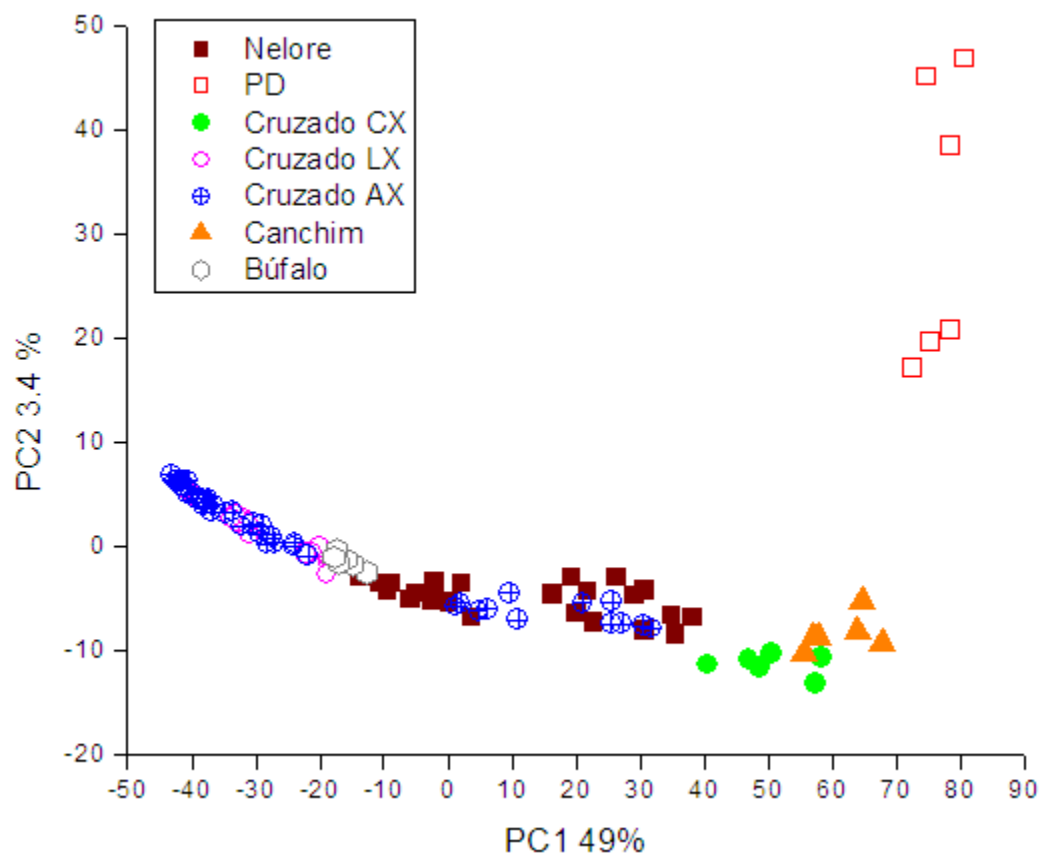


Figura 5.5. “scores” da PCA gerados a partir da matriz de dados obtida pela análise por ICP-MS no modo “full mass scan” empregando extração com ácido nítrico.

É possível observar que o grupo genético pé-duro (PD), representado pelos marcadores vermelhos, difere-se dos demais, formando um conjunto isolado; essa amostra provém da região meio norte. Existe o agrupamento referente às amostras de carne bubalina, destacadas em cinza. No quarto quadrante é possível observar o agrupamento referente às amostras de Canchim (laranja) com o cruzado CX (verde) que possui como pai um Canchim, portanto tendo características semelhantes ao mesmo. Entre o terceiro e quarto quadrante existe um agrupamento referente a amostras que possuem características de animais Nelore, sejam Nelores puros ou cruzados AX, animais cujo pai é Angus e a metade da mãe é Nelore. No segundo quadrante existem animais cruzados AX e LX, provavelmente foram priorizadas as características genótípicas do progenitor, no caso Angus para o AX e Limousan para o LX. Esse tipo de informação de acordo com o grupo genético é importante uma vez que aumenta cada vez mais a comercialização de carnes de

Analisando-se o quarto quadrante na parte inferior e a direita do mesmo, observa-se as massas correspondentes aos analitos C, N e O, além de seus poliatômicos; essa região é a que caracteriza os animais Canchim e os cruzados CX. Conforme discutido anteriormente, esses animais possuem 50% da raça Canchim provindos de seu progenitor.

Contudo, ao término dos experimentos empregando o modo “*full mass scan*” no ICP-MS, houve novamente perda de sinal do equipamento, sendo necessário aumento da voltagem do detector para recuperá-lo e, dessa forma, diminuindo a vida útil do detector. Essa perda vinha sendo atribuída ao preparo de amostra, assim como para a extração alcalina, e isso conduziu o trabalho para o preparo empregando digestão assistida por radiação micro-ondas em forno com rotor de 41 frascos.

5.3. Forno de micro-ondas com rotor de 41 frascos.

5.3.1. Otimização da metodologia

Baseando-se em procedimento otimizado para a digestão de forrageiras desenvolvida em colaboração com funcionária do centro de pesquisa, foram realizados testes univariados para amostra de carne. Os testes iniciais foram executados com amostra de contra-filé comercial, visando a otimização do procedimento.

A primeira medida necessária foi o aumento da temperatura do programa, uma vez que na temperatura empregada anteriormente, parte da gordura não era digerida. A matriz carne é rica em proteínas e lipídios e, segundo KINGSTON & JASSIE (1988), é necessário temperaturas superiores a 160° C para que essas substâncias possam ser completamente mineralizadas. Dessa forma, foi desenvolvido um procedimento com a temperatura fixada em 170° C. Para que se pudesse atingir essa temperatura no forno de micro-ondas, foi necessária a divisão do programa em duas rampas de aquecimento, pois caso contrário, o programa de segurança era interrompido devido à taxa de aquecimento que era aplicada. Dessa forma, a rampa de aquecimento ficou dividida em duas etapas, uma primeira com duração de 10 min até a temperatura de 120° C e a segunda com duração de 15 min

para atingir os 170° C. Após atingir a temperatura de 170° C essa era mantida por 35 min para a total elemento químicoização das amostras.

Foram realizados testes univariados em amostra de contra-filé comercial, onde foram monitorados o teor de carbono residual (GOUVEIA *et al.*, 2001) dos experimentos. A tabela 5.9 descreve o procedimento realizado e apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.9 Teor de carbono residual (TCR) da otimização da metodologia de decomposição empregando forno de micro-ondas com rotor de 41 posições.

| Exp | Descrição | TCR (mg Kg ⁻¹) | DPR (%) |
|-----|--|-------------------------------|------------|
| 1 | 0,1 g + 1,5 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ + 6 mL H ₂ O | 1229,0 | 3,2 |
| 2 | 0,1 g + 2 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ + 6 mL H ₂ O | 638,7 | 12,6 |
| 3* | 0,1 g + 2,0 mL HNO ₃ (overnight) + 2 mL H ₂ O ₂ + 6 mL H ₂ O | 626,8 | 14,4 |
| 4 | 0,075 g + 1,5 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ + 6 mL H ₂ O | 443,4 | 7,6 |
| 5 | 0,075 g + 2 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ + 6 mL H ₂ O | 452,7 | 5,3 |
| 6 | 0,075 g + 2 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ + 8 mL H ₂ O | 415,4 | 6,4 |

* experimento empregando pré-digestão overnight.

O teor de carbono residual é um importante parâmetro para se avaliar a eficiência de procedimentos de digestão. Ao se comparar os procedimentos 2 e 3 evidencia-se que a pré-digestão não se faz necessária, uma vez que os TCR foram similares. Diminuindo a massa da amostra é possível observar uma redução do TCR, isso é devido ao fato de que a quantidade de matéria orgânica que teria que ser digerida também foi diminuído e dessa forma os TCR são menores. Contudo massa maior garante maior representatividade da amostra, sendo escolhida a massa de 0,1 g. A adição de um volume maior de água possibilita uma melhor absorção da radiação micro-ondas pela amostra, devido à constante dielétrica da água, o que leva a uma diminuição do TCR. No entanto, ao abrir os frascos correspondentes a esses experimentos foi observado um grande alívio de pressão e dessa forma, como a diminuição do TCR não era muito grande, optou-se por empregar 6 mL de água. Ao utilizar 0,1 g de amostra observa-se uma diminuição no

TCR quando um volume maior de ácido é empregado. Optou-se pelo uso de 2 mL de HNO₃. Essa metodologia (0,1 g de amostra + 2 mL de HNO₃ concentrado + 2 mL de H₂O₂ + 6 mL de H₂O) foi utilizada para a decomposição de amostras de referência certificadas (fígado bovino – SRM NIST 1577b e músculo bovino – SRM NIST 8414) e das demais 650 amostras de carne disponíveis para o trabalho.

A tabela 5.10 apresenta os teores de recuperação dos analitos nas amostras certificadas empregando ICP OES como técnica de quantificação.

Tabela 5.10 Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de referência certificada empregando digestão assistida por radiação micro-ondas com determinação por ICP OES (n=3).

| Elemento | Valor certificado (mg kg ⁻¹) | Músculo | | Fígado | | |
|------------|--|---------|---------|--|---------|---------|
| | | Rec (%) | DPR (%) | Valor certificado (mg kg ⁻¹) | Rec (%) | DPR (%) |
| Ca 396,847 | 145 ± 20 | 98,3 | 4,5 | 116 ± 6 | 100,6 | 7,3 |
| Cu 327,395 | 2,84 ± 0,45 | 106,3 | 11,2 | 160 ± 9 | 93,6 | 2,5 |
| Fe 259,940 | 71,2 ± 9,2 | 127,3 | 9,4 | 184 ± 8 | 95,9 | 4,4 |
| K 769,897 | 15170 ± 370 | 112,8 | 1,7 | 9940 ± 20 | 123,8 | 1,9 |
| Mg 279,553 | 960 ± 95 | 110,1 | 2 | 601 ± 28 | 116,4 | 1,4 |
| Na 589,592 | 2100 ± 80 | 100,1 | 2 | 2420 ± 60 | 101,7 | 3,9 |
| P 213,618 | 8360 ± 45 | 101,8 | 2,6 | 11000 ± 300 | 104,5 | 2,7 |
| S 181,972 | 7950 ± 41 | 102,9 | 9,5 | 7850 ± 60 | 101,8 | 6,4 |
| Zn 213,857 | 142 ± 14 | 92,3 | 5,9 | 127 ± 16 | 91,8 | 1,9 |

Os valores de recuperação e os desvios das repetições (triplicatas) estão dentro dos limites aceitáveis, mostrando que o método é adequado para efetuar as quantificações dos analitos.

Nas determinações por ICP-MS, foi empregado padrão interno. De acordo com SALAZAR *et al.*, (2011), a utilização de padrão interno contribui para as análises empregando essa técnica. Visando empregar essa estratégia foi realizado

um estudo de otimização de condições para as quantificações empregando ICP-MS. Além de ser avaliada a necessidade da adição de 60 mL min⁻¹ de hidrogênio na CRI, também foi avaliada a adição de padrão interno, sendo selecionados Sc, Y e Bi, ou seja, elementos que possuem razão m/z baixa, intermediária e alta para simular os processos sofridos pelos analitos até o detector baseado nas respectivas massas e a utilização em conjunto do padrão interno e da CRI. As melhores condições obtidas e os teores de recuperação correspondente podem ser visualizados na tabela 5.11. Para tratamento dos dados é feita a razão entre o sinal do analito dividido pelo sinal do padrão interno, que é adicionado na mesma concentração na curva analítica e nas amostras e dessa forma torna-se possível a quantificação.

Tabela 5.11. Valores de recuperação dos analitos (%) em amostra de fígado e músculo certificado após empregar digestão assistida por radiação micro-ondas com determinação por ICP-MS.

| Analito | CRI | PI | Músculo | | | Fígado | | |
|-------------------|-----|------------------|---|------------|------------|---|------------|------------|
| | | | Valor certificado (mg kg ⁻¹) | Rec (%) | DPR (%) | Valor certificado (mg kg ⁻¹) | Rec (%) | DPR (%) |
| V ⁵¹ | Sem | Sem | 0,005* | 200,5 | 10,1 | 0,123* | 91,9 | 7,7 |
| Mn ⁵⁵ | Sem | Sc ⁴⁵ | 0,37 ± 0,09 | 77,1 | 4,22 | 10,5 ± 1,7 | 96,2 | 1,4 |
| Co ⁵⁹ | Sem | Y ⁸⁹ | 0,007 ± 0,003 | 93,7 | 11,0 | 0,25* | 103,2 | 2,5 |
| Ni ⁵⁸ | Sem | Y ⁸⁹ | 0,05 ± 0,04 | 117,6 | 14,4 | NC | NC | NC |
| Cu ⁶⁵ | Sem | Sc ⁴⁵ | 2,84 ± 0,45 | 45,8 | 11,3 | 160 ± 8 | 91,6 | 1,2 |
| Cu ⁶³ | Sem | Sc ⁴⁵ | 2,84 ± 0,45 | 111,4 | 7,5 | 160 ± 8 | 101,9 | 2,0 |
| Zn ⁶⁴ | Sem | Sem | 142 ± 14 | 99,6 | 5,0 | 127 ± 16 | 91,7 | 2,1 |
| Zn ⁶⁶ | Sem | Sem | 142 ± 14 | 104,8 | 4,7 | 127 ± 16 | 94,8 | 6,7 |
| As ⁷⁵ | Sem | Sc ⁴⁵ | 0,009 ± 0,003 | 105,9 | 13,6 | 0,05* | 85,5 | 4,8 |
| Mo ⁹⁶ | Sem | Y ⁸⁹ | 0,08 ± 0,06 | 97,9 | 8,25 | 3,5 ± 0,3 | 110,3 | 10,5 |
| Mo ⁹⁸ | Sem | Y ⁸⁹ | 0,08 ± 0,06 | 100,3 | 2,6 | 3,5 ± 0,3 | 109,2 | 11,6 |
| Cd ¹¹² | Sem | Y ⁸⁹ | 0,013 ± 0,011 | 121,1 | 17,0 | 0,50 ± 0,03 | 102,5 | 7,2 |
| Cd ¹¹⁴ | Sem | Y ⁸⁹ | 0,013 ± 0,011 | 153,9 | 21,1 | 0,50 ± 0,03 | 108,1 | 4,4 |

| | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------|-------|------|---------------|-------|-----|
| Pb ²⁰⁸ | Sem Bi ²⁰⁹ | 0,38 ± 0,24 | 92,6 | 10,9 | 0,129 ± 0,004 | 100,7 | 6,4 |
| Cr ⁵² | Com Sc ⁴⁵ | 0,071 ± 0,38 | 151,8 | 14,5 | NC | NC | NC |
| Fe ⁵⁶ | Com Y ⁸⁹ | 71,2 ± 9,2 | 107,8 | 3,2 | 184 ± 15 | 119,4 | 1,0 |
| Fe ⁵⁴ | Com Y ⁸⁹ | 71,2 ± 9,2 | 100,0 | 7,0 | 184 ± 15 | 116,9 | 1,1 |
| Se ⁷⁶ | Com Y ⁸⁹ | 0,076 ± 0,010 | 118,0 | 20,2 | 0,73 ± 0,06 | 107,8 | 8,0 |
| Se ⁷⁸ | Com Y ⁸⁹ | 0,076 ± 0,010 | 87,0 | 16,9 | 0,73 ± 0,06 | 92,9 | 6,3 |

NC – não certificado e * - Valor não certificado

Em geral, os valores certificados dos analitos das amostras de músculo bovino são inferiores aos valores do fígado bovino. Dessa forma, a quantificação desses analitos nessa matriz é mais complicada se comparada ao fígado. Esse fato justifica a maior dificuldade de recuperação dos analitos e aos maiores desvios obtidos para essa matriz.

Os elementos em que foi necessária a utilização da CRI são aqueles que sofrem interferências de íons poli-atômicos que contém o argônio mais abundante (Ar⁴⁰), que está amplamente disponível no plasma com outras espécies comumente encontradas na matriz (C¹², O¹⁶, N¹⁴). MAY & WIEDMEYER (1998) apresentam um trabalho onde discutem as principais interferências poli-atômicas em ICP-MS e abundância natural dos elementos. O Se⁸⁰ é o principal isótopo desse elemento, com abundância natural de 49,82%, contudo sua determinação é inviabilizada devido à formação do interferente Ar⁴⁰Ar⁴⁰; em virtude de não ser monoisotópico torna-se possível a escolha de outros isótopos, como o Se⁷⁶ (9,02%) e o Se⁷⁸ (23,52%). Contudo esses isótopos também podem sofrer com interferentes poliatômicos como Ar⁴⁰Ar³⁶ e Ar³⁸Ar³⁸ para o Se⁷⁶ ou Ar⁴⁰Ar³⁸ e Ar³⁸Ca⁴⁰ para o Se⁷⁸. Além disso, ao se escolher um isótopo que não seja o mais abundante, ocorre uma diminuição na sensibilidade do método, aumentando os valores de LOD e LOQ.

Para o caso do Cr, esse fato é mais um agravante, uma vez que o elemento é encontrado em baixas concentrações na carne e o Cr⁵² apresenta abundância de 83,76% e o Cr⁵³ apenas 9,51%. O Cr⁵² sofre interferência principal da espécie Ar⁴⁰C¹², além de Cl³⁵O¹⁶H¹, Ar³⁶O¹⁶, Cl³⁷N¹⁵, S³⁴O¹⁸, S³⁶O¹⁶, Ar³⁸N¹⁴, Ar³⁶N¹⁵H¹, Cl³⁵O¹⁷; já para o caso do Fe, a abundância natural não é tão crítica, uma vez que esse elemento é encontrado em faixa de concentração maior se comparado ao Cr. O Fe⁵⁶, principal isótopo do Fe (91,66%), sofre interferência principalmente de

$\text{Ar}^{40}\text{O}^{16}$, além de $\text{Ca}^{40}\text{O}^{16}$, $\text{Ar}^{40}\text{N}^{15}\text{H}^1$, $\text{Ar}^{38}\text{O}^{18}$, $\text{Ar}^{38}\text{O}^{17}\text{H}^1$ e $\text{Cl}^{37}\text{O}^{18}\text{H}^1$. O Fe^{54} sofre interferência principalmente do poliatômico $\text{Ar}^{40}\text{N}^{14}$.

Alguns elementos não necessitaram da adição de padrão interno, contudo é possível observar uma tendência, em que os elementos de massa baixa, como por exemplo, Mn^{55} apresentam melhores recuperações quando é empregado o Sc^{45} ; já os de massa intermediária como o Mo^{98} apresentam melhores resultados com o padrão Y^{88} e o Pb^{208} que possuem maior massa apresentaram melhores resultados com o Bi^{209} . Isso está associado ao fato de que elementos com razão m/z próximas apresentam comportamento similar no quadrupolo quando sofrem ação dos campos eletromagnéticos.

Dessa forma, ficou estabelecido que após o preparo da amostra no forno de micro-ondas eram adicionados 300 μL de uma solução contendo Sc, Y e Bi (1 mg L^{-1}) como padrão interno em concentração final de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo o volume ajustado para 30 mL para realizar as quantificações. Os elementos Ca (396,847), K (769,897), Mg (279,553), Na (589,592), P (213,618), S (181,972) e Zn (213,857) eram determinados por ICP OES. Já V^{51} , Mn^{55} , Cu^{63} , As^{75} , Co^{59} , Ni^{58} , Mo^{98} , Cd^{112} , Pb^{206} , Cr^{52} , Se^{78} e Fe^{54} eram determinados por ICP-MS. Sendo que o V^{51} era determinado sem adição de padrão interno e sem aplicar CRI. Também eram quantificados sem CRI Mn^{55} , Cu^{63} e As^{75} (monitorando os valores de Sc^{45}); Ni^{58} , Co^{59} , Mo^{98} e Cd^{112} (monitorando os valores de Y^{88}) e Pb^{208} (monitorando os valores de Bi^{209}). Já utilizando gás hidrogênio 60 mL min^{-1} no “skimmer” da CRI foram quantificados Cr^{52} (monitorando os valores de Sc^{45}), além de Fe^{54} e Se^{78} (monitorando os valores de Y^{88}).

5.3.2. Quantificação dos elementos

Depois de otimizada as condições de quantificações dos analitos, o procedimento proposto foi aplicado às amostras disponíveis para o desenvolvimento do trabalho. A tabela 5.12 mostra de maneira generalizada os valores obtidos nesse trabalho, apresentado o menor e o maior valor encontrado nas amostras, a porcentagem das amostras que possuem o analito e a média referente às 650 amostras analisadas, e os analitos que foram possíveis de serem quantificados.

Tabela 5.12. Teores máximos e mínimos de elementos químicos encontrados nas amostras, média dos teores apenas das amostras que contêm o analito e porcentagem de amostras em que o analito foi encontrado.

| | V ⁵¹ | Mn ⁵⁵ | As ⁷⁵ | Co ⁵⁹ | Ni ⁵⁸ |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Mínimo: | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Máximo: | 102,6 | 1011,5 | 106,8 | 68,1 | 5547,6 |
| Média: | 25,8 | 185,5 | 28,9 | 9,8 | 725,6 |
| % amostras: | 50,6 | 76,6 | 73,7 | 62,3 | 33,7 |
| | Mo ⁹⁸ | Cd ¹¹² | Pb ²⁰⁶ | Cr ⁵² | Se ⁷⁸ |
| | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Mínimo: | <LD | <LD | <LD | <LD | 20,9 |
| Máximo: | 335,3 | 349,1 | 527,7 | 2458,6 | 1371,0 |
| Média: | 18,9 | 78,4 | 107,8 | 353,1 | 273,7 |
| % amostras: | 47,5 | 3,7 | 31,4 | 57,1 | 100 |
| | Fe ⁵⁴ | Cu ⁶³ | Ca 396,847 | K 769,897 | Mg 279,553 |
| | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) |
| Mínimo: | 9,7 | 845,1 | 49,7 | 262,3 | 52,3 |
| Máximo: | 254,5 | 30039,5 | 984,1 | 2301,9 | 1558,8 |
| Média: | 41,0 | 1908,8 | 164,6 | 1211,2 | 767,2 |
| % amostras: | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Na 589,592 | P 213,618 | S 181,972 | Zn 213,857 | |
| | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | (mg kg^{-1}) | |
| Mínimo: | 156,1 | 2942,6 | 2883,4 | 47,7 | |
| Máximo: | 2444,3 | 12533,7 | 11970,4 | 274,9 | |
| Média: | 1481,4 | 7987,1 | 6469,9 | 119,4 | |
| % amostras: | 100 | 100 | 100 | 100 | |

De acordo com os valores estipulados pelo PNCRC (BRASIL, 2011), apenas 3 amostras excederam o valor máximo estipulado para o Pb que é de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A preocupação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento com os contaminantes inorgânicos são crescentes; a contaminação pode vir de sais elementos químicos utilizados na suplementação alimentar. Esses sais, em geral, são oriundos de rochas fosfatadas e podem possuir contaminantes na sua constituição. Ainda sobre o elemento Pb, ele foi encontrado em 31,4% das amostras e a média do teor nessas amostras em que foi possível quantificar foi de 107,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Como já era de se esperar, os macro (Ca, K, Mg, Na, P e S) e micronutrientes (Cu, Fe e Zn) estão presentes em todas as amostras analisadas; sendo que o teor de Na variou de 156,1 a 2444,3 mg kg^{-1} , Ca de 49,7 a 984,1 mg kg^{-1} e K de 262,3 à 2301,9 mg kg^{-1} . Outro fator que pode ser ressaltado é a importância da carne como fonte de Fe e que o teor médio das amostras analisadas foi de 41 mg kg^{-1} .

5.3.3. Análises de componentes principais

Visando construir a matriz de dados para os estudos quimiométricos, cerca de 150 amostras foram analisadas no modo “*full mass scan*” empregando o ICP-MS; contudo, ao término das análises, o equipamento tornou a perder sensibilidade. Dessa forma, ficou claro que a perda da sensibilidade esta relacionada ao modo de operação do equipamento e não ao tipo de preparo de amostra. Quando opera nesse modo, o equipamento acaba tendo uma sobrecarga para efetuar as leituras e isso faz com que o mesmo perca a sensibilidade; para que se recupere a sensibilidade do equipamento faz-se necessário um aumento na voltagem do detector, fato esse que diminui a vida útil do mesmo; sendo assim, essa estratégia, apesar de interessante, devido à quantidade de informações que poderiam ser disponibilizadas, em virtude da sensibilidade do equipamento e da quantidade de sinais que eram obtidos nos espectros teve que ser descartada.

Contudo, com o intuito de cumprir os objetivos inicialmente estipulados nessa tese, foi desenvolvida uma planilha para efetuar a varredura espectral das amostras por ICP OES. A alternativa é interessante, pois é realizado o controle de pelo menos dois comprimentos de ondas referentes a cada um dos elementos que o

equipamento consegue quantificar, contudo a sensibilidade da metodologia se comparada ao “full mass scan” é inferior e, além disso, o ICP-MS forneceria informações relacionadas aos isótopos dos metais, porém essa foi a alternativa encontrada frente a situação.

Além dos espectros gerados por ICP OES, também foram utilizados nas análises quimiométricas os valores de concentração dos 19 elementos que foram quantificados no desenvolvimento desse trabalho.

Aplicando-se a PCA na matriz de dados gerada pela varredura espectral por ICP OES, de todas as 650 amostras, foi possível observar um princípio de separação de acordo com a região dos animais. A figura 5.7 ilustra o gráfico de “scores” obtidos nessa situação. Por se tratar de espectros, os dados foram pré-processados centrados na média.

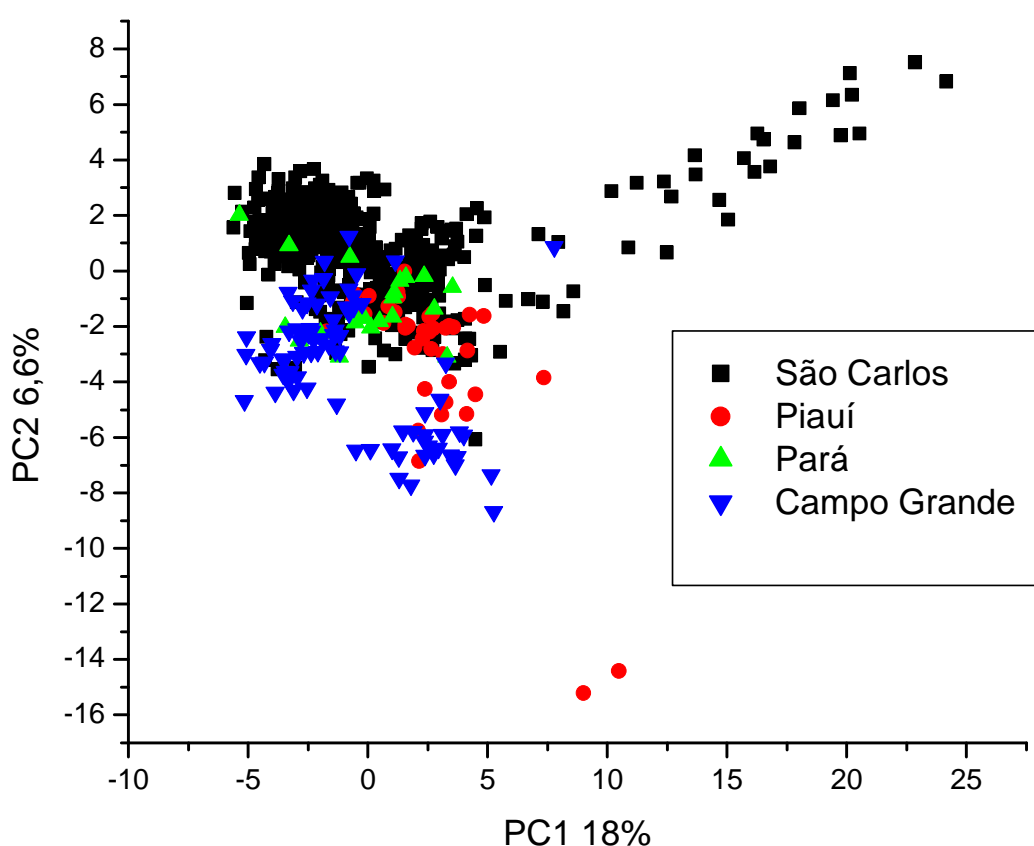


Figura 5.7. Gráfico de “scores” (classe selecionada: região) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 650 amostras.

As amostras representadas pela cor preta são originárias de São Carlos, em azul temos as amostras de Campo Grande, em vermelho as amostras do

Piauí (Embrapa Meio Norte) e as verdes correspondem às amostras do Pará (Embrapa Amazônia Oriental). Essa separação não é tão nítida, pois existem outros fatores, além da região, que podem influenciar o teor de elemento químico das amostras, como o grupo genético do animal e o tipo de suplementação alimentar, entre outros.

Ao observar o gráfico de “loadings” correspondente a essa análise, é possível notar quais são os comprimentos de onda que atuam para que ocorra essa diferenciação. A figura 5.8 apresenta o gráfico de “loadings” gerado.

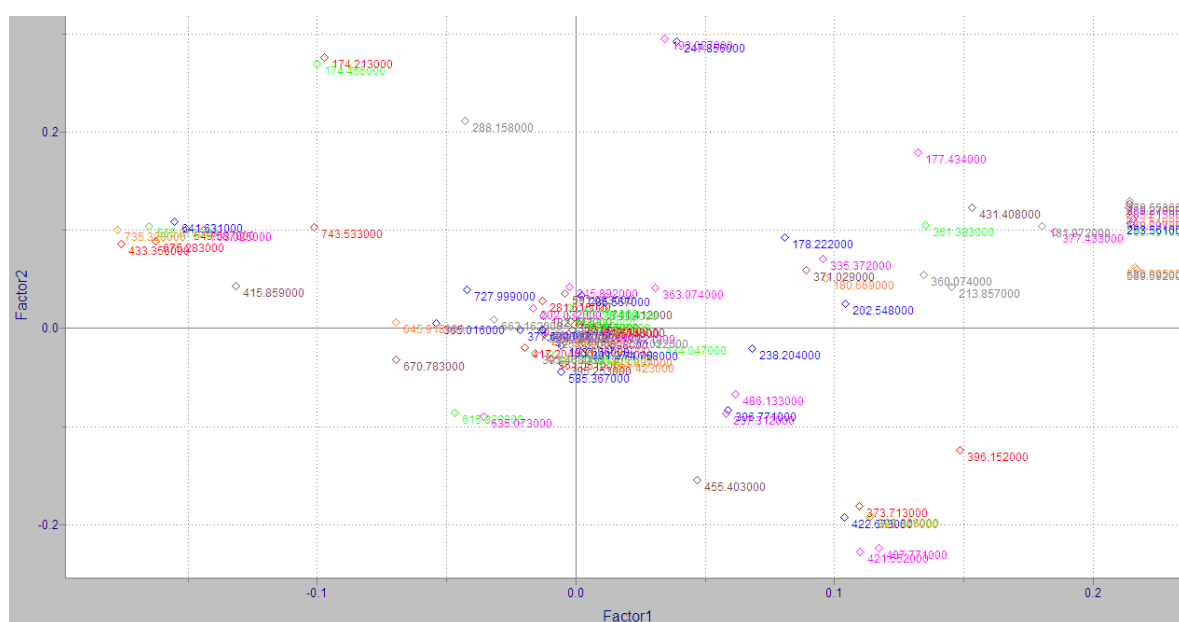


Figura 5.8. Gráfico de “loadings” obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 650 amostras.

O grupo das amostras de São Carlos (preto) é influenciado pelo comportamento dos comprimentos de onda 174,213 (N), 174,465 (N), 288,158 (Si), 193,027 (C) e 247,856 (C). Isso demonstra que essas amostras, possivelmente, tinham maior valor de C e N se comparada às demais. Parte das amostras de São Carlos está localizada à direita do primeiro quadrante, sendo caracterizada pelos comprimentos 181,972 (S), 279,553 (Mg), 280,270 (Mg), 285,213 (Mg), 213,618 (P), 769,897 (K), 253,561 (P), 588,995 (Na) e 589,592 (Na) nm. Já as amostras de Campo Grande (Azul) são caracterizadas principalmente por 670,783 (Li); 615,820 (O) e 635,073 (Br). Dessa forma, as amostras de São Carlos estão sendo caracterizadas pelos macro e as de Campo Grande pelo teor de Li e pelas duas linhas referentes ao O e ao Br.

Se for dado um enfoque ainda nessa matriz de dados, apenas nas amostras de São Carlos, onde havia um controle de mais parâmetros referentes à matriz, é possível notar que não existe diferença no perfil dos elementos químicos relacionados ao sexo do animal ou ao tipo de confinamento ao qual foi submetido; esse fato acaba fortalecendo a idéia de que o princípio de separação observado está relacionado à região de origem dos animais. A figura 5.9 mostra os “scores” para as variáveis: sexo: macho - preto e fêmea - vermelho (a) e terminação: pasto – verde; confinamento - preto e integração lavoura-pecuária - vermelho.

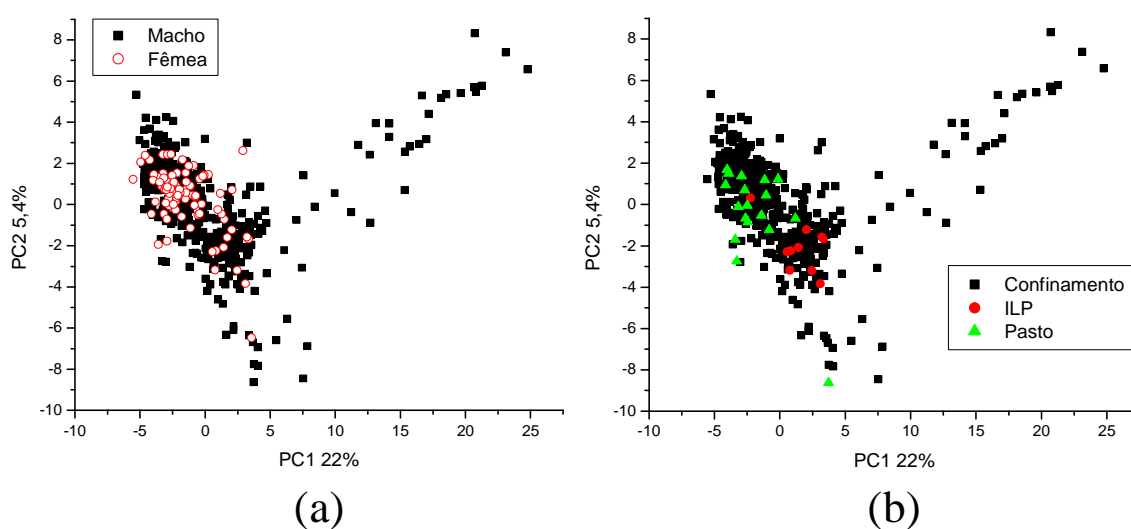


Figura 5.9. Gráfico de “scores” (classe selecionada - a: sexo e b: confinamento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das amostras de São Carlos.

É possível observar na parte (a) que ocorre sobreposição dos animais macho e fêmea, o que indica que não ocorre separação de acordo com essa variável. Raciocínio semelhante pode ser aplicado à terminação do animal, sendo que ocorre sobreposição entre as amostras, indicando que, provavelmente, esse fato não estaria influenciando o perfil elemento químico.

Em virtude da raça Nelore ser de grande interesse para a pecuária nacional como produtora de carne e devido aos índices de desempenho econômicos notáveis (COSTA et al., 2007), será dado um enfoque aos animais que são desse grupo genético ou, ainda, animais que contêm esse grupo genético como parte de um cruzamento. Dessa forma, permaneceram amostras das regiões de São Carlos, Campo Grande e Piauí. Utilizando a varredura espectral por ICP OES e a análise de

componentes principais, novamente é possível notar na figura 5.10 a separação dos grupos relacionada ao local de nascimento do animal.

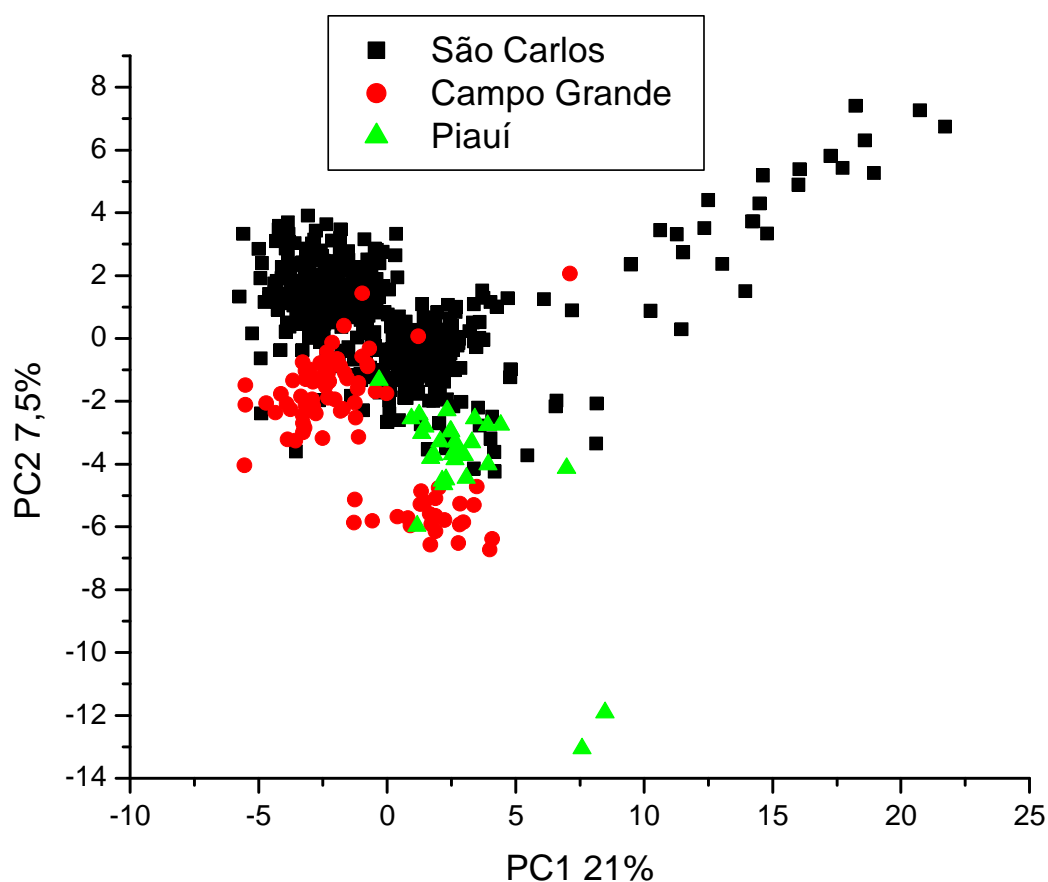


Figura 5.10. Gráfico de “scores” (classe selecionada: região) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das amostras de Nelore.

A idéia do local de nascimento influenciar no perfil dos elementos químicos está associada ao tempo que o animal fica naquela região exposto às condições do pasto e da suplementação elemento químico que lhe é atribuída. O animal fica por cerca de 18 meses no pasto para depois ser confinado, onde fica cerca de três meses para depois ser abatido.

As amostras de Nelore da região de São Carlos e de Campo Grande (375 amostras), por fazerem parte do projeto BifeQuali possuíam um controle dos dados e uma quantidade de informações maior, sendo que já tinham sido analisadas pelo programa outros dados como, força de cisalhamento (FC) após o abate e em outros tempos selecionados, índice de fragmentação miofibrilar (MFI), peso da carcaça quente (PCQE), peso da carcaça (PCQD), área de olho de lombo (AOL),

espessura de gordura subcutânea (EGAOL) e pH da amostra. Dessa forma, o trabalho foi conduzido com estas amostras pertencentes do projeto.

Os animais referentes a essas amostras estão divididos em duas safras diferentes, correspondente ao ano de abate 2010 (nascidos no final de 2007) e 2011 (nascidos no final de 2008). Além disso, os animais que foram confinados na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos) nasceram e passaram a parte inicial de suas vidas (18 meses) na própria unidade ou em uma fazenda colaboradora do projeto (a), ou ainda nasceram na Embrapa Gado de Corte (Campo Grande) e foram confinados em São Carlos; já os animais confinados na Embrapa Gado de Corte nasceram na própria unidade ou em outra fazenda colaboradora do projeto (b).

A figura 5.11 representa o gráfico de “loadings” correspondente às figuras 5.12 à 5.15 que apresenta os gráficos de “scores” obtidos ao realizar uma análise das varredura espectral das amostras correlacionando-as através de PCA com as classes: progenitor, safra, local de nascimento e local de confinamento.

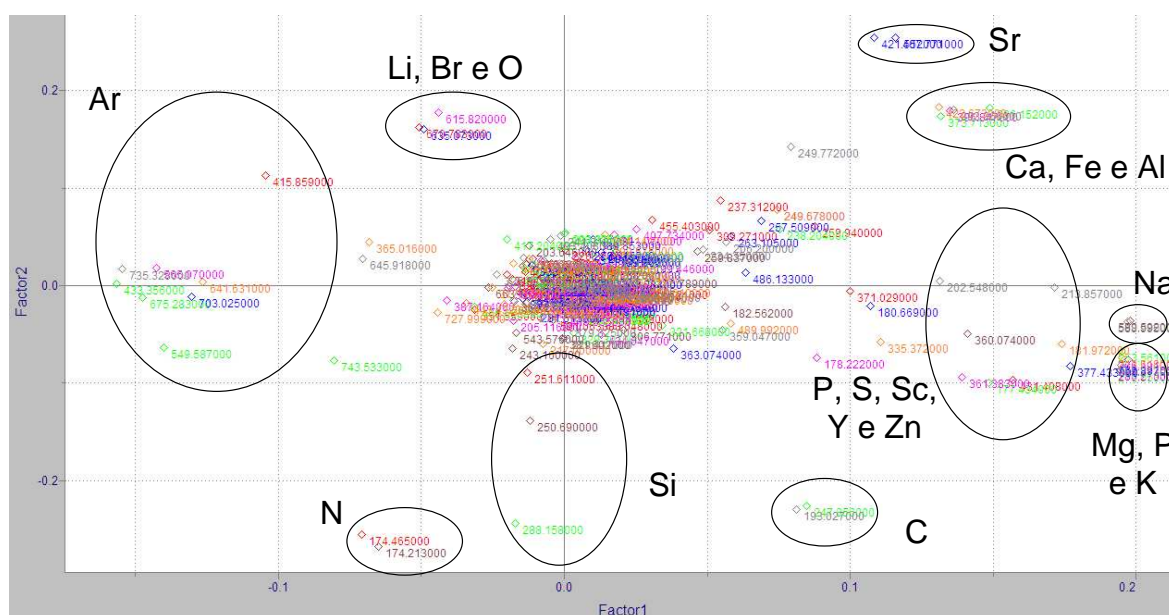


Figura 5.11. Gráfico de “loadings” obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali.

Observando-se a separação pela PC1, tem-se um grupo à esquerda caracterizado pelos comprimentos de onda característicos de Ar, Br, Li, N, O e Si e à direita pelos comprimentos de onda característicos de Al, C, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S, Sc, Sr, Y e Zn. Contudo, a separação observada pelos gráficos de “scores” é, principalmente, no sentido da PC2, sendo observado nos valores positivos dessa PC

os comprimentos de onda referente a Al, Br, Ca, Fe, Li, O e Sr e na parte inferior sendo caracterizada pelos comprimentos referentes ao C, K, Mg, N, Na, Si, P, S, Sc, Y e Zn .

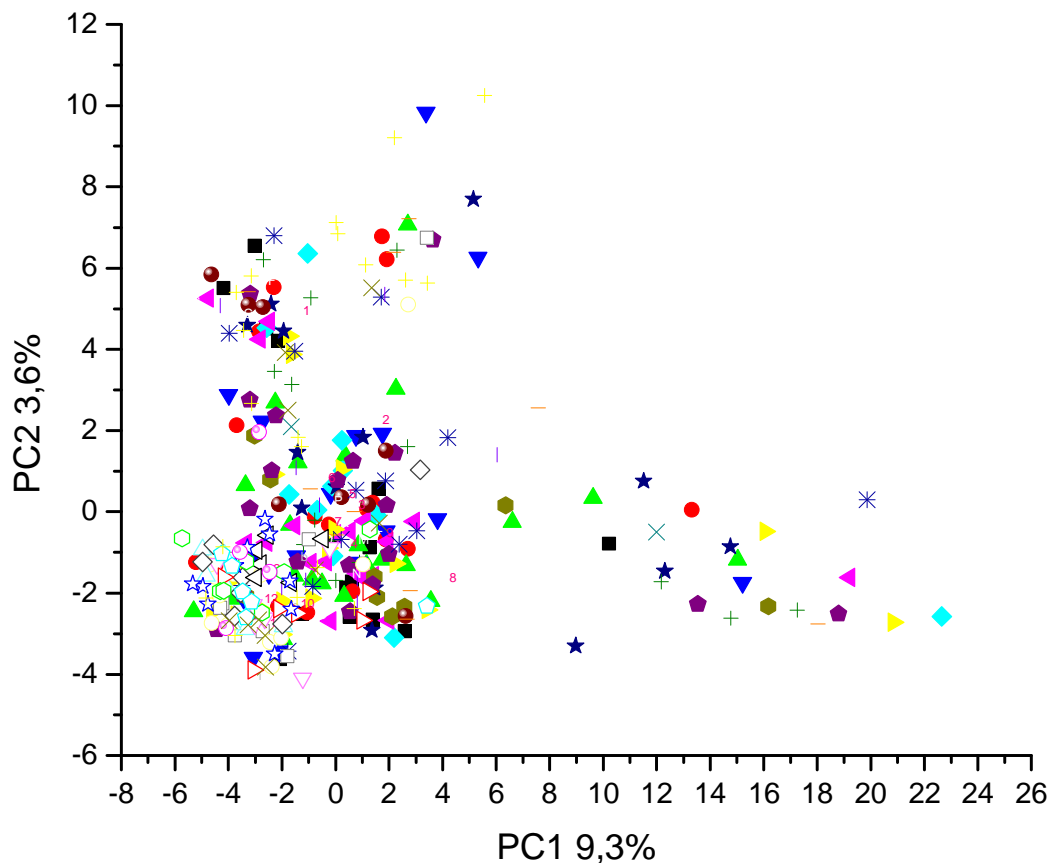


Figura 5.12. Gráfico de “scores” (classe selecionada: progenitor) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali.

Os 375 animais analisados vieram de 32 touros diferentes. A seleção dos touros foi realizada a partir de consultas aos catálogos das principais centrais de inseminação artificial do país. A partir de um número total de 616 touros Nelore das variedades mocha e aspada, foram eleitos para a composição desta amostra 32 touros ativos na população, ou seja, para os quais havia sêmen disponível no mercado, cujo valor não excedesse R\$ 50,00 a dose, a fim de representar touros acessíveis ao produtor típico da raça. Outro importante critério de seleção dos touros foi que os mesmos pertencessem às genealogias representativas das principais linhagens que compõem a raça Nelore, de uso comercial mais frequente dentro da

raça. Contudo, na análise de componentes principais, não é possível observar efeitos do progenitor no perfil de elemento químico dos seus respectivos filhos; não ocorre agrupamentos entre os animais que são filhos de um mesmo pai, o que indica que essa correlação não é significativa em relação ao perfil de elemento químico da amostra.

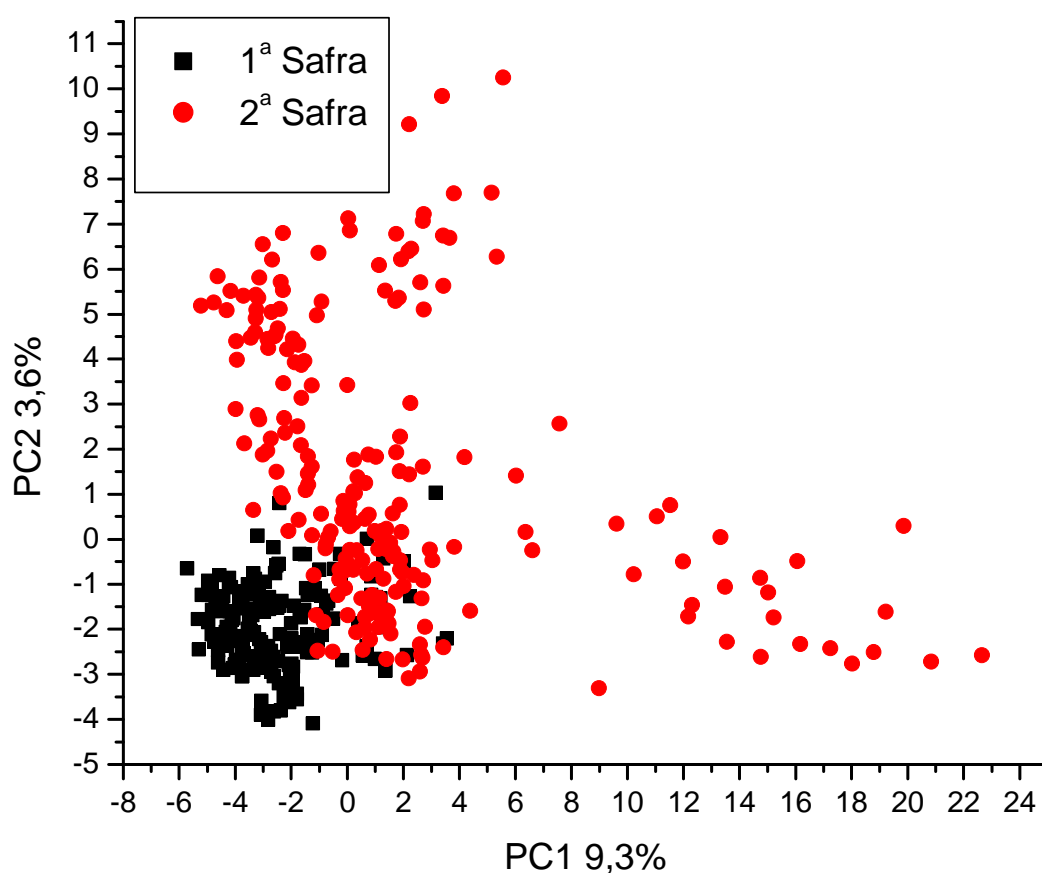


Figura 5.13. Gráfico de “scores” (classe selecionada: Safra) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali.

Já em relação à análise das safras é possível observar uma nítida separação entre os animais da primeira e da segunda safra; esse fato está associado à diferença que existiu entre ambas. A safra 1, caracterizada pela cor preta, foi um período de seca se comparado à safra 2, que foi chuvosa. Esse fato leva à lixiviação dos elementos químicos e, além disso, devido ao “stress” causado pela chuva o animal acaba se alimentando menos, o que leva à diminuição nos teores dos elementos químicos. Dessa forma, ocorre a separação de acordo com as

safras. As amostras que estão entre o primeiro e o quarto quadrante, bem a direita do gráfico são caracterizadas pelos comprimentos de onda característicos de K, Mg, Na e P; ou seja, essas amostras possuem maior teor desses elementos, fato que fortalece a idéia de que como choveu menos nessa safra havia mais desses elementos químicos disponíveis para os animais. Já as que estão na parte superior entre o primeiro e o segundo quadrante, principalmente pelos sinais correspondente a Br, Li e O e as amostras que estão entre o terceiro e quarto quadrante, na parte inferior, são caracterizadas, principalmente, pelos comprimentos de onda referentes à C, N e Si.

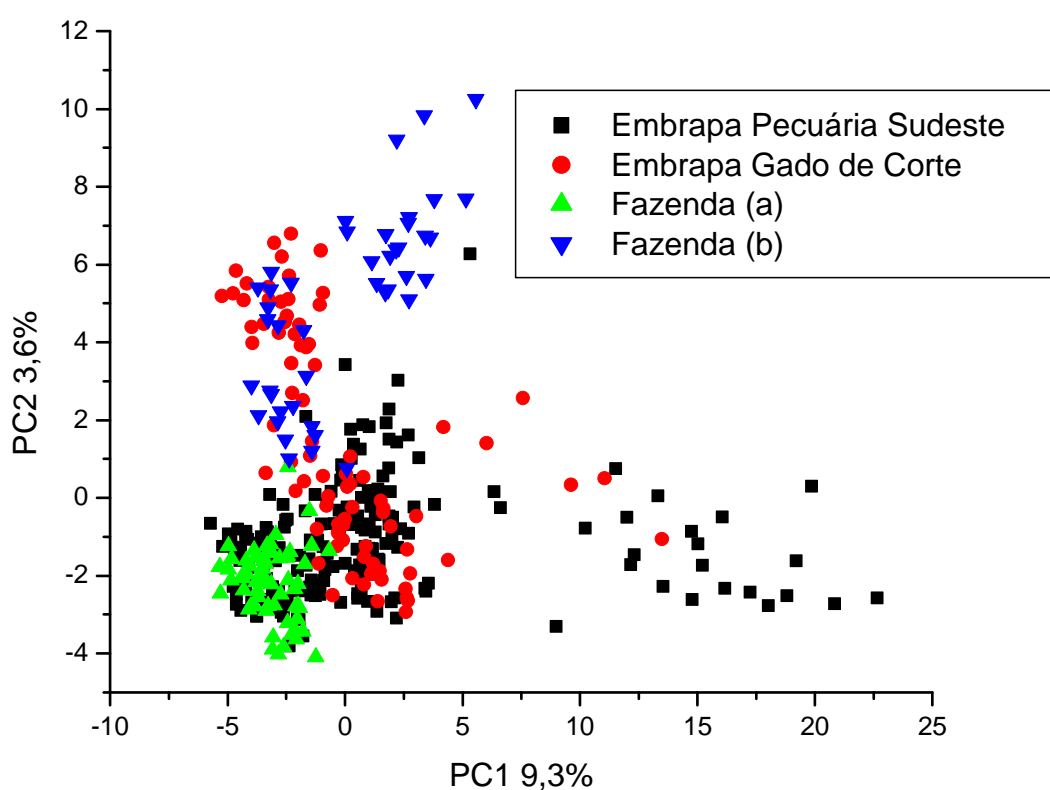


Figura 5.14. Gráfico de “scores” (classe selecionada: local de nascimento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali.

Ao analisar-se o perfil de elemento químico e relacionar com a variável local de nascimento do animal (4 locais distintos: Embrapa Pecuária Sudeste – cor preto, Embrapa Gado de Corte – cor vermelho, fazenda colaboradora (a) – cor verde e fazenda colaboradora (b) – cor azul), observa-se uma tendência de separação

entre as amostras da fazenda colaboradora (a) e da fazenda colaboradora (b); já os animais da Embrapa Gado de Corte se misturam com o da Pecuária Sudeste, sendo difícil relacionar essa classe ao perfil de todos os elementos químicos; a sobreposição do efeito confinamento parece se impor em relação ao local do nascimento para o perfil de todos os elementos químicos, se observada a figura 5.15 é demonstrado a separação devido ao confinamento.

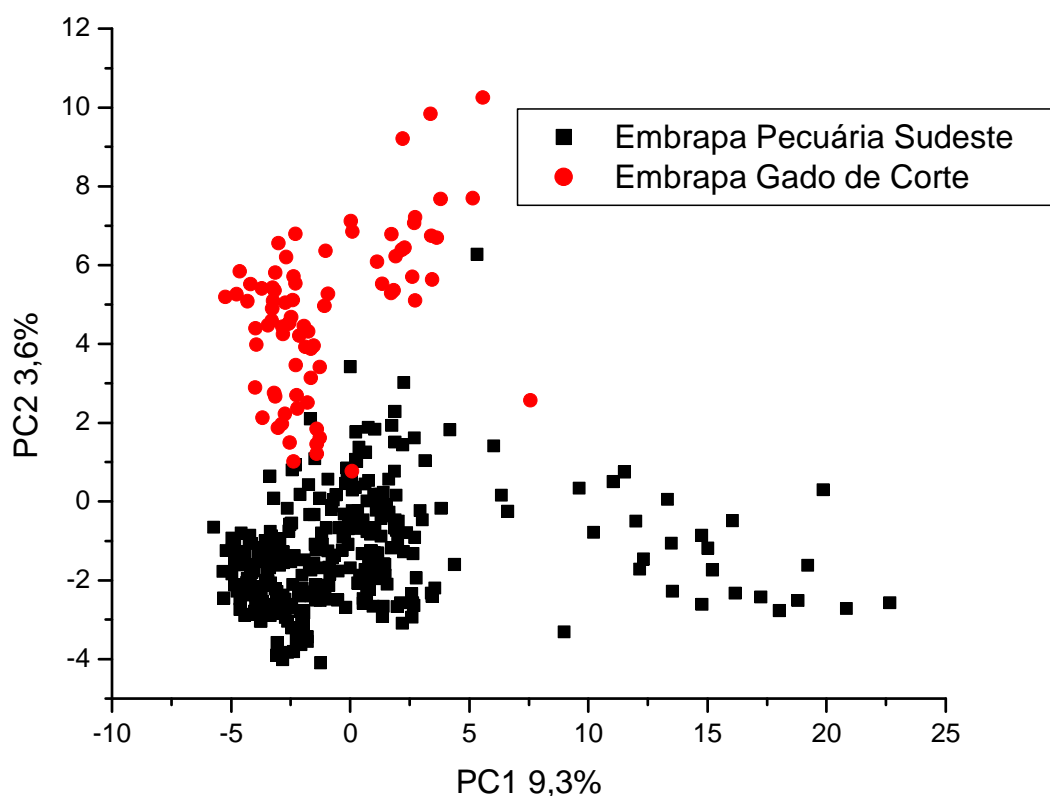


Figura 5.15. Gráfico de “scores” (classe selecionada: local de confinamento) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 375 amostras pertencentes ao projeto BifeQuali.

Na figura 5.15 é nítida a separação entre as amostras que foram confinadas na Embrapa Pecuária Sudeste (preto) e as que foram confinadas na Embrapa Gado de Corte (vermelho). Apesar do confinamento ser um período relativamente curto na vida do animal (3 meses) e nessa parte ser realizada a suplementação alimentar semelhante, a matéria prima empregada para realizar essa suplementação é diferente; dessa forma, os macronutrientes não diferem muito, pois

são os mais controlados, porém os micronutrientes e os contaminantes podem variar de acordo com o material utilizado para realizar essa adequação na alimentação.

Visando complementar os estudos de PCA, foram realizadas as análises de variância realizada pelo SAS para as quantificações dos elementos químicos Ca, K e Na. A tabela 5.13 descreve os resultados obtidos. O Ca foi selecionado, pois está relacionado à atividade enzimática da Calpaína e Calpastatina, que estão ligadas à maciez da carne, e o Na e K por fazer parte do mecanismo celular através da bomba de Na e K. Quando os resultados de p são menores que 0,05 ($p < 5\%$) indica que trata-se de uma variável significativa, sendo representado por P*. Já se $p < 0,01$ ($p < 1\%$), a variável é tratada como altamente significativa, sendo representado por P**.

Tabela 5.13. Análise de variância para avaliar os efeitos ambientais que influenciam os teores dos elementos químicos K, Na, Ca.

| Fonte de variação | Valor de P | | |
|--------------------------|--------------------|-----------|-----------|
| | Elementos químicos | | |
| | Ca | K | Na |
| Local de nascimento | <0,0001** | <0,0001** | <0,0001** |
| Local de confinamento | 0,1281 | 0,6048 | 0,7487 |
| Safra | <0,0001** | <0,0001** | <0,0001** |
| Mês de nascimento | 0,0066** | 0,0053** | 0,0445* |
| Idade de abate do animal | <0,0001** | <0,0001** | <0,0001** |

P* < 0,05; P** < 0,01

É possível observar que o local de nascimento, a safra, a estação de nascimento e a idade de animal influenciam na concentração dos elementos químicos Ca, K e Na. O animal após seu nascimento fica na mesma propriedade por cerca de 18 meses, se alimentando do pasto disponível naquele ambiente; dessa

forma, o local onde ele nasce influencia na concentração dos 3 elementos químicos selecionados, pois provavelmente a constituição do solo e das forrageiras que esses se alimentam é diferente.

Na etapa de confinamento, o animal fica cerca de 3 meses recebendo suplementação alimentar; a forma de suplementação apesar de diferir um pouco, emprega teores semelhantes dos macronutrientes químicos, entre eles Ca, K e Na e dessa forma o local de confinamento não apresentou importância significativa para esses 3 elementos químicos, contudo na análise de PCA demonstrada na figura 5.15 fica evidenciada a importância do local de confinamento.

Conforme salientado anteriormente, as duas safras analisadas foram bastante diferentes, sendo uma bastante chuvosa e a outra seca; esse fato interfere no perfil dos elementos químicos analisados, uma vez que eles apresentam alta mobilidade; isso também pode ser associado ao mês de nascimento do animal. A separação das amostras de acordo com a safra também pode ser observada pela análise de PCA dos scans obtidos por ICP OES mostrada anteriormente na figura 5.13.

Para inclusão de dados disponíveis pelo projeto BifeQuali (força de cisalhamento (FC) após o abate e em outros tempos selecionados, índice de fragmentação miofibrilar (MFI), peso da carcaça quente (PCQE), peso da carcaça (PCQD), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGAOL) e pH da amostra(pH)) fez-se necessário a utilização dos valores quantificados dos analitos, uma vez que todos os dados deveriam estar no pré-processamento das análises para serem auto-escalados. Foram obtidos os dados completos referentes a 249 amostras, correspondente aos animais Nelore que foram confinados em São Carlos. A figura 5.16 representa o gráfico de “loadings” correspondente a essa matriz de dados que foi gerada com essas amostras.

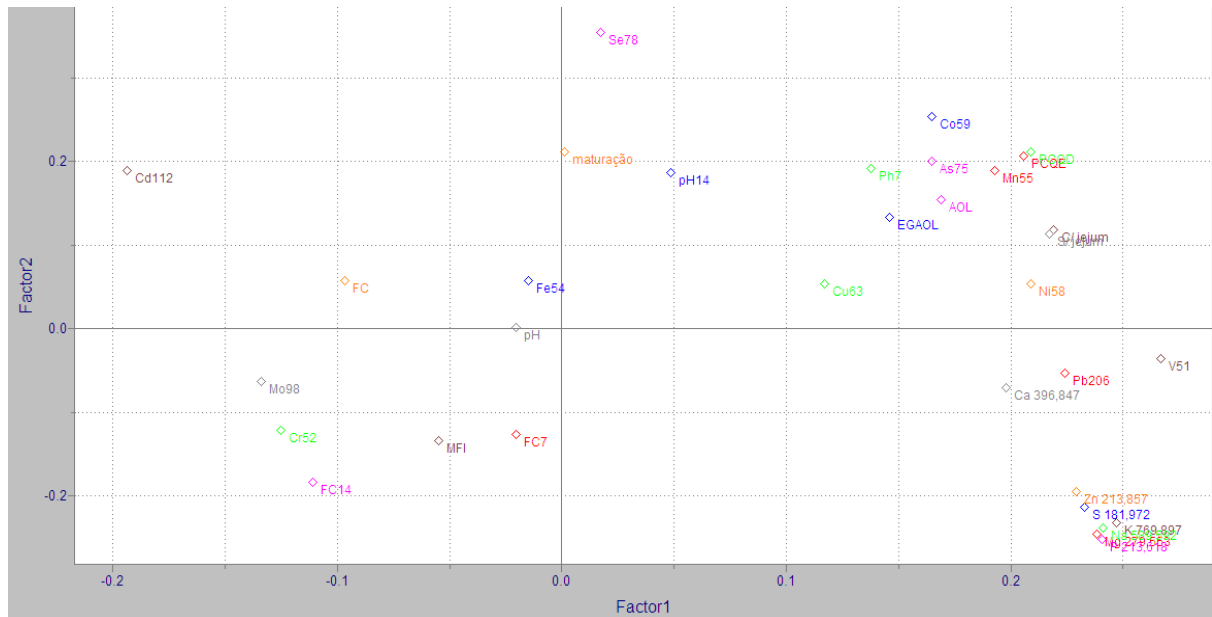


Figura 5.16 Gráfico de “loadings” da matriz de dados gerada pelas análises das 249 amostras de Nelore da Embrapa – Pecuária Sudeste.

Pelo gráfico de “loadings” é possível observar que quanto maior o teor dos elementos químicos localizados a direita da PC1 (primeiro e quarto quadrante), menor será a força de cisalhamento e conseqüentemente maior será a maciez da carne; além disso, as características AOL e a EGAOL também encontra-se no lado oposto da força de cisalhamento, confirmando que quanto maior for esses valores, maior será a maciez da amostra.

Visando relacionar o perfil dos elementos químicos com a maciez da carne foi feita uma análise empregando o SAS através de um modelo que tinha como resposta a força de cisalhamento (FC) e continha os elementos químicos Ca, Na e K. A FC é uma medida inversamente proporcional à maciez, que foi realizada nas amostras coletando bife de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi* (contra filé), entre a 12ª e 13ª costela, e seus resultados foram obtidos através do laboratório de carne da Embrapa Pecuária Sudeste após as amostras terem sido assadas e resfriadas com temperaturas controladas, sendo coletados oito cilindros, paralelamente ao sentido das fibras musculares, utilizando-se um vazador com 1,27 cm de diâmetro. A força necessária para cortar transversalmente esse cilindro é denominada de FC sendo determinada em texturômetro Texture Analyzer TA - XT2i,

acoplado à lâmina Warner-Bratzler com 1,016 mm de espessura. Quanto maior a FC, menor é a maciez da carne.

A tabela 5.14 apresenta os valores de P para analisar quais fatores interferem na maciez da carne, sendo adotada a característica FC como resposta.

Tabela 5.14. Análise estatística para avaliar a influência dos elementos químicos sobre a maciez de carne.

| Fonte de variação | Valor de P |
|----------------------------------|----------------------|
| | Característica FC |
| Grupo de contemporâneos | <0,0001** |
| Pai | 0,3288 |
| Ca | 0,4355 |
| K | 0,0051** |
| Na | 0,0030** |
| pH | 0,3498 |
| Idade do animal na data do abate | 0,7507 |

*P<0,05; **P<0,01

É possível observar que o grupo de contemporâneos gerado afeta na maciez da carne; isso está associado ao fato de que de acordo com o local de nascimento, o animal tem um manejo diferenciado, por exemplo, em determinada fazenda ele pode ter andado mais durante o período dos 18 meses iniciais, o que diminui a maciez da carne; além disso, fatores ambientais e climáticos também afetam o grupo de contemporâneos. Já o progenitor, o pH da amostra de carne e a idade do animal não mostraram significância estatística em relação a maciez da carne. O Ca apesar de ser relacionado com o sistema proteolítico da calpaína e da calpastatina também não demonstrou-se uma variável significativa. Já os teores de

Na e K, a um nível de confiança de 99% ($P < 0,01$) mostraram-se correlacionados com a maciez da carne; esse fato pode estar associado a situações relacionadas à bomba de Na e K das células que participam do processo de diminuição da força de cisalhamento.

A figura 5.17 apresenta o gráfico de “scores” dessas amostras, sendo selecionada como classe a safra em que o animal foi abatido.

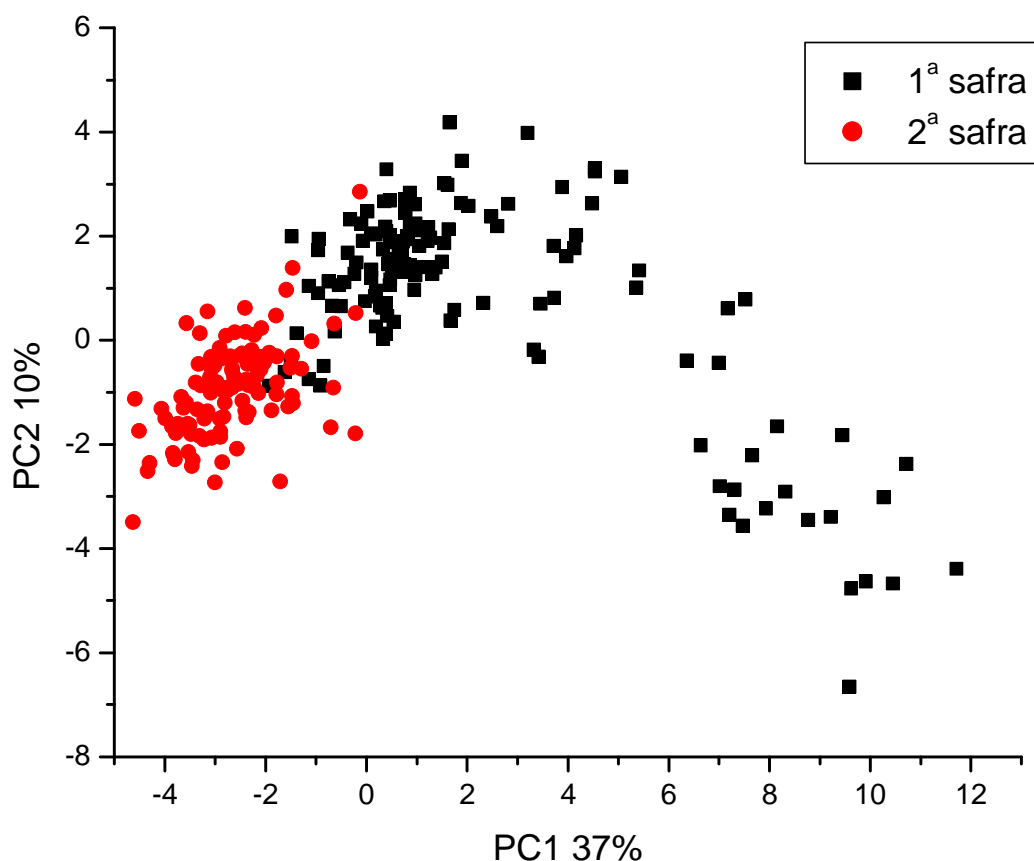


Figura 5.17 Gráfico de “scores” (classe selecionada: Safra) obtidos pela matriz gerada através da varredura espectral das 249 amostras de Nelore de São Carlos pertencente ao projeto BifeQuali.

Mesmo se tratando apenas das amostras de Nelore de São Carlos, novamente é possível observar a separação de acordo com as safras, sendo que os fatores climáticos contribuíram nessa separação.

Foram realizadas análises empregando os coeficientes de correlação de Pearson e os resultados demonstraram, em consonância com os resultados obtidos pela PCA mostrada na Figura 5.16, que o efeito dos elementos químicos Ca,

Na e K sobre a FC foram negativos; o valor do Ca foi de $-0,2396$, o Na foi de $-0,23423$ e o K foi de $-0,2164$ ou seja, quanto maior a FC (menor for a maciez), menor é a concentração desses elementos químicos, se esse resultado for relacionado as safras (Figura 5.17), é possível observar que a safra 1, onde houve menos chuva, encontrado teores maiores de elementos químicos, apresentou carne mais macia (com menores força de cisalhamento).

Conclusão

6. Conclusão

O método de preparo de amostra empregando digestão assistida por radiação micro-ondas foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho, mostrando precisão e exatidão; contudo a extração ácida empregando HNO_3 também apresentou-se como uma alternativa interessante a ser utilizada.

O emprego de padrão interno melhorou a qualidade analítica dos resultados, corrigindo interferências da amostra, contribuindo com a exatidão da metodologia.

Entre as 650 amostras analisadas no trabalho, apenas 3 apresentaram teores de Pb acima do valor permitido pela legislação nacional que relata sobre os teores de As, Cd e Pb; isso indica possibilidade de contaminação do sal elemento químico, uma vez que as três amostras eram da mesma região.

A utilização do modo “*full mass scan*” empregando ICP-MS é uma alternativa que pode disponibilizar muitas informações para estudos que empregam análise multivariada; contudo o equipamento utilizado no desenvolvimento do trabalho perde sensibilidade e faz-se necessário um aumento na voltagem do detector, fato que leva a diminuição da vida útil do mesmo. As análises empregando essa metodologia mostraram agrupamentos relacionados com o grupo genético do animal, fato interessante uma vez que está cada vez mais usual a comercialização de carnes de acordo com a raça do animal.

Como alternativa foi empregada a varredura espectral por ICP OES que disponibilizou informações relacionadas às amostras; sendo evidente a separação pela safra do animal. Os fatores climáticos afetam no perfil de elementos químicos e na qualidade da alimentação do rebanho. Além disso, o local de confinamento também se apresentou como uma variável importante, mostrando o agrupamento de acordo com o local onde a mesma foi confinada.

Através das análises de PCA e as realizadas empregando o SAS foi possível observar a correlação entre Na e K com a maciez da carne; o Ca não apresentou correlação estatisticamente significativa; contudo foi possível observar através do coeficiente de Pearson que a contribuição desses elementos químicos é

negativa, ou seja, quanto maior a concentração desses, menor será a força de cisalhamento, dessa forma, maior será a maciez do contra-filé.

Estudos de correlação entre os elementos químicos e a espessura de gordura, o pH, a maturação poderão ser desenvolvidos futuramente. O trabalho contribuiu para a construção do banco de dados das amostras do projeto BifeQuali, que visa a melhora da qualidade da carne nacional.

Referências

7. Referências

- ABIEC.** Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Pecuária Brasileira. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 17 dez. 2011.
- ABU-SAMRA, A.; MORRIS, J.S. & KOIRTYOHANN, F. "Wet ashing of some biological samples in a microwave oven". *Anal. Chim. Acta.*, **47** (8): 1474, 1975.
- AGAZZI, A. & PIROLA, C. "Fundamentals, methods and future trends os environmental microwave sample preparation". *Microchem. J.*, **67**: 337, 2000.
- ARRUDA, M. A. Z. & SANTELLI, R. E. "Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da art". *Química. Nova*, **20**: 638, 1997.
- ANUALPEC 2011. **Anuário da pecuária brasileira.** São Paulo: Angra FNP, 2011.
- ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A., "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digstion of plant materials". *Spectrochim. Acta B.*, **57**: 2121, 2002.
- BAHAR, B.; SCHMIDT, O.; MOLONEY, A. P.; SCRIMGEOUR, C. M.; BEGLEY, I. S. & MONAHAN, F. J. "Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef". *Food Chemistry*, **106**, 1299, 2008.
- BANDURA, D. R.; BARANOV, V. I. & TANNER, S. D. "Reaction chemistry and collisional processes in multipole devices for resolving isobaric interferences in ICP-MS". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**: 454, 2001.
- BARRETO, S. R. G.; NZAKI, J.; OLIVEIRA, E.; NASCIMENO FILHO, V. F.; ARAGÃO, P. H. A.; SCARMINIO, I. & BARRETO, W. J. "Comparison of metal analysis in sediments using EDXRF and ICP OES with the HCl and Tessie extraction methods". *Talanta*, **64**: 345, 2004.
- BATISTA, B. L.; GROTTTO, D; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O. & BARBOSA JR, F. "Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature". *Anal. Chim. Acta.*, **646**: 23, 2009.

BENDER-FILHO, R. *O mercado de carne bovina no Brasil: os efeitos da eliminação das barreiras tarifárias e não-tarifárias*. Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Economia – PUCRS, 2006. Dissertação de mestrado, 136 p.

BENICASA, C.; LEWIZ, J.; PERRI, E.; SINDONA, G. & TAGARELLI, A. "Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis". *Anal. Chim. Acta* **585** : 366, 2007.

BERNARD, A.; BROECKAERT, F.; POORTER, G.; COCK, A.; HERMANSA, C.; SAEGERMANB, C. & HOUINS, G. "The Belgian PCB/Dioxin Incident: Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation". *Environmental Research.*, **88** (1): 1, 2002.

BEZERRA, M. A.; BRUNS, R. E. & FERREIRA, S. L. C. "Statistical design-principal component analysis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP OES". *Anal. Chim. Acta* **580** (2): 251, 2006.

BOCK, R. **A Handbook of Decomposition Methods in Analytical Chemistry**. Londres: International Text Book Company, 1979.

BRADLEY, R.; COLLEE J. G. & LIBERSKI P. P. "Variant CJD (vCJD) and Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1". *Folia Neuropathol.*, **44** (2): 93, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 9 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000001&seqAto=000&valorAno=2002&orgao=MAA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 13 de julho de 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000017&seqAto=000&valorAno=2006&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=&nomeTitulo=>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº24, de 9 de agosto de 2011. Disponível em: <<http://http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAto&tipo=INM&numeroAto=00000024&seqAto=000&valorAno=2009&orgao=SDA/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

CAMIN, F.; BONTEMPO, L.; HEINRICH, K.; HORACEK, M.; KELLY, S. D.; SCHLICHT, C.; THOMAS, F. ; MONAHAN, F. J.; HOOGEWERFF, J. & ROSSMANN, A. "Multi-element (H,C,N,S) stable isotope characteristics of lamb meat from different European regions". *Anal. Bioanal. Chem.*, **389** : 309, 2007.

CHALLINOR, J. M. "A pyrolysis-derivatisation-gas-chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers". *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **16**: 323, 1989.

CINDRIĆ I. J.; ZEINER, M.; KRÖPPL, M. & STINGEDER, G. "Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices". *Microchem. J.*, **99** (2): 364, 2011.

CLOQUER, C.; CARIGNAN, J.; LEHMANN, M. F. & VANHAECKE, F. "Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc isotopes in biogeosciences: a review". *Anal. Bioanal. Chem.*, **390** : 451, 2008.

COSTA, D.; ABREU, J. B. R.; MOURÃO, R. C.; SILVA, J. C. G.; RODRIGUES, V. C.; SOUSA, J. C. D.; MARQUES, R. A. F. "Características de carcaça de novilhos inteiros Nelore e F1 Nelore X Holandês". *Ciência Animal Brasileira*, **8** (4): 687, 2007.

COSTA, L. M.; SANTOS, D. C. M. B.; HATJE, V.; NÓBREGA, J. A. & KORN, M. G. A. "Focused-microwave-assisted acid digestion: Evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples". *Journal of Food Composition and Analysis*, **22** : 238, 2009.

COZZOLINO, D.; KWIATKOWSKI, M. J.; DAMBERGS, R. G.; CYNKAR, W. U.; JANIK, L. J.; SKOUROUMOUNIS, G. & GISHEN, M. "Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression". *Talanta*, **74** : 711, 2008.

DEMIREZEN, D. & URUÇ, K. "Comparative study of trace elements in certain

fish, meat and meat products". *Meat Science*, **74**: 255, 2006.

DUBUISSON, C.; POUSSEL, E. & MERMET, J.M. "Comparison of ionic lines-based internal standardization with axially and radially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry to compensate for sodium effects on accuracy", *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**: 1265, 1998.

DULUDE, J. "Selecting the best ICP sample introduction system". *Spectroscopy*, October, 2005. Disponível em: <<http://spectroscopyonline.findanalytichem.com/spectroscopy/article/articleDetail.jsp?id=557697&sk=&date=&pageID=4>>. Acesso em: 26 dez. 2011.

FABANI, M. P.; ARRÚA, R. C.; VÁZQUEZ, F.; DIAZ, M. P.; BARONI, M. V. & WUNDERLIN, D. A. "Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines". *Food Chemistry*, **119** : 372, 2010.

GAIA-UFSCar, Embrapa Pecuária Sudeste. "Preparo de amostras por radiação micro-ondas: uma compilação de procedimentos da literatura", CD-ROOM, 2006.

GAINES, P. "Sample introduction for ICP-MS and ICP OES". *Spectroscopy*, January, 2005. Disponível em:

<<http://www.inorganicventures.com/tech/guides/technical/sample-introduction-for-icp-ms-and-ICP OES.pdf> >. Acesso em: 26 dez. 2011.

GARCIA-REY, R. M.; QUILES-ZAFRAM R. & CASTRO, M. D. "New methods for acceleration of meat sample preparation prior to determination of the metal content by atomic absorption spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377** (2): 316, 2003.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L.; NÓBREGA, J. A. & NOGUEIRA, A. R. A. "Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products". *Talanta*, **79**: 396, 2009.

GONZALVEZ, A.; ARMENTA, S. & GUARDIA, M. "Geographical traceability of "Arròs de Valencia" rice grain based on elemental chemical composition". *Food Chemistry*, **126** : 1254 (2011).

- GONZALVEZ, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S. & GUARDIA, M. "A review of non-chromatographic methods for speciation analysis". *Anal. Chim. Acta*, **636**: 129, 2009
- GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configuration". *Anal. Chim. Acta*, **445**: 269, 2001.
- GÜNTHER-LEOPOLD, I.; KIVEL, N.; WALDIZ, J. K. & WERNLI, B. "Characterization of nuclear fuels by ICP mass-spectrometric techniques". *Anal Bioanal Chem*, **390**: 503, 2008.
- HEBERT, C. G. **Mass Spectrometry Basics**. Flórida: CRC Press, Boca Raton, 2002.
- HEUMANN, K. G. & VANHAECKE, F. "Isotope ratios in analytical chemistry", *Anal Bioanal Chem*, **390**: 433, 2008.
- 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.
- HOUK, R. S. "Inductively coupled plasma-mass spectrometry and the European discovery of America". *J. Chem. Educ.*, **77**: 598, 2000.
- HOUK, R. S. "Mass spectrometry of inductively coupled plasmas". *Anal. Chem.*, **58**: 97, 1986.
- HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCHE, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A. L. & TAYLOR, C. E. "Inductively coupled argon plasmas as ion sources for mass spectrometric determination of trace elements". *Anal. Chem.*, **52**: 2283, 1980.
- IGLÉISIS, M.; VACULOVIC, T.; STUDYKNOCA, J.; POUSSSEL, E. & MERMET, J. M. "Influence of 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.
- ISO, Soil quality, Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia. ISO 11466, 1995.

ISO, Quality management and quality assurance. ISO 8402, 1995,

JACKSON, A. J.; MICHAEL, L. M. & SCHUMACHER, H. J. "Improved tissue solubilization for atomic absorption", *Anal. Chem.* **44**: 1064, 1972.

KAROUI, R. & BAERDEMAEKER, J. "A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products". *Food Chemistry*, **102** : 621, 2007.

KILBRIDE, C.; POOLE, J. & HUTCHINGS, T. R. "A comparison of Cu, Pb, As, Cd, Zn, Fe, Ni and Mn determined by acid extraction/ICP–OES and ex situ field portable X-ray fluorescence analyses" *Environ. Pollution*, **143** (1): 16, 2006.

KINGSTON, H. M. & JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation**. Washington: American Chemical Society, 1988.

KINGSTON H. M. & HASWELL, S. J. **Microwave-Enhanced Chemistry – Fundamentals, Sample Preparation and Applications**. Washington: American Chemical Society, 1997.

KOPPENAAL, D. W. & EIDEN, G. C. "Special Issue, Collision and Reaction Cell Techniques in Atomic Mass Spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 561, 2004.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª. ed. Piracicaba, 2008.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M.; AMARASIRIWARADENA, C.J.; FONER, H. & MARTINES, L. "Determination of the residual carbon content by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological sample". *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**: 845, 1992.

LARNER, B. L.; PALMER, A. S.; SEEN, A. J. & TOWNSEND, A. T. "A comparison of an optimised sequential extraction procedure and dilute acid leaching of elements in anoxic sediments, including the effects of oxidation on sediment metal partitioning". *Anal. Chim. Acta* **608**: 147, 2008.

LEBEQUE, A.; LAGUET, A.; DEVAUX, M. F. & DUFOUR, E. "Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods". *Le Lait*, **81**: 609, 2001.

LUCHIARI, A. F. Beefpoint: por que rastreabilidade? Disponível em:

<<http://www.beefpoint.com.br/secoes/radar/printpage.asp>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

MAAR, J. H. **Pequena História da Química**. Florianópolis: Papa-Livro, 1999.

MANUTSEWEE, N.; AEUNGMAITREPIROM, W.; VARANUSUPAKUL, P. & IMYIM, A. "Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction" *Food Chemistry*, **101** (2): 817, 2007.

MATIC, S.; MIHOKOVIC, V.; KATUSIN-RAZEM, B. & RAZEM, D. "The eradication of Salmonella in egg powder by gamma irradiation". *Journal of food protection*, **53** (2): 111, 1990.

MATUSIEWICZ, H. & GOLIK, B. "Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization". *Microchem. J.* **76**: 23, 2004.

MAY, T. W. & WIEDMEYER, R. H. "A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS". *Atomic Spectroscopy*, **19** (5): 150, 1997.

MELO, M. H. A.; COSTA, A. C. S.; NÓBREGA, J. A. & FERREIRA, S. L. C. "The use of water soluble tertiary amine reagent for solubilization and metal determination in fish muscle tissue". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16** (1): 69, 2005.

MERMET, J. M. & POUSSEL, E. "ICP emission spectrometers: analytical figures of merit". *Appl. Spectrosc.*, **49**: 1, 1995.

MONTASER, A. & GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectroscopy**. New York: VCH Publisher, 1992.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. & BLOCK, M. F. "Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass (grass) leaf tissues by HCl extraction method". *Commun. in soil sci. plant anal.*, **15**: 141, 1984.

NASCENTES, C.; KORN, M. & ARRUDA, M. A. Z. "A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables". *Microchem. J.*, **69** (1): 37, 2001.

NÓBREGA, J. A.; BARNES, R. M.; GÉLINAS, Y. & KRUSHEVSKA, A. "Determination of elements in biological and botanical materials by ICP-AES and ICP-MS after extraction with a tertiary amine reagent". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **12** (10): 1239, 1997.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUZA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M. & TATRO, M. "Sample preparation in alkaline media". *Spectrochim. Acta B.*, **61**: 465, 2006.

NOMURA, C. & VITORIANO, P. "Method for cadmium and lead longitudinal profiles determination in hair by solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Methods.*, **2** : 49, 2010.

OLIVEIRA, E. "Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: (2): 174, 2003

OLLIVIER, D.; ARTAUD, J.; PINATEL, C.; DURBEC, J. P. & GUÉRÈRE, M. "Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions and chemometrics". *Food Chemistry*, **97**: 382, 2006.

OYMAK, T.; TOKALIOGLU S.; YILMAZ, V.; KARTAL, S. & AYDIN, D. "Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method". *Food Chemistry*, **113**: 1314, 2009.

PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E. ; SILVA, F. V. ; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. "Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface". *Spectrochim. Acta B.*, **25**: 1763, 2010.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L. & CURTIUS, A. J. "Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide" *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**: 1101, 1998.

Regulation (EC) No 1760/2000 of the European Parliament and of the Council

of 17 July 2000. Disponível em: < http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32000R1760&model=guichett>. Acesso em: 19 dez. 2011.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; FEIJÓ, G. L. D.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; BERNARDES, R. A. C.; FATURI, C. & PACHECO, P. S. "Características de Carcaça de Bovinos de Corte Inteiros ou Castrados de Diferentes Composições Raciais Charolês X Nelore". *Rev. Bras. Zootec.*, **29** (5): 1371, 2000.

RODUSHKINA, I.; ENGSTRÖMA, E.; SÖRLIN, D & BAXTER, D. "Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market". *Science of the total environment.*, **392**: 290, 2008.

ROMARÍS-HORTAS, V.; MOREDA-PIÑEIRO, A. & BERMEJO-BARRERA P. "Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination". *Talanta*, **79** (3): 947, 2009.

SALÁZAR, R. F. S.; GUERRA, M. B. B.; PEREIRA-FILHO, E. R. & NÓBREGA, J. A. "Performance evaluation of collision-reaction interface and internal standardization in quadrupole ICP-MS measurements". *Talanta*, **86**: 241, 2011.

SANTOS, D. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NEVES, E. F. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. & NÓBREGA, J. A. "Análise química inorgânica de leite e simulação do reagente CFA-C". *Eclét. Quím.* **27**, 61, 2002.

SASTRE, J.; SAHUQUILLO, A.; VIDAL, M. & RAURET, G. "Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction". *Anal. Chim. Acta.*, **462**: 59, 2002.

SOFOS, J. N. "Challenges to meat safety in the 21st century". *Meat Science.*, **78**, 3, 2008.

SOL, D.; WATERS, J. K.; MAWHINNEY, T. P. "Microwave Digestion with HNO₃-H₂O₂-HF for the Determination of Total Aluminum in Seafood and Meat by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 2115, 1997.

SOUZA, R. M.; SARACENO, A. L.; SILVEIRA, C. L. P. & AUCÉLIO, R. Q. "Determination of trace elements in crude oil by ICP OES using ultrasound-assisted acid extraction". *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**: 1345, 2006.

SWOBODA, S.; BRUNNER, M.; BOULYGA, S. F.; GALLER, P.; HORACEK, M. & PROHASKA, T. "Identification of Marchfeld asparagus using Sr isotope ratio measurements by MC-ICP-MS". *Anal. Bioanal. Chem.* **390** : 487, 2008.

TAGAMI, K., UCHIDA, S., HIRAI, I., TSUKADA, H. & TAKEDA, H. "Determination of chlorine, bromine and iodine in plant samples by inductively plasma-mass spectrometry after leaching with tetramethyl ammonium hydroxide under a mild temperature condition". *Anal. Chim. Acta.*, **570**: 88, 2006.

TAN, S. H. & HORLICK, G. "Background spectral features in inductively coupled plasma / mass spectrometry". *Appl. Spectrosc.*, **40**: 445, 1986.

TANNER, S. D., BARANOV, V. I., BANDURA, D. R. "Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review". *Spectrochim. Acta B*, **57**: 1361, 2002.

TREVISAN, L. C.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Single vessel procedure for acid vapor partial digestion of bovine liver in a focused microwave oven and the residual carbon content". *Talanta*, **61**: 81, 2003.

TUZEN, M.; SOYLAK, M.; CITAK, D.; FERREIRA, H. S.; KORN, M. G. A. & BEZERRA, M. A. "A preconcentration system for determination of copper and nickel in water and food samples employing flame atomic absorption spectrometry". *Journal of Hazardous Materials* **162** : 1041, 2009.

UCHIDA, T.; ISOYAMA, H.; YAMADA, K.; OGUCHI, K.; NAKAGAWA, G.; SUGIE, H. & IIDA, C. H. "Determination of twelve elements in botanical samples with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after leaching with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid". *Anal. Chim. Acta.*, **256**: 277, 1992.

VAUGHAN, M. A. & HORLICK, G. "Oxide, hydroxide, and doubly charged analyte species in inductively coupled plasma / mass spectrometry". *Appl. Spectrosc.*, **40**: 434, 1986.

WASILEWSKA, M., GOESSLER, W., ZISCHKA, M., MAICHIN, B. & KNAPP, G. "Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements". *J. Anal. At. Spectrom.* **17** : 1121, 2002.

YAFA, C. & FARMER, C. "A comparative study of acid-extractable and total digestion methods for the determination of inorganic elements in peat material by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta.*, **557**: 296, 2006.

ZSCHUNKE, A. "Metrology in chemistry – Analytica". *Accreditation and Quality Assurance*, **6**, 2, 2000.