

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Rosilene da Silva Nascimento

Aplicação de Métodos Quimiométricos para a
Determinação de Constituintes Inorgânicos
em Leite Materno por ICP-MS e ICP OES

Belo Horizonte
2008

**UFMG 671
D419**

Rosilene da Silva Nascimento

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS
EM LEITE MATERNO POR ICP-MS E ICP OES**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Borba da Silva

Co-orientador: Dr. Waldomiro Borges Neto

**Belo Horizonte
2008**

N244a Nascimento, Rosilene da Silva

2008

D

Aplicação de métodos quimiométricos para a determinação de constituintes inorgânicos em leite materno por ICP-MS e ICP OES./ Rosilene da Silva Nascimento. 2008.

140 f.: il.

Orientador: José Bento Borba da Silva
Co-Orientador: Waldomiro Borges Neto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

1. Química analítica - Teses I. Orientador II. Co-Orientador III. Título.

CDU:043

Aos meus amados pais, Aldeide e Irani, ao meu querido noivo Arilson e aos demais amigos pelo companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suas incessantes bênçãos sobre mim e a todos os meus queridos, que sempre me levantou quando tropecei, que sempre me encorajou quando fraquejei, glórias a ti Senhor.

Ao querido Professor Dr. José Bento Borba da Silva, por me fornecer a oportunidade de realização deste trabalho, pela sua orientação, pelo profissionalismo, paciência, pela confiança depositada e, sobretudo pela sua valiosa amizade conquistada durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Waldomiro Borges Neto, que mais do que um co-orientador, com todo o seu profissionalismo, seus ensinamentos, conselhos, sua dedicação, tornou-se uma pessoa muito especial em minha vida, no qual tenho muita admiração, não somente pelo profissional, mas também pelo grande ser humano que você é. Obrigada por tudo.

Ao Dr. Júlio César José da Silva, por sua disponibilidade e por tantos ensinamentos que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Virgínia Sampaio Teixeira Ciminelli e ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais, pela viabilização dos experimentos em suas dependências.

Ao Professor Dr. Wellington Ferreira de Magalhães pelos ensinamentos e pela atenção concedida.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Judith, Ângela e Ronaldo, pela prontidão sempre constante. Muito obrigada.

A Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela viabilização dos experimentos em suas dependências.

A Roberta Eliane Santos Froes, pela sua disponibilidade, pelo seu apoio e por tudo o que fez por mim, nesta difícil caminhada.

A Maternidade Odete Valadares e a bioquímica Denise Bastos C. Mendes, pela concessão de amostras e por todo o empenho dedicado a este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG por todo apoio concedido.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química, em especial as secretárias da Pós-Graduação.

Aos meus pais, Aldeide e Irani, por terem feito de mim um ser humano, capaz de amar, de acolher e de sorrir. Obrigada por tanto carinho e amor dedicados a mim. Amo vocês...

Ao meu noivo Arilson, por tanto amor, carinho e compreensão. Um anjo que está ao meu lado, compartilhando alegrias e tristezas. Obrigada por você existir.

As amigas Simone e Flávia, que tanto sorriram e choraram comigo. Nunca esquecerei dos momentos que compartilhamos juntas. Obrigada pelas amizades, que são cada dia mais aconchegadas em meu coração.

Ao amigo Helvécio pela disponibilidade e principalmente pelas caronas na época em que cursamos disciplinas, sem as quais não teria sido possível concluí-las.

A todos os amigos do GEAPA: Simone, Flávia, Frank, Roberta, Paulo, Camilla, Luciano, Henrique, Helga, Walter, Renato, Yuri, Mateus, Carlos, Edgard, que tanto contribuíram para este trabalho. Nunca me esquecerei dos momentos em que passamos juntos, dos congressos, das viagens e principalmente das gargalhadas.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada a todos...

“Está instaurada a dúvida.
A metódica dúvida epistemológica.
Neste mundo a Terra não está no centro
nenhum saber é saber completo.
Seja bem-vinda era da razão.
Não há que se temer a revisão.
Nada que se diga ou que foi dito
merece estatuto de dogma irrestrito.

Cuidado com a verdade
que se pretende
maior que a realidade,
pois, os fatos são os fatos
e fluem diante de nós
que estupefatos
assistimos ao espetáculo”

(Galileu Galilei)

RESUMO

APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM LEITE MATERNO POR ICP-MS E ICP OES

O leite materno constitui-se na única fonte de nutrientes durante os primeiros meses de vida da criança e conseqüentemente, sua composição elementar é de fundamental importância para o crescimento infantil e o correspondente estado de saúde desejado. Neste trabalho, quantificamos os seguintes elementos ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As por ICP-MS e por ICP OES os elementos Ca, K, Mg, Na, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, Ba, Al, Cd, Pb, V, Ni, Co e Li, todos presentes em leite materno colostro e maduro. Neste estudo também foi realizada a verificação dos métodos de regressão linear, Método dos Mínimos Quadrados Ordinário (MMQO) e o Método dos Mínimos Quadrados Ponderado Absoluto (MMQPA), utilizados para fazer a calibração do método analítico, por ser esta uma importante etapa do processo analítico. A avaliação do ajuste escolhido, foi realizada utilizando os resíduos padronizados e o χ^2_{red} . Também utilizamos as curvas do limite de confiança do ajuste, juntamente com a reta de calibração, e as curvas do limite de previsão do ajuste, para termos uma melhor estimativa de possíveis valores espúrios (*outlier*), ou seja, valores que não pertencem à mesma população de dados. Comparamos vários métodos para expressar os limites de detecção e de quantificação dos métodos analíticos, demonstrando a grande dificuldade que temos quando da escolha destes métodos, por não termos nenhuma padronização de qual método utilizar. A precisão das análises realizadas por ICP-MS, expressa como desvio padrão relativo (R.S.D.), foi melhor ou igual a 3,4% e para as análises feitas por ICP OES, a precisão foi melhor ou igual a 3,3%. Para avaliar a exatidão dos métodos, estudos envolvendo adição e recuperação de analito também foram utilizados. As recuperações para as análises realizadas por ICP-MS, foram na faixa de 80,8 - 110,9% e para as análises realizadas por ICP OES, estiveram na faixa de 83,1 - 117,3%. Os valores obtidos tanto para o ICP-MS quanto para o ICP OES, comparados com os valores recomendados, no material de referência certificado, apresentaram concordância entre si, para um nível de confiança de 95%. Com isso, podemos concluir que os métodos propostos são adequados para determinação de elementos analisados por ICP-MS e por ICP OES, presentes em leite materno. Verificamos também que não existe diferença significativa entre os dois métodos, sendo possível a determinação dos metais estudados em ambas as técnicas.

ABSTRACT

APPLICATION OF CHEMOMETRICS METHODS FOR DETERMINATION OF INORGANIC CONSTITUENTS IN HUMAN MILK BY ICP-MS AND ICP OES

The human milk is constituted in the only source of nutrients during the first months of the child's life and consequently, its elementary composition is of fundamental importance for the infantile growth and the correspondent wanted health condition. In this work, we quantified the elements ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co and ^{75}As by ICP-MS; and by ICP OES, the elements Ca, K, Mg, Na, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, Ba, Al, Cd, Pb, V, Ni, Co and Li, all presents in mature and colostrums human milk. In this study it was also made the verification of the methods of linear regression, OLS (Ordinary Least Square) and (WLS) Weighted Least Square, used to do the calibration of the analytical method, for being this an important stage of the analytical process. The evaluation of the chosen adjustment, it was accomplished using the standardized residues and the χ^2_{red} . We also used the curves of the confidence limits of the adjustment, together with the calibration curve line, and the curves of the prediction limits of the adjustment, for terms a better estimate of possible spurious values (outlier), in other words, values that don't possess the same population of data. We compared several methods to express the detection and quantification limits of the analytical methods, demonstrating the great difficulty that we have when of the choice of these methods, for we have not any standardization of which method to use. The precision of the analyses accomplished by ICP-MS, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), it was better or equal to 3.4% and for the analyses made by ICP OES, the precision was better or equal to 3.3%. Para to check the accuracy of the methods, studies involving spike and recovery was also used. The recoveries for the analyses accomplished by ICP-MS, were in the range of 80.8 – 110.9% and for the analyses accomplished by ICP OES, were in the range of 83.1 – 117.3%. The values obtained as by ICP-MS as by ICP OES, compared with the recommended values in the certified reference material, presented agreement amongst themselves, for a confidence level of 95%. With that, we can conclude that the proposed methods are adapted for quantification of the elements analyzed by ICP-MS and by ICP OES, presents in human milk. We also verified that significant difference doesn't exist among the two methods, being possible the determination of the studied metals as by ICP-MS as ICP OES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Aquecimento assistido por radiação microondas: o recipiente sofre um aquecimento secundário com possibilidade de superaquecimento localizado.....	14
Figura 1.2. Modelos de fornos de microondas. (a) Forno de microondas em sistema fechado. (b) Forno de microondas em sistema aberto com radiação focalizada.....	15
Figura 3.1. Gráfico da curva de calibração ajustada pelo MMQO, juntamente com as curvas de limite de confiança e limite de previsão do ajuste.....	44
Figura 3.2. Gráfico da curva de calibração ajustada pelo MMQPA, juntamente com as curvas de limite de confiança e limite de previsão do ajuste.....	45
Figura 3.3. Definição dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	51
Figura 4.1. Subdivisões do espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado ELAN 9000 PerkinElmer.....	55
Figura 4.2. (a) Esquema de uma tocha, constituída de três tubos concêntricos, acoplada a uma bobina de indução de um gerador de radiofrequência. (b) Representação do campo magnético gerado pela corrente que circula a bobina.....	56
Figura 4.3. Estágios que o analito atravessa até atingir a atomização e ionização.....	57
Figura 4.4. Curvas de calibração aquosa e ajuste de matriz para o elemento ^{138}Ba	67

Figura 4.5. Curvas de calibração dos analitos em água e em leite materno digerido, determinados por ICP-MS, demonstrando a linearidade na faixa estudada.....	68
Figura 4.6. Comportamento heterocedástico dos dados, para o elemento ^{138}Ba	70
Figura 4.7. Comportamento homocedástico dos dados, para o elemento ^{57}Fe	71
Figura 4.8. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP-MS.....	73
Figura 4.9. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP-MS, continuação.....	74
Figura 4.10. Curvas: de calibração, do limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{138}Ba , calibrado através do MMQPA e analisado por ICP-MS.....	76
Figura 4.11. Curvas de calibração, de limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{65}Cu , calibrado através do MMQO e analisado por ICP-MS.....	77
Figura 5.1- Regiões do plasma. [IR – Região de indução, PHZ – Região de pré-aquecimento, IRZ – Região inicial de radiação, <u>NAZ</u> – região analítica, “Tail Plume” - região de menor temperatura ($\pm 6000^\circ\text{C}$)].....	90
Figura 5.2 - Modos de observação do plasma. (A) Visão radial, (B) Visão Axial.....	90
Figura 5.3. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP OES.....	104
Figura 5.4. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP OES, continuação...105	

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.1. Teores dos principais constituintes do leite materno.....	4
Quadro 1.1. A importância e a deficiência para o organismo em relação a alguns minerais....	6
Quadro 1.2. A importância e a deficiência para o organismo em relação a alguns minerais, continuação.....	7
Tabela 1.2. Porcentagem de alguns metais em cada fração do leite materno.....	7
Quadro 3.1. Limite de detecção – Breves recomendações.....	49
Quadro 3.2. Limite de quantificação – Breves recomendações.....	50
Tabela 4.1. Parâmetros operacionais para o ICP-MS.....	60
Tabela 4.2. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, em forno de microondas.....	61
Tabela 4.3. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de material de referência certificado, em forno de microondas.....	61
Tabela 4.4. Parâmetros analíticos para o elemento ^{138}Ba	66
Tabela 4.5. Comparação entre os métodos MMQO e MMQPA, para análises feitas utilizando ICP-MS.....	72
Tabela 4.6. Valores de χ_{red}^2 para os elementos analisados por ICP-MS.	75
Tabela 4.7. Métodos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	78

Tabela 4.8. Limites de detecção, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno.....	79
Tabela 4.9. Limites de quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno.....	79
Tabela 4.10. Limites de quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno, continuação.....	80
Tabela 4.11. Relação do coeficiente de correlação e equação de calibração dos isótopos analisados por ICP-MS ($n = 3$), com seus respectivos limites de detecção e de quantificação, determinados pelo método E.....	81
Tabela 4.12. Parâmetros analíticos do método, para a quantificação dos analitos por ICP-MS, em leite materno ($t_{95\%, 2} = 4,303$).....	82
Tabela 4.13. Recuperação (%) dos metais em amostras de leite materno digerido ($n = 3$), analisadas por ICP-MS.....	83
Tabela 4.14. Faixas dos analitos em leite materno, presentes na literatura, em $\mu\text{g L}^{-1}$	84
Tabela 4.15. Quantificação de amostras de leite materno colostro ($n = 3$) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$).....	85
Tabela 4.16. Quantificação de amostras de leite materno colostro ($n = 3$) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), continuação.....	86
Tabela 4.17. Quantificação de amostras de leite materno maduro ($n = 3$) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$).....	87
Tabela 4.18. Quantificação de amostras de leite materno maduro ($n = 3$) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), continuação.....	88

Tabela 5.1 - Condições operacionais para o ICP OES.....	93
Tabela 5.2 – Dados para as linhas espectrais utilizadas.....	94
Tabela 5.3. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, em forno de microondas.....	95
Tabela 5.4. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de material de referência certificado, em forno de microondas.....	95
Tabela 5.5. Comparação entre os métodos MMQO e MMQPA, para análises realizadas no ICP OES.....	102
Tabela 5.6. Valores de χ^2_{red} para os elementos analisados por ICP OES.....	106
Tabela 5.7. Limites de detecção, em mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos, determinados por ICP OES, em leite materno.....	107
Tabela 5.8. Limites de quantificação, em mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos, determinados por ICP OES, em leite materno.....	108
Tabela 5.9. Relação do coeficiente de correlação e equação de calibração dos analitos analisados por ICP OES (n = 3) e limites de detecção e de quantificação.....	109
Tabela 5.10. Parâmetros analíticos do método, para a quantificação dos analitos por ICP OES, em leite materno ($t_{95\%, 2} = 4,303$).....	111
Tabela 5.11. Recuperação (%) dos metais em amostras de leite materno digerido (n = 3), analisadas por ICP OES.....	112
Tabela 5.12. Faixas dos analitos em leite materno, presentes na literatura, em mg L ⁻¹ para Ca, Mg, Na e K, e em µg L ⁻¹ para os demais metais.....	113

Tabela 5.13. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP OES (mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos).....	114
Tabela 5.14. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP OES (mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos), continuação.....	115
Tabela 5.15. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP OES (mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos).....	116
Tabela 5.16. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP OES (mg L ⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L ⁻¹ , para os demais analitos), continuação.....	117
Tabela 6.1. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra A - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....	119
Tabela 6.2. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra B - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....	120
Tabela 6.3. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra C - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....	120
Tabela 6.4. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra D - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....	121

Tabela 6.5. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra E - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....121

Tabela 6.6. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra F - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).....122

Tabela 6.7. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes no material certificado NIST 1846 Infant Formula.....122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: do inglês “atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica);

BEC: do inglês “background equivalent concentration” (concentração equivalente ao fundo);

CCD: do inglês “Central Composite Design” (planejamento composto central);

CLCA: curvas do limite de confiança do ajuste

CLP: curvas do limite de previsão

CV AAS: do inglês “cold vapor atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica em vapor frio);

EIE: do inglês “easy ionizable elements” (elementos facilmente ionizáveis);

ET AAS: do inglês “electrothermal atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica);

F AAS: do inglês “flame atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica com atomização por chama);

FES: espectrometria de emissão em chama;

FI: do inglês “flow injection” (sistema de injeção em fluxo);

GF AAS: do inglês “graphite furnace atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite);

HG-AAS: do inglês “hydride generation atomic absorption spectrometry” (espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos);

ICP: do inglês “inductively coupled plasma” (plasma indutivamente acoplado);

ICP-MS: do inglês “inductively coupled plasma mass spectrometry” (espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado);

ICP OES: do inglês “inductively coupled plasma optical emission spectrometry” (espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado);

IUPAC: do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”;

LD: do inglês “limit of detection” (limite de detecção);

LQ: do inglês “limit of quantitation” (limite de quantificação);

MEA: monoetanolamina;

MMQ: Método dos Mínimos Quadrados;

MMQO: Método dos Mínimos Quadrados Ordinário;

MMQP: Método dos Mínimos Quadrados Ponderado;

MMQPA: Método dos Mínimos Quadrados Ponderado Absoluto;

MMQPR: Método dos Mínimos Quadrados Ponderado Relativo;

NAZ: do inglês “normal analytical zone” (zona normal analítica);

OLS: do inglês “Ordinary Least Square” (Mínimos Quadrados Ordinário);

RSD: do inglês “relative standard deviation” (desvio padrão relativo);

SBR: do inglês “signal to background ration” (razão do sinal de fundo);

TMAH: hidróxido de tetrametilamônio;

TRIS: hidroximetilaminometano;

WLS: do inglês “Weighted Least Square” (Mínimos Quadrados Ponderado).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS E QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
SUMÁRIO	xv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Leite Materno.....	4
1.1.1 - Minerais presentes no leite materno.....	5
1.2 - Avaliação de procedimentos de tratamento de amostras.....	7
1.2.1 - Aquecimento condutivo.....	11
1.2.2 - Aquecimento por radiação microondas.....	12
1.2.3 - Extração com ácidos.....	15
1.2.3.1 - Reações com ácido nítrico.....	17
1.2.3.2 - Reações com peróxido de hidrogênio.....	17
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 - Espectrometria de absorção atômica (AAS).....	19
2.1.1 - Procedimentos envolvendo digestão das amostras.....	19
2.1.2 - Amostras preparadas como emulsões.....	20
2.2 - Espectrometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP OES).....	22
2.2.1 - Procedimentos envolvendo digestão ácida.....	22
2.2.2 - Amostras preparadas como emulsões.....	25
2.2.3 - Especificação Química.....	26
2.4 - Espectrometria de massas acoplada a plasma induzido (ICP-MS).....	27

2.4.1 - Procedimentos envolvendo digestão ácida.....	27
2.4.2 - Amostras preparadas como suspensões.....	29
CAPÍTULO 3 - QUIMIOMETRIA.....	31
3.1 - Figuras de mérito.....	33
3.1.1 - Método dos Mínimos Quadrados.....	33
3.1.1.1 - Teoria.....	35
3.1.2 - Qualidade do ajuste do MMQ.....	40
3.1.3 - Limites de Confiança e Limites de Previsão do Ajuste.....	41
3.1.4 - Incerteza na previsão do valor da variável regressora x^*	45
3.1.5 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	48
3.1.5.1 - Limite de detecção.....	48
3.1.5.2 - Limite de Quantificação.....	49
3.1.6 - Limites de previsão na determinação de LD e LQ.....	51
CAPÍTULO 4 - ICP-MS (<i>espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado</i>).....	53
4.1 - Aspectos relacionados.....	54
4.2 - Objetivo.....	59
4.3 - Parte experimental.....	59
4.3.1 - Instrumentação.....	59
4.3.1.1 - Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado.....	60
4.3.1.2 - Forno de microondas.....	60
4.3.2 - Reagentes e soluções.....	61
4.3.3 - Amostras.....	62
4.3.4 - Procedimento.....	62
4.3.4.1 - Preparação das amostras.....	62
4.3.4.2 - Parâmetros de mérito.....	63
4.3.4.2.1 - Otimização e calibração de massas do ICP-MS.....	63
4.3.4.2.2 - Linearidade e efeito de matriz.....	63
4.3.4.2.3 - Determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ).....	64
4.3.4.2 - Precisão e exatidão.....	64
4.3.4.3 - Análise de amostras reais.....	65

4.3.4.4 - Avaliação e emprego de padrão interno.....	65
4.3.5 - Resultados e discussão.....	66
4.3.5.1 - Linearidade e efeito de matriz.....	66
4.3.5.2 - Calibração a partir do MMQO e do MMQPA.....	69
4.3.5.3 - Comparação entre o MMQO e o MMQPA.....	70
4.3.5.4 - Avaliação da qualidade do ajuste do MMQ.....	72
4.3.5.5 - Limites de Confiança e Limites de Previsão do Ajuste.....	76
4.3.5.6 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	77
4.3.5.7 - Precisão e exatidão.....	81
4.3.5.8 - Quantificação de amostras reais.....	83
CAPÍTULO 5 - ICP OES (<i>espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado</i>).....	89
5.1 - Aspectos relacionados.....	90
5.2 - Diagnóstico Mg II / Mg I.....	91
5.3 - Objetivo.....	92
5.4 - Parte experimental.....	92
5.4.1 - Instrumentação.....	93
5.4.1.1 - Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	93
5.4.1.2 - Seleção do Comprimento de Onda (λ).....	94
5.4.1.3 - Forno de microondas.....	94
5.4.2 - Reagentes e soluções.....	95
5.4.3 - Amostras.....	96
5.4.4 - Procedimento.....	96
5.4.4.1 - Preparação das amostras.....	96
5.4.4.2 - Parâmetros de mérito.....	97
5.4.4.2.1 - Verificação da estabilidade e da robustez do plasma.....	97
5.4.4.2.2 - Linearidade e efeito de matriz.....	97
5.4.4.2.3 - Determinação dos LD e LQ.....	98
5.4.4.2.4 - Precisão e exatidão.....	98
5.4.4.3 - Análise de amostras reais.....	99
5.4.4.4 - Avaliação e emprego de padrão interno.....	99
5.4.5 - Resultados e discussão.....	100
5.4.5.1 - Estabilidade do plasma.....	100

5.4.5.2 - Linearidade e efeito de matriz.....	100
5.4.5.3 - Comparação entre o MMQO e o MMQPA.....	101
5.4.5.4 - Avaliação da qualidade do ajuste do MMQ.....	103
5.4.5.5 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	106
5.4.5.6 - Precisão e exatidão.....	110
5.4.5.7 - Quantificação de amostras reais.....	112
CAPÍTULO 6 - COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS ICP-MS E ICP OES.....	118
CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXOS.....	140

Capítulo 1

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

O leite materno constitui-se na única fonte de nutrientes durante os primeiros meses de vida da criança e conseqüentemente, sua composição elementar é de fundamental importância para o crescimento infantil e o correspondente estado de saúde desejado. Certos microconstituintes essenciais mantêm a integridade estrutural e funcional da criança em crescimento, de tal modo que uma deficiência ou excesso do mesmo pode induzir mudanças fisiológicas significativas (Reilly, 1991).

Uma série de fatores relacionados com os hábitos alimentares e de vida das mães que doam leite à maternidade, pode influenciar diretamente na presença e teores de elementos essenciais e tóxicos no leite (nível sócio-econômico, faixa etária, consumo de álcool ou cigarro, tipo de alimentação, entre outros).

A despeito do papel biológico relevante, os elementos-traço são encontrados no leite, e em produtos derivados do leite, em concentrações baixas. Assim, a escolha de um método analítico para determinar elementos-traço em leite materno oferece certas dificuldades como: a concentração na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, o risco de contaminação durante o tratamento da amostra, a complexidade da matriz e em praticamente todos os casos a quantidade de amostras disponível é limitada (Silvestre *et al.*, 2000). Assim, para a análise de elementos-traço em leite materno, torna-se importante a utilização de uma técnica que seja sensível, se possível ser livre de interferências, que inclua um simples tratamento da amostra, seja rápida, precisa, possuir baixo custo e que permita uma análise multielementar, como por exemplo, a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*).

A ICP-MS tem sido uma técnica analítica padrão para análises rápidas multielementares de amostras biológicas (Krachler & Irgolic, 1999; Muñiz *et al.*, 1998) oferecendo capacidade multielementar, extrema sensibilidade e seletividade comparado à técnicas como AAS (Espectrometria de Absorção Atômica) e ICP OES.

A ICP OES é uma técnica que tem sido muito usada em química analítica devido à sua capacidade de quantificar macro e micro-elementos em matrizes complexas (Masson *et al.*, 1999). Porém, é uma técnica menos sensível comparativamente à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (Gasparics *et al.*, 2000) e à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Ryan, 1997). No entanto, essa limitação tem

sido contornada com o posicionamento horizontal da tocha (configuração axial) que aumenta consideravelmente a região de observação e, conseqüentemente, a quantidade de radiação que atinge o detector (Brenner *et al.*, 1997). Por outro lado, o plasma configurado axialmente (AX-ICP OES) é susceptível a efeitos de matriz, principalmente, por também ser observada a região de maior gradiente de temperatura (*tail flame*). As interferências nessa região são devidas principalmente à formação de compostos moleculares e aos elementos facilmente ionizáveis (EIE). Para minimizar esses efeitos, ICP's configurados axialmente são equipados com interfaces apropriadas, sendo que existem dois arranjos: *shear gas interface*, *i.e.*, elevada vazão de um gás (Ar ou N₂) introduzido perpendicularmente à extremidade superior do plasma, e *end-on gas interface*, *i.e.*, vazão comparativamente menor de um gás introduzido frontalmente à extremidade superior do plasma. Estudos de interferência empregando amostras comerciais ou reais também são encontrados na literatura (Garcia *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 1998). Nesses casos, no entanto, uma etapa prévia de decomposição ácida é normalmente necessária. Esse processo reduz drasticamente as possibilidades de interferências, principalmente aquelas provocadas pelo carbono ou por sólidos dissolvidos. Por outro lado, esse procedimento aumenta o tempo de análise e o consumo de reagentes, onerando o procedimento completo.

A introdução de amostras orgânicas no plasma traz dificuldades como modificações nos processos de geração e transporte do aerossol da amostra, aumento do sinal de fundo e perturbação das condições do plasma devido ao consumo extra de energia para decomposição da matéria orgânica (Knapp *et al.*, 1998). A razão Mg II 280,2 nm / Mg I 285,2 nm tem sido usada como critério prático para avaliar o desempenho analítico e a robustez do plasma frente à presença de interferentes, principalmente Na e Ca. Um plasma robusto (Mg II / Mg I > 8) pode ser obtido quando baixa vazão de nebulização é usada, a potência de rádio-freqüência é alta e o tubo injetor da tocha tem elevado diâmetro interno (d.i.) (Brenner & Zander, 2000). Nessas condições, no entanto, o sinal de fundo pode ser elevado e a sensibilidade baixa, o que seria crítico para a determinação de analitos em baixas concentrações (Brenner *et al.*, 1998), além disso, o uso de um plasma em condições robustas pode não garantir a eliminação dos efeitos de matriz (Garcia *et al.*, 2001) e também pode comprometer a razão sinal analítico/sinal de fundo (SBR) mesmo quando está sendo empregado o modo de observação axial (Benner *et al.*, 1998).

1.1 – Leite Materno

Durante os primeiros meses de vida do bebê, o leite materno é a única fonte de nutrição. É considerado o mais completo alimento na dieta humana, por conter todos os macronutrientes (tais como proteínas, lipídeos e carboidratos) e todos os micronutrientes (elementos, vitaminas e enzimas) (Martino et al., 2001; Bocca et al., 2000). Dentre os constituintes do leite materno podemos destacar como principais os apresentados na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Teores dos principais constituintes do leite materno.
Adaptada de (Jensen, 1995).

Constituintes	Teor (g kg ⁻¹)
Água	873
Lactose	46
Gordura	39
Proteínas	32,5
Substâncias minerais	6,5
Ácidos Orgânicos	1,8
Outros	1,2

A adequada ingestão de minerais durante esse período permite o desenvolvimento de tecidos corporais, bem como a maturação e funcionalidade de vários sistemas enzimáticos. Elementos essenciais estão envolvidos na forma de metaloproteínas e enzimas em vários processos bioquímicos, que representam um papel essencial para vida humana. Estes processos são mais importantes no caso de desenvolvimento e crescimento do bebê, porque durante a infância, o corpo humano mostra uma sensibilidade especial à deficiência de elementos essenciais e também à possibilidade de excesso destes elementos essenciais. Entretanto, o leite também pode ser uma fonte de exposição a elementos tóxicos, que podem gerar riscos a saúde, especialmente a jovens e crianças. Todos os fatos acima explicam o interesse crescente na determinação de elementos-traço no leite, devido à importância crítica do mesmo na dieta humana.

O leite materno se divide em: colostro e leite maduro. O colostro é o leite secretado nos 15 primeiros dias após o parto, contém mais nutrientes e anticorpos que o leite maduro, estimula o intestino imaturo da criança a se desenvolver, possui baixo teor de gordura e alto teor de proteínas, é laxante e ajuda a eliminação do mecônio (primeiras fezes de coloração muito escura). O leite maduro é secretado a partir do 16º dia após o parto e em maior volume

que o colostro, altera o seu aspecto e a sua composição, mantém todos os nutrientes, mas em quantidades inferiores, em relação ao colostro. O colostro possui uma concentração de minerais bem maiores que o leite maduro, e o leite materno comparado com o leite bovino, possui uma quantidade bem menor de sais minerais, sendo que, levando em consideração os órgãos ainda imaturos do bebê, uma mãe que ao invés de amamentar com seu próprio leite, der ao seu filho leite bovino, pode acarretar vários problemas de saúde no mesmo, que vai desde doenças gastrointestinais até disfunção renal (Jensen, 1995).

Entre as interferências que podem ocorrer na concentração de metais em leite materno podemos destacar a dieta alimentar e hábitos maternos, fumo e uso de bebidas alcoólicas pela nutriz, uso de produtos químicos (tinturas de cabelo, cosméticos e outros), mudanças durante a amamentação (em uma única mamada, podem ocorrer mudanças na constituição do leite), período pós-parto (quanto maior for o estágio de amamentação, menor é a concentração de metais no leite materno) (Jensen, 1995).

1.1.1 – Minerais presentes no leite materno

Os minerais presentes no leite materno são divididos em macroelementos e microelementos. Dentre os macroelementos estão: Na, K, cloreto, Ca e Mg. Os microelementos presentes no leite materno são: Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, Se, iodeto, fluoreto, Cr, Ni, Sn e V. Os microelementos são divididos em essenciais e possivelmente essenciais. Os microelementos essenciais englobam: Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, Mo, Co, Se, iodeto e fluoreto. Dentre os possivelmente essenciais estão Ni, Sn e V (Jensen, 1995).

Alguns metais presentes no leite materno podem aparecer ligados as proteínas e à lactose em proporções definidas para cada metal. Cerca de 60 – 80% deles estão presentes no soro, cerca de 10 – 30% estão presentes na caseína e cerca de 5 – 30% estão presentes na gordura. Os quadros 1.1 e 1.2 mostram a importância e a deficiência de alguns minerais e a tabela 1.2 mostra as frações do leite e a quantidade de alguns metais presentes nestas frações (Jensen, 1995).

Quadro 1.1. A importância e a deficiência para o organismo em relação a alguns minerais.

Minerais	Elementos	Importância para o organismo	Deficiência
MACROELEMENTOS	Sódio	Equilíbrio ácido-básico, equilíbrio eletrolítico, função dos nervos e músculos	Confusão mental, coma
	Potássio		Paralisia, distúrbios cardíacos
	Fósforo		Irritabilidade, alterações intestinais, renais e nas células sanguíneas.
	Cloreto		Distúrbio do equilíbrio ácido-básico
	Cálcio	Formação de ossos, coagulação sanguínea, função dos nervos e músculos	Espasmos musculares, osteoporose
	Magnésio	Formação de ossos, coagulação sanguínea, função dos nervos e músculos, ativação das enzimas	Disfunção dos nervos
MICROELEMENTOS	Ferro	Formação de enzimas, componente da hemoglobina e transportador de oxigênio junto ao heme	Anemia, dificuldade de deglutição, alterações intestinais, baixo aprendizado
	Zinco	Componente de enzimas (síntese do RNA, DNA e insulina), cicatrização de feridas, crescimento	Retardo do crescimento e da maturação sexual, queda de cabelo, dermatite, cegueira noturna
	Cobre	Componente de enzimas para a produção de energia, para antioxidação e para síntese da adrenalina, formação de eritrócitos, formação de ossos	Anemia, retardo mental, cabelo crespo
	Manganês	Componente de enzimas, estrutura óssea, síntese de neurotransmissores	Perda de peso, irritação cutânea, vômito e náusea, crescimento lento do cabelo e mudança na sua cor
	Molibdênio	Ativação de enzimas, oxidação do enxofre presente nas proteínas	Acidose, aumento da frequência cardíaca, cegueira noturna, irritabilidade, desorientação
	Cobalto	Pré-formador da vitamina B ₁₂	Dores musculares
	Selênio	Síntese de enzimas antioxidantes, funcionamento dos sistemas imunológicos e da próstata, ativa hormônio tireoideano, formação do esperma, prevenção do câncer	Dor e fraqueza muscular, função imunológica baixa, baixa suficiência cardíaca, aumenta o colesterol, câncer, doenças degenerativas, artrite reumatóide

Quadro 1.2. A importância e a deficiência para o organismo em relação a alguns minerais, continuação.

Minerais	Elementos	Importância para o organismo	Deficiência
MICROELEMENTOS	Iodeto	Formação dos hormônios da tireóide, que regulam os mecanismos de controle de energia, crescimento e metabolismo	Alteração no crescimento fetal, feto com cérebro mal desenvolvido, aumento da tireóide, cretinismo, surdo-mudez
	Fluoreto	Formação de ossos e dentes	Afilamento ósseo e aumento de risco de cáries dentárias

Tabela 1.2. Porcentagem de alguns metais em cada fração do leite materno.

Metais (%)	Frações do leite		
	Caseína	Aquosa	Gordura
Ferro	15	45	40
Cálcio	15	85	0
Magnésio	0	82	18
Zinco	14	57	29
Cobre	5-15	80	5-15
Manganês	11	70	19
Selênio	20-35	60-70	5-10

1.2 – Avaliação de procedimentos de tratamento de amostras

O pré-tratamento da amostra é uma etapa de fundamental importância. A transformação de um sólido em uma solução representativa, que é geralmente necessária para a determinação dos elementos de interesse, é ainda crítica. É nessa etapa que se cometem mais erros, que se consome mais tempo e que aumenta os custos da análise. Por isso, os passos de um procedimento de preparo de amostra devem ser sempre cuidadosamente considerados (Krug, 1998).

A análise de leite por nebulização direta de soluções aquosas em plasmas indutivamente acoplados é ruim pela baixa exatidão e sensibilidade (Nóbrega *et al.*, 1997).

Devido à composição do leite materno torna-se necessário uma oxidação prévia da amostra, que é freqüentemente trabalhoso e envolve o risco de contaminação e perda do analito por aderência à parede do tubo ou por volatilização. Além da mineralização clássica por via seca e digestão por aquecimento, um sistema de digestão por aquecimento em recipientes fechados de Teflon[®] com aquecimento por microondas pode ser utilizado. O aquecimento por microondas favorece a destruição da matéria orgânica, diminui o tempo necessário para as análises e oferece a vantagem de ser simples, destruir rapidamente a matéria orgânica, volume mínimo de reagente, redução de possíveis perdas do analito por volatilização ou retenção e redução de riscos de contaminação (Amaro-López *et al.*, 1996).

Em vista dos numerosos métodos de decomposição estabelecidos e de suas possíveis modificações torna-se necessário avaliar criticamente as técnicas de preparo de amostra. De Boer e Maessen (De Boer & Maessen, 1983) fizeram um estudo comparativo de diferentes procedimentos de tratamento de tecido biológico para a determinação de elementos por ICP OES. Esses autores sugeriram alguns critérios que devem ser avaliados ao comparar diferentes alternativas para o preparo de amostras. Esses critérios, devido a sua relevância, podem ser estendidos a qualquer técnica e também para quaisquer amostras sólidas.

Os critérios sugeridos vão além da exatidão e precisão. Os autores fizeram uma classificação em dois grupos, um para facilitar uma avaliação independente do preparo da amostra e o outro para avaliar a adequação da solução obtida para introdução em um ICP OES. Com respeito ao preparo da solução da amostra os critérios avaliados foram:

- I.fator de diluição;
- II.massa de amostra;
- III.condições experimentais;
- IV.risco de contaminação;
- V.tempo requerido por amostra;
- VI.segurança operacional.

Com relação a adequação da solução da amostra para determinações multielementares por ICP, dois critérios foram avaliados:

- I.exatidão e precisão das determinações;
- II.eliminação da ocorrência de efeito matricial e de efeitos da acidez sobre o processo de nebulização.

Os procedimentos utilizados para o preparo da amostra foram:

- *Procedimentos diretos*
 - extração com HNO₃ diluído;
 - solubilização em hidróxido de tetrametilamônio (TMAH).

- *Procedimentos de digestão ácida*
 - digestão com HNO₃ e HClO₄ em forno de microondas;
 - digestão com H₂O₂ e H₂SO₄;
 - digestão pressurizada com HNO₃ em bombas de aço com revestimento de PTFE.

- *Procedimentos por via seca*
 - calcinação a baixa temperatura;
 - calcinação a alta temperatura.

O fator de diluição está relacionado com a mínima concentração admissível para cada elemento da amostra para se atingir uma adequada condição de medida instrumental. A quantidade mínima de amostra que pode ser processada é de especial interesse e se relaciona com a exigência da homogeneidade da amostra. Por outro lado, a quantidade máxima de amostra que pode ser processada está relacionada com o teor dos constituintes presentes em concentrações mais baixas. A duração do procedimento está relacionada com o tempo para emissão dos resultados analíticos. Finalmente, a atenção e o envolvimento do operador são parâmetros importantes que se relacionam com a confiabilidade e os custos dos resultados obtidos.

Com relação à precisão, os autores propuseram que a faixa do intervalo de confiança dos valores encontrados depende da razão entre concentração do analito/limite de detecção. A dependência da precisão com relação à natureza do processo de tratamento é menos pronunciada.

A exatidão dos resultados para os elementos investigados: Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn foi avaliada em cada procedimento. A exatidão obtida para os elementos Mn e Zn foi excelente em todos os procedimentos. Cd, Cu e Fe geraram resultados de bons a excelentes e o Pb foi o elemento que forneceu pior exatidão quando determinado por ICP OES.

A extração com ácido diluído a temperatura ambiente é um procedimento simples e seguro. Excelentes resultados foram encontrados para vários elementos. Porém, Cu e Fe foram

extraídos apenas parcialmente. A amostra apresentava todas as formas de Cu e Fe e somente algumas delas foram lixiviadas pela solução diluída de HNO₃ à temperatura ambiente.

A solubilização com a solução de TMAH geraram resultados aceitáveis para Zn, Mn, Cu e Fe. Esse é um procedimento simples e seguro que pode ser adequado para um lote grande de amostras. Porém, como requer elevadas diluições, a aplicabilidade é limitada a elementos que tenham uma elevada razão concentração/limite de detecção. Outra desvantagem do procedimento é que devido à instabilidade da solução de TMAH, o método das adições de analito deve ser aplicado. Entretanto, Uchida *et al.* (Uchida *et al.*, 1992) e Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 1996) afirmaram que esse método oferece uma diluição da amostra relativamente baixa, resultante da alta concentração do elemento na solução da amostra. Contudo, o procedimento de extração com TMAH tem a desvantagem de apresentar altos valores de branco provenientes do reagente.

O procedimento de digestão por via úmida com HNO₃/HClO₄ gerou resultados atrativos para 5 ou 6 elementos. Quando a digestão foi realizada com aquecimento por radiação microondas o processo é seguro, promovendo a evaporação da mistura de ácido sob condições experimentais controladas. Quando o HNO₃ é evaporado antes da total mineralização da amostra, o resíduo permanecerá com uma alta concentração de HClO₄ e o risco de explosão é agravado. Altas diluições são necessárias para se evitar o entupimento do capilar. Segundo esses autores, as vantagens do procedimento são a simplicidade e a conseqüente facilidade para manipulação simultânea de um maior número de amostras, quando comparado aos procedimentos convencionais de preparo de amostra.

Os resultados analíticos obtidos com o procedimento usando H₂SO₄ e H₂O₂ foram de razoáveis a bons, dependendo do elemento. O procedimento é seguro, mas demanda atenção do operador quando se pretende mínima diluição da amostra. Devido à precipitação de CaSO₄, a aplicação do método somente é aconselhável para matrizes com baixo teor de Ca.

A digestão pressurizada com HNO₃ em bombas digestoras com revestimento de Teflon[®] apresentou bons resultados, exceto para Pb. O procedimento é seguro, porém deve-se evitar massas de amostras superiores a 0,5 g e condições de potência aplicada que causem superaquecimento.

Um estudo efetuado para determinar o teor de carbono residual na amostra submetida à digestão pressurizada mostrou que após 20 minutos de aquecimento, o teor de C foi reduzido para metade do valor inicial e após 2 h o teor foi inferior a 10%. Dependendo da técnica analítica escolhida, a completa mineralização da amostra não é essencial.

Em geral, o objetivo da análise é a quantificação do teor total do elemento em determinada amostra. É possível que o interesse esteja direcionado para determinar a forma que o analito está presente na amostra ou para a fração na qual está associado. A digestão por via úmida pode fornecer uma resposta a essas duas questões, uma vez que pode levar à solubilização total ou à mobilização seletiva do analito em solução (Hoenig & Kersabiec, 1996). A calcinação à baixa temperatura apresentou excelente exatidão e satisfatória precisão para todos os elementos estudados, exceto para o Pb. O procedimento é seguro e sua desvantagem está relacionada ao longo tempo de preparo, contudo, essa etapa morosa não requer um acompanhamento contínuo do analista.

A calcinação à alta temperatura gerou resultados exatos e precisos para Cd, Mn, Pb e Zn. A principal fonte de erro foi a perda do analito por evaporação ou por retenção na parede do recipiente. Os erros sistemáticos podem ser evitados ou reduzidos pela aplicação de um programa experimental bem estabelecido de tempo-temperatura e pela escolha cuidadosa do material do cadinho.

Comparadas com a digestão por via úmida, as maiores vantagens desses procedimentos são: a possibilidade de calcinação de maiores massas de amostra e a subsequente dissolução em pequenos volumes de ácido. É possível ainda a pré-concentração do elemento-traço na solução final.

Com base na avaliação da exatidão e precisão, os autores concluíram que todos os procedimentos examinados têm sua relevância para o preparo de amostras e que nenhum pode ser classificado como o melhor sob todos os aspectos.

1.2.1 – Aquecimento condutivo

Nos métodos de preparo de amostras por extração, a temperatura é um parâmetro chave (Azouzi *et al.*, 1998). O controle de temperatura é fundamental para a repetitividade dos teores extraídos para um mesmo material em um mesmo meio extrator, além disso, esse parâmetro é fundamental para aumentar a razão de extração.

A maioria dos métodos têm sido desenvolvidos em chapas aquecidas. A limitação desse tipo de sistema é que geralmente existe um pronunciado gradiente de temperatura na superfície; por exemplo quando se programa uma temperatura de 100 °C, constata-se que as soluções mantidas em recipientes sobre a superfície têm uma temperatura que varia de 85 –

125 °C, dependendo da localização de cada recipiente. Paradoxalmente, estudos inter-laboratoriais indicaram que esse gradiente de temperatura não influencia decisivamente o teor extraído de um dado elemento nas soluções extratoras medidas em mesmo laboratório. Contudo, os resultados variaram consideravelmente quando realizadas em laboratórios diferentes, indicando que nesses casos as maiores variações se devem à etapa de medida instrumental (Kane, 1995).

Rodriguez *et al.* (Rodriguez *et al.*, 2001) usaram diferentes técnicas (F AAS, FES – espectrometria de emissão em chama – e fluorimetria) para quantificar Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Se e Zn em amostras de leite bovino provenientes das Ilhas Canárias. As amostras foram digeridas em chapa aquecida usando uma mistura de HNO₃ e HClO₄ (9:1 v/v) após uma etapa de pré-digestão *overnight* (12 h). As amostras esterilizadas de leite continham teores de Fe e Zn significativamente menores do que aqueles observados em leite bovino, enquanto que as concentrações médias de Se e Cu foram similares ou maiores do que as concentrações observadas nas amostras de leite *in natura*, respectivamente. Os autores não observaram nenhuma diferença significativa nos valores de K, Mg e Na observados nos dois tipos de amostras (esterilizada e *in natura*).

Neste mesmo estudo, os autores (Rodriguez *et al.*, 2001) mostraram que o consumo de leite pela população local proporciona a ingestão de importantes quantidades de Ca (62% - leite *in natura* e 50% - esterilizado) e K (21% - leite *in natura* e esterilizado) em relação ao valor recomendado para consumo diário. Quantidades moderadas de Na e Mg e menores de Se e Zn também foram supridas pela ingestão de leite. A investigação também permitiu estabelecer um perfil de distribuição sazonal dessas espécies durante o ano. As concentrações de Ca, Cu, Fe, K e Na nas amostras de leite *in natura* permaneceram praticamente constantes, por outro lado, as concentrações de Mg, Se e Zn variaram, sendo que, as menores concentrações foram observadas no outono.

1.2.2 – Aquecimento por radiação microondas

O aquecimento condutivo tem sido freqüentemente utilizado em dissoluções de amostras, mas estes procedimentos de dissolução são limitados por vários fatores: longo tempo de dissolução (horas ou dias), potencial perda de elementos voláteis, contaminação da amostra por quantidades excessivas de reagentes, contaminantes presentes na atmosfera e prolongado

contato com o material do tubo. Para acelerar a dissolução, sistemas fechados são utilizados, tais como fornos de microondas analíticos. Com sistemas fechados, o tempo de dissolução é reduzido em várias horas e a contaminação da amostra é minimizada porque menores quantidades de reagentes são necessárias e a exposição à atmosfera é limitada. Sistemas com tubos fechados aumentam a eficiência por elevar a temperatura, significativamente aumentando as cinéticas das reações e possibilitando melhores exatidão e precisão de resultados (Montaser, 1998). A energia de microondas é uma radiação eletromagnética não ionizante que causa movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotação de dipolo promovidas pela frequência com que o campo eletromagnético se alterna. A energia envolvida não é suficiente para causar alteração da estrutura molecular. Devido a esse mecanismo de estresse induzido, ocorre o aquecimento, sendo que o mesmo não é produzido por fonte externa de aquecimento, mas pela interação entre as microondas e os constituintes da solução (Arruda & Santelli, 1997). As frequências de microondas variam de 300 – 300.000 MHz. Na área industrial e científica utilizam-se quatro faixas de frequência: 915 ± 25 ; 2450 ± 13 ; 5800 ± 75 e 22125 ± 125 MHz. Dessas, 2450 ± 13 MHz é a mais usada em fornos comerciais e domésticos.

A absorção da energia de microondas pela amostra está relacionada ao fator de dissipação da amostra, $\tan \delta$ (Knapp, 1998):

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (1.1)$$

$\tan \delta$ = capacidade do material de converter energia eletromagnética em calor (a uma dada frequência e temperatura);

ϵ' = constante dielétrica, mede a capacidade com a qual a molécula pode ser polarizada pelo campo eletromagnético;

ϵ'' = perda dielétrica, mede a eficiência da molécula para a conversão de energia eletromagnética em calor.

A energia de microondas é transferida para a amostra por dois mecanismos:

Condução iônica: migração dos íons do campo eletromagnético aplicado. A condução depende da mobilidade do íon, de sua carga e concentração;

Polarização dielétrica: refere-se ao alinhamento, devido ao campo elétrico das moléculas que têm momento dipolo permanente ou induzido. A rotação de dipolo depende da temperatura e da viscosidade da amostra.

No aquecimento por radiação microondas, ao contrário do que ocorre no aquecimento condutivo (onde se estabelece um gradiente térmico devido às correntes de convecção), as paredes do recipiente da amostra são transparentes às microondas. Isso faz com que a mistura composta pela solução ácida e amostra seja aquecida simultaneamente e de forma homogênea, com aquecimento secundário do recipiente. Como a velocidade de aquecimento é rápida, um superaquecimento localizado pode ocorrer como mostra a figura 1.1.

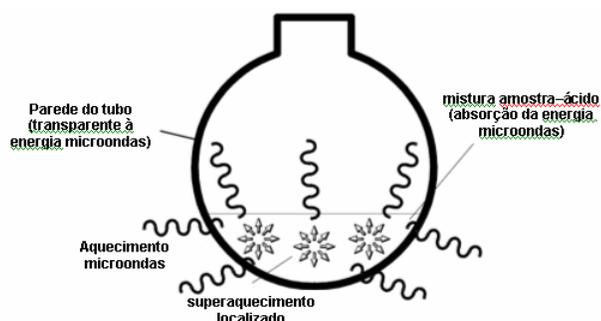


Figura 1.1. Aquecimento assistido por radiação microondas: o recipiente sofre um aquecimento secundário com possibilidade de superaquecimento localizado.
Fonte: Adaptada de (Neas & Collins, 1988).

No início de 1980, pesquisadores desenvolveram recipientes fechados para alcançar temperaturas acima do ponto de ebulição normal dos ácidos, o que possibilitaria decomposições mais rápidas. Embora esses recipientes tenham sido especialmente desenvolvidos para uso em fornos de microondas, o aumento não controlado de pressão causava periculosidade. Atualmente, os sistemas possuem configurações específicas para trabalhos em laboratórios, com paredes quimicamente resistentes e sensores para controle da temperatura e pressão (Erickson, 1998).

Basicamente, são três os tipos de sistemas de microondas: sistemas de alta pressão (recipientes fechados), sistemas à pressão atmosférica (recipientes abertos) e sistemas de fluxo contínuo. Para ambos os sistemas de decomposição, aberto ou fechado, as vantagens sob o método convencional são significativas. Tais sistemas são exemplificados na figura 1.2.



Figura 1.2. Modelos de fornos de microondas. (a) Forno de microondas em sistema fechado. (b) Forno de microondas em sistema aberto com radiação focalizada.

Os recipientes fechados promovem o aumento do ponto de ebulição do ácido devido à pressão gerada no recipiente. Isso é importante, pois incrementa a eficiência do ataque ácido e reduz o tempo de decomposição. Em recipientes fechados praticamente elimina-se o risco de perda de elementos voláteis e os vapores ácidos ficam retidos no recipiente. A contaminação por material particulado é eliminada ou substancialmente reduzida. Decomposições em recipientes fechados têm uma significativa desvantagem: a quantidade de amostra é limitada em menos de 2 g.

Nos sistemas abertos, a decomposição assistida por microondas baseia-se na focalização da radiação no recipiente da amostra através de um guia de ondas, sem causar modificação da natureza intrínseca das reações do ácido com a amostra. O aperfeiçoamento resultante, quando comparado ao sistema pressurizado, é um controle mais eficiente da transferência de energia para a amostra, possibilidade de adição sequencial de reagente e operação com maiores massas de amostras. Algumas restrições se relacionam à possibilidade de perdas de elementos voláteis tais como As, Se e Cd. Outra possível desvantagem é um risco maior de contaminação pela atmosfera do laboratório e, dependendo do programa de aquecimento e dos reagentes utilizados, pode ocorrer a decomposição incompleta de alguns materiais, tais como metais, ligas e polímeros.

1.2.3 – Extração com ácidos

A extração com ácidos diluídos é uma técnica simples, rápida, segura e de baixo custo, que promove a dissolução quantitativa ou semi-quantitativa dos elementos. Dependendo da matriz, a recuperação do analito em ácidos diluídos é menor do que quando se usam ácidos

concentrados. É um procedimento de preparo de amostras menos susceptível a problemas com branco analítico e também envolve menor risco de perda de elementos voláteis. Outra vantagem é o uso de menor volume de reagentes e um baixo fator de diluição.

Os ácidos são classificados de acordo com seu papel na reação de digestão: são oxidantes ou não-oxidantes. Ácidos não-oxidantes (ácidos: clorídrico, bromídrico, fluorídrico, fosfórico, sulfúrico diluído e perclórico diluído) dissolvem metais tendo potenciais de redução negativos maiores que do hidrogênio. Se um ácido não-oxidante é inapropriado na dissolução da matriz, é necessário o uso de reagentes oxidantes (ácidos: nítrico, perclórico concentrado e aquecido, sulfúrico concentrado e outros reagentes tais como peróxido de hidrogênio ou uma combinação destes reagentes). O conhecimento da química ácida é importante por permitir o desenvolvimento de métodos e por assistir o analista na escolha apropriada de condições (Montaser, 1998).

Para as técnicas espectrométricas como ICP OES e AAS, o critério que deve ser aplicado é a total dissolução do elemento-traço, mas não necessariamente a completa decomposição da amostra (Chow *et al.*, 1995). Isso porque as temperaturas típicas de trabalho promovem a pirólise dos compostos orgânicos associados aos analitos de interesse. Por isso, métodos rápidos de preparo de amostra, como os métodos de extração surgem como uma alternativa aos procedimentos freqüentemente morosos de decomposição total. Os métodos de extração solubilizam os elementos de interesse sob condições reacionais mais brandas. A eliminação incompleta da matriz orgânica durante a decomposição da amostra geralmente não é crítica para os métodos instrumentais óticos que envolvem medidas em elevadas temperaturas, tais como ICP OES, GF AAS e F AAS. Para técnicas voltamétricas, a remoção completa da matriz orgânica é primordial e a presença de constituintes orgânicos, mesmo que parcialmente decompostos, causaria perturbações na resposta do eletrodo de trabalho. A combinação de HNO_3 e de H_2O_2 tem sido largamente utilizada, por apresentar uma maior segurança ao manipulador, por não formar compostos insolúveis, como a utilização de ácido clorídrico que pode formar os cloretos de Ag, Hg, Ti e Pb; e por não corroer a superfície do recipiente de Teflon[®] durante evaporações prolongadas como na utilização de ácido sulfúrico.

1.2.3.1 – Reações com ácido nítrico

Ácido nítrico é um ácido oxidante que dissolve a maioria dos metais na forma de nitratos solúveis. Esse ácido possui pobre força oxidante em concentrações menores que 2 mol L^{-1} , mas é um poderoso ácido oxidante na forma concentrada. Sua força oxidante pode ser aumentada pela adição de clorato, permanganato, peróxido de hidrogênio, brometo ou pelo aumento da temperatura e pressão da reação. A maioria dos metais e ligas são oxidados pelo HNO_3 , mas existem exceções em duas categorias: ouro e platina não são oxidados e alguns metais (como Al, B, Cr, Ga, In, Nb, Ta, Th, Ti, Zr, Hf) formam óxidos insolúveis quando atacados por HNO_3 concentrado. Estes metais podem ser dissolvidos pelo uso de uma combinação de ácidos ou de HNO_3 diluído (Montaser, 1998). O potencial de oxidação do HNO_3 é diretamente proporcional ao aumento da temperatura. A temperatura é um parâmetro crítico na eficiência da decomposição da matéria orgânica. A típica reação é:



1.2.3.2 – Reações com peróxido de hidrogênio

Tipicamente, concentrações de cerca de 30 a 50% de peróxido de hidrogênio são usadas em digestões. Peróxido de hidrogênio pode somente reagir explosivamente com algumas espécies orgânicas, especialmente na forma mais concentrada. Peróxido de hidrogênio é usualmente combinado com um ácido porque seu poder oxidante aumenta a acidez do meio. A combinação de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico forma o ácido monoperossulfúrico (H_2SO_5) um reagente oxidante muito forte. Por causa do seu poder oxidante, peróxido de hidrogênio é freqüentemente adicionado à solução de digestão depois que a adição primária de ácido tenha completado uma pré-digestão da matriz. O peróxido de hidrogênio é adicionado à solução de digestão para completar a digestão, sem um potencial perigo de reação entre um reagente oxidante forte com um material facilmente oxidável. Neste sentido, o peróxido de hidrogênio é usado como um substituto para o ácido perclórico. Por motivos de segurança, estes reagentes devem ser utilizados depois que uma digestão prévia da matéria orgânica esteja completada.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 – Espectrometria de absorção atômica (AAS)

2.1.1 – Procedimentos envolvendo digestão das amostras

Al-Awadi e Srikumar (Al-Awadi & Srikumar, 2000) determinaram Cu, Fe, Mn, e Zn em leite e plasma humano de mulheres do Kuwait e de outros países durante o período de lactação. A determinação de Cu e Mn foi feita por GF AAS, enquanto que para Fe e Zn foi utilizado F AAS. Os resultados mostraram que a concentração desses elementos, além da quantidade total de proteínas e da atividade da dismutase superoxidase, foi maior no leite de mulheres nativas do Kuwait. Esse comportamento foi relacionado com os hábitos alimentares distintos de cada grupo de mulheres (kuwaitianas e não-kuwaitianas). As concentrações de Zn, Cu, Mn e a concentração total de proteínas nas amostras investigadas diminuíram com o tempo de lactação, enquanto que as concentrações de Fe no leite e de Cu e Mn no plasma permaneceram constantes. Segundo os dados apresentados, a maior concentração de proteínas e de micro-nutrientes nas amostras obtidas no Kuwait é um indicativo de que a quantidade de proteína do leite é um fator determinante para a concentração e biodisponibilidade dos elementos investigados para os lactentes.

Plessi *et al.* (Plessi *et al.*, 1997) determinaram Al (GF AAS) e Zn (F AAS) em alimentos e formulações infantis. As amostras de alimentos foram mineralizadas em um forno de microondas sob alta pressão usando somente HNO₃ concentrado. As concentrações de Al presentes nas amostras à base de soja (7,0 e 7,8 mg kg⁻¹) foram maiores do que nas amostras à base de leite (3,0 – 3,5 mg kg⁻¹). Porém, as concentrações máximas foram observadas nas amostras à base de proteínas hidrolisadas (13 – 17 mg kg⁻¹). Segundo os autores, a combinação de Al nas amostras à base de soja e proteína hidrolisada se deve à concentração natural no alimento e ao processo de preparo do alimento, respectivamente. Já os valores de Zn nas amostras à base de leite (65 – 110 mg kg⁻¹) foram maiores do que nas demais amostras (13 – 73 mg kg⁻¹).

Turan *et al.* (Turan *et al.*, 2001) determinaram Cd, Cr, Cu, Mn e Pb em amostras de colostro e leite humano por GF AAS usando a mistura de Pd-Mg – ácido cítrico como modificador químico. As amostras de colostro e leite foram decompostas usando uma mistura HNO₃ – HClO₄ em uma temperatura de 400 °C. O modificador químico proposto mostrou bons resultados na estabilização térmica de Cd, Cr, Cu, Mn e Pb, na redução de efeitos de

matriz e na eliminação de componentes voláteis indesejáveis. Os limites de detecção determinados na presença do modificador foram 0,62; 0,26; 0,71; 0,11 e 0,92 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd, Cr, Cu, Mn e Pb, respectivamente. O estudo mostrou que as quantidades de elementos tóxicos (Pb, Cd e Cr) ficaram abaixo dos limites permitidos, enquanto que os elementos-traço foram encontrados em quantidades suficientes.

Li *et al.* (Li *et al.*, 1999) utilizaram a técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS) para a determinação de Se em leite humano. As amostras foram digeridas usando radiação microondas em um forno sob alta pressão, sendo que, a mistura $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{O}_2$ foi utilizada no processo de decomposição. Após a etapa de digestão, a solução resultante foi aquecida por um período de 20 min até um volume final de 2 – 3 mL; a esse volume foi adicionado HCl concentrado, a solução foi novamente aquecida (90 °C) por 15 min e, finalmente, a solução resultante foi diluída para 20 mL à temperatura ambiente. O excesso de HNO_3 teve que ser removido porque a presença desse ácido pode inibir a formação do hidreto de selênio. O método proposto foi validado usando duas amostras certificadas de leite desnatado (CRM 063 e CRM 151), sendo que, o limite de detecção encontrado foi de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de Se nas amostras de leite humano decresceram com o tempo, de aproximadamente 23 $\mu\text{g L}^{-1}$ (colostro) para um mínimo de 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ no leite colhido um ano após o parto. O consumo diário estimado de Se das crianças durante os 3 primeiros meses de vida foi maior do que 8,2 $\mu\text{g}/\text{dia}$, já a quantidade consumida pelas mães lactantes foi de 48 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Segundo esse estudo, esse valor é abaixo do recomendado.

Assim como Al-Awadi e Srikumar (Al-Awadi & Srikumar, 2000), Moreno-Torres *et al.* (Moreno-Torres *et al.*, 2000) usaram uma mistura ácida (4:1) de HNO_3 e HClO_4 para a decomposição de amostras de diferentes tipos de leite (integral e desnatado). A comparação dos dados obtidos com o procedimento proposto e com os métodos de decomposição envolvendo digestão por via seca e em forno de microondas mostraram que a determinação de Mg nas amostras de leite pode ser feita com rapidez e segurança.

2.1.2 – Amostras preparadas como emulsões

Uma etapa simples de preparo da amostra foi proposta por Khammas *et al.* (Khammas *et al.*, 1985) para a quantificação de Cu em amostras de leite em pó. Nesse trabalho, as suspensões foram preparadas simplesmente pela dissolução de 1 g de amostra em água, em

seguida foram adicionados 10 mL de HNO_3 0,1 mol L^{-1} para um volume final de 100 mL. O uso do método de calibração por ajuste de matriz possibilitou a obtenção de bons resultados com o tubo de grafite revestido piroliticamente. Por outro lado, o uso de uma sonda de grafite permitiu que Cu fosse determinado diretamente nas amostras empregando uma curva analítica obtida com soluções de referência preparadas em meio aquoso. A exatidão do procedimento foi avaliada usando materiais de referência certificados (BCR 63, 150 e 151) tendo sido obtidos resultados com adequada exatidão.

Utilizando o reagente n-octanol como diluente Mingorance *et al.* (Mingorance *et al.*, 1985), Bermejo-Barrera e Pita Calvo (Bermejo-Barrera & Pita Calvo, 1990) e Bermejo-Barrera *et al.* (Bermejo-Barrera *et al.*, 1990) determinaram uma série de elementos presentes em baixas concentrações (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Ni) em amostras de formulações infantis e em leite humano por GF AAS. Uma solução de difluoreto de bário foi injetada junto com as soluções analíticas, diretamente no tubo de grafite (Bermejo-Barrera & Pita Calvo, 1990). Esse sal foi usado como modificador químico a fim de aumentar a taxa de amostragem, devido à redução da temperatura de atomização em consequência da formação de fluoretos de molibdênio voláteis.

Usando esse reagente não foi observado problema de formação de resíduos de carbono ou de repetitividade devido ao entupimento do capilar de amostragem pela gordura do leite, que altera o volume injetado no tubo de grafite. Uma maior sensibilidade poderia ser obtida com o uso de tubos revestidos piroliticamente ou com a introdução de quantidades maiores de amostras. Nesse último caso, porém, o sinal de fundo pode atingir valores acima da capacidade de correção do corretor com fonte contínua de deutério, além de ocorrer à formação de resíduos de carbono no interior do tubo. Por outro lado, perdas de amostra podem ser observadas quando tubos de grafite revestidos são usados. Segundo os autores, (Mingorance & Lachica, 1985) isso ocorre devido ao espalhamento do solvente na superfície interna do tubo. Embora o método de ajuste de matriz tenha sido usado para a quantificação dos analitos na amostra, a simplicidade e o pequeno volume de solução necessário para gerar os dados são os grandes atrativos desse procedimento, sendo que o desvio padrão relativo das medidas foi inferior a 10%.

Aleixo *et al.* (Aleixo *et al.*, 2000) determinaram Se em água e leite de coco usando uma mistura de aminas terciárias solúveis em água (CFA-C 10% v/v). As leituras foram feitas em um forno de grafite revestido piroliticamente e usando paládio como modificador químico. Os teores de Se em seis amostras de água ou de leite de coco variaram entre 6,5 – 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ e entre 24 – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Com esse procedimento não foi observado acúmulo de

gordura nos capilares do auto-amostrador ou resíduos de carbono no interior do tubo de grafite, melhorando dessa forma a repetitividade dos sinais analíticos. Segundo os autores, os teores de Se determinados nas amostras indicaram que esses alimentos podem ser usados como fontes de Se de baixo custo, facilmente obtidas pela população.

2.2 – Espectrometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP OES)

2.2.1 – Procedimentos envolvendo digestão ácida

Com o objetivo de estabelecer valores e intervalos de referência para amostras de leite humano, Caroli *et al.* (Caroli *et al.*, 1992) quantificaram Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES. Após uma etapa de secagem sob baixa temperatura as amostras foram digeridas por via seca (400 °C) e as cinzas dissolvidas com 1 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ aquecido. Os teores dos elementos encontrados nas amostras foram concordantes com os valores da literatura.

Krushevska *et al.* (Krushevska *et al.*, 1992) estudaram uma série de métodos para decomposição (via úmida e via seca) de amostras de leite. Os resultados foram avaliados em termos de recuperação do Zn e do teor de carbono residual nas soluções analíticas. Adicionalmente, o método proposto para determinação do carbono total por ICP OES foi comparado com o método espectrofotométrico baseado na redução do Cr (VI). As digestões realizadas em chapa aquecida e em forno de microondas focalizado usando uma mistura de HNO₃, H₂SO₄ e H₂O₂ geraram baixos valores de carbono residual, já o método de decomposição usando apenas HNO₃ resultou em soluções contendo uma fase sólida (glóbulos de gordura) como observado por Mingorance *et al.* (Mingorance *et al.*, 1993) em amostras com mais de 1% de gordura.

Utilizando o forno de microondas com cavidade e frascos fechados, observou-se que o carbono residual diminuiu com o aumento da pressão e a adição de H₂SO₄ ou H₂O₂. A digestão sob altas temperaturas e pressão eliminou quase toda a matéria orgânica presente nas amostras. Resultados similares foram observados com a digestão por via seca, porém, o tempo gasto nesse procedimento foi maior do que nos demais. Com relação à determinação de Zn nas

amostras de leite por ICP OES, todos os procedimentos de abertura geraram bons resultados. Já para a determinação de carbono residual o método espectrofotométrico demonstrou ser mais lento e complexo, porém, exibiu melhores limites de detecção. A avaliação dos procedimentos de digestão, nesse caso, se dá pela eficácia na destruição da matéria orgânica presente na matriz.

Após uma etapa de preparo da amostra envolvendo a remoção de umidade, decomposição em chapa aquecida, calcinação em forno de mufla e dissolução das cinzas com 1 mL de HNO_3 14 mol L^{-1} aquecido, Coni *et al.* (Coni *et al.*, 1990) determinaram Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de leite humano. A determinação de Cd, Cr, Li e Mn em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ (2, 19, 4 e 6) e o uso de um ICP OES configurado radialmente (RD-ICP OES) exigiram o emprego de uma grande quantidade de amostras nas digestões, embora a massa utilizada não tenha sido especificada, o que poderia ser crítico considerando a quantidade de amostra disponível.

Ao contrário de Coni *et al.* (Coni *et al.*, 1990), Li *et al.* (Li *et al.*, 1990) determinaram uma série de elementos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S, Sr e Zn) em amostras de leite humano. A solução da amostra foi inserida no ICP OES após uma etapa de digestão ácida de 1 mL de leite em frasco fechado de aço inoxidável revestido com teflon (PTFE). Apesar dos bons resultados obtidos, a determinação de Sr é questionável considerando que a concentração encontrada (0,06 mg L^{-1}) foi similar ao limite de detecção (0,05 mg L^{-1}).

Em outro estudo envolvendo diferentes procedimentos de preparo de amostra, Krushevskaja *et al.* (Krushevskaja *et al.*, 1993) investigaram os efeitos da combinação de reagentes (HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2) e do uso de diferentes programas de aquecimento sobre a concentração de carbono residual e a recuperação dos analitos. Os resultados obtidos com o sistema de microondas focalizadas operando à pressão atmosférica, foram similares aos resultados obtidos com um sistema de digestão sob alta pressão (HPA) e melhores do que com o sistema de microondas com cavidade e frascos fechados sob média pressão (11 psi). Um volume mínimo de ácido sulfúrico (1 mL) foi usado para evitar efeitos de viscosidade no sistema de introdução de amostra. A adição de HNO_3 15% v/v ou HCl 12% v/v + HNO_3 3% v/v melhorou as precisões nas determinações de Pb e Sr, enquanto que a adição de NH_4EDTA 1,2% (m/v) na etapa final de digestão melhorou as recuperações de Ba.

Naozuka *et al.* (Naozuka *et al.*, 2003) determinaram cloreto, brometo e iodeto em amostras de leite em pó desnatado. O ICP OES configurado axialmente usado pelos autores foi equipado com um sistema óptico lacrado e preenchido com argônio. Esse instrumento permite a determinação de elementos que emitem suas linhas preferenciais na região do ultra-violeta (<

190 nm) do espectro eletromagnético (Brenner & Zander, 2000) como é o caso do Cl (134 nm), Br (154 nm) e I (183 nm). As amostras foram digeridas sob temperatura ambiente usando um sistema de microondas com cavidade e frascos fechados. Os analitos de interesse foram precipitados como sais insolúveis nos instrumentos microondas após a adição de AgNO₃ nos frascos de digestão. Os precipitados foram separados e solubilizados em 2 mL de amônia concentrada. As soluções resultantes foram introduzidas diretamente no plasma. Os valores encontrados dos analitos em três amostras de referência certificadas mostraram que o método proposto apresentou adequada exatidão para todos os analitos investigados. Deve ser ressaltado que as determinações desses ânions por ICP OES somente foram possíveis porque o equipamento empregado possui o sistema ótico lacrado e preenchido com argônio.

Com o objetivo de comparar a concentração de vários elementos presentes em baixas concentrações em leite bovino e em derivados de leite, Coni *et al.* (Coni *et al.*, 1994) quantificaram Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Pt, Sr e Zn por ICP OES após uma etapa exaustiva de decomposição da amostra, como adotado anteriormente, em outro estudo (Coni *et al.*, 1990). Os resultados mostraram uma significativa diferença entre os valores de concentração dos elementos nas amostras de leite bovino e de derivados de leite. Segundo os autores a causa mais provável para as diferenças de concentração observadas nas amostras foi devida aos processos de fabricação empregados na produção dos derivados de leite. Esses processos teriam modificado a distribuição dos analitos nas matrizes. Em outro trabalho do grupo, (Coni *et al.*, 1996) também foram observadas diferenças entre os valores de concentração dos analitos determinados em amostras de leite de ovelha, cabra e vaca.

Ikem *et al.* (Ikem *et al.*, 2002) determinaram uma série de elementos essenciais (Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na e Zn) e não-essenciais (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U e V) em amostras comerciais de suplemento alimentar infantil provenientes da Nigéria, Reino Unido e Estados Unidos. As amostras foram digeridas em forno de microondas e posteriormente analisadas por ICP OES. A exatidão do método proposto foi avaliada empregando amostras certificadas de leite em pó integral. Os valores encontrados foram concordantes com os valores de referência certificados. O estudo mostrou que a maioria dos elementos apresentou maiores concentrações nos alimentos em pó à base de soja do que nos alimentos à base de leite, independentemente da fonte. Os valores de Ba e Al em algumas amostras foram superiores aos valores permitidos pela União Européia, enquanto que os valores de Tl ultrapassaram os valores padrões US EPA. Por outro lado, Cd, Pb, Ni e Cr ficaram abaixo dos valores máximos permitidos. Algumas amostras apresentaram concentrações de alguns elementos essenciais abaixo dos valores recomendados.

2.2.2 - Amostras preparadas como emulsões

Ribeiro *et al.* (Ribeiro *et al.*, 2003) utilizaram hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a solubilização de amostras de leite em pó integral, desnatado e café solúvel. A solubilização alcalina das amostras (0,35 g) em meio contendo o reagente proposto levou cerca de 10 min para as amostras de café, e 20 e 30 min para as amostras de leite desnatado e integral, respectivamente. As solubilizações ocorreram sob temperatura em torno de 80 °C. Com esse procedimento foi possível a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sn e Zn por ICP OES em amostras comerciais e Cu, Fe, K, Mg, Mn e Na em amostras certificadas de leite desnatado, com adequada exatidão. Os resultados obtidos com o método proposto e empregando digestão ácida (em frasco de digestão e forno microondas com cavidade) foram concordantes ao nível de 95% de confiança.

Murcia *et al.* (Murcia *et al.*, 1999) quantificaram diretamente apenas os macroelementos em amostras certificadas de leite em pó desnatado, em amostras comerciais de leite bovino e em amostras sintéticas de leite por ICP OES. Para a determinação de Ca, K, Mg e Na as amostras foram diluídas (1:50 v/v) e para Zn a diluição foi de 1:25 v/v. Triton X-100 foi adicionado às soluções analíticas com o objetivo de melhorar a repetitividade das determinações. Os resultados obtidos com o método descrito acima foram concordantes com aqueles obtidos para as amostras digeridas.

Mckinstry *et al.* (Mckinstry *et al.*, 1999) e Hua *et al.* (Hua *et al.*, 2000) determinaram Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em fórmulas infantis e leite em pó por ICP OES configurado radialmente. Nesses estudos as amostras foram preparadas como suspensões em Triton X-100 10% v/v (Mckinstry & Indyk, 1999) e uma mistura de aminas terciárias solúveis em água (CFA-C 10% v/v) (Hua *et al.*, 2000). Testes de adição e recuperação apresentaram valores adequados para Ca, Cu, Mg, P e Zn, da mesma forma que já foi observado por Murcia *et al.* (Murcia *et al.*, 1999). Segundo os autores o uso da visão axial não melhorou significativamente a sensibilidade.

Santos *et al.* (Santos *et al.*, 2002) desenvolveram uma alternativa aos procedimentos para estabilização das suspensões de leite usando os reagentes CFA-C (Nóbrega *et al.*, 1997; Mckinstry *et al.*, 1999) e Triton X-100 (Hua *et al.*, 2000). Nesse estudo foram propostas duas misturas: MEA (monoetanolamina) + ácido cítrico e TRIS (hidroximetilaminometano) + ácido cítrico. Os resultados demonstraram que esses reagentes podem ser usados como alternativa ao

CFA-C sem comprometer a qualidade dos resultados. Outra vantagem do uso desses reagentes é o menor custo comparativamente à mistura comercial de aminas.

2.2.3 – Especificação Química

Silva *et al.* (Silva *et al.*, 2001) usaram dois procedimentos para investigar as interações entre Ca, Fe, Mg e Zn e as proteínas do leite bovino. As separações seletivas nas amostras foram obtidas usando precipitação ácida das proteínas com ácido tricloroacético (TCA) e hidrólise enzimática das proteínas empregando uma solução de pepsina. Os resultados foram comparados com as concentrações totais obtidas após decomposição ácida em forno de microondas e medidas por ICP OES. Os dados obtidos por precipitação enzimática e ácida mostraram diferentes interações entre Ca, Fe, Mg e Zn no sistema formado pelos constituintes do leite. Ca, Mg e Zn estavam preferencialmente associados ao fosfato de cálcio coloidal, enquanto o Fe estava ligado à cadeia peptídica da caseína que foi quebrada pela enzima da pepsina. Essas aproximações podem ser usadas para avaliar a complexidade desses tipos de interações químicas.

Um método de especificação envolvendo a extração em fase sólida de frações de analitos (Cu e Mn) usando um sistema de injeção em fluxo e determinação por ICP OES foi investigado por Abolino *et al.* (Abolino *et al.*, 1998). O método desenvolvido foi baseado na extração em fase sólida de frações seletivas dos analitos, seguida pela eluição e quantificação dos analitos. Antes da execução do procedimento proposto, a fração protéica do leite foi separada por precipitação a fim de obter soluções límpidas. Essa estratégia foi necessária para evitar problemas de entupimento das microcolunas de separação. As determinações nas amostras reais foram feitas usando o método das adições de analito, e, de acordo com os resultados obtidos, o Cu está distribuído principalmente entre a fração catiônica (40%) e a fração ligada à caseína (53%), enquanto que o Mn encontra-se principalmente na forma catiônica (47%), associado a espécies não retidas na coluna (25%) e ligado à caseína (10%). Segundo os autores, o Mn parece preservar a forma química na qual o elemento é introduzido como nutriente no alimento.

Bocca *et al.* (Bocca *et al.*, 2000) determinaram Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em cinco diferentes frações de leite humano (agregados de caseína, imunoglobina, soro albumina e lactoferrina, lactalbumina e substâncias de baixo peso molecular, ex., compostos não-

protéicos). As separações foram obtidas por cromatografia de exclusão de tamanho (do inglês SEC) e as determinações foram feitas por ICP OES configurado axialmente e com nebulização ultra-sônica. De acordo com o estudo, Cu e Fe estão distribuídos entre todos os compostos orgânicos, porém, o Fe está associado principalmente às proteínas da caseína e imunoglobulina. Já o Ca e Mg estão ligados preferencialmente aos compostos de baixo peso molecular (não-protéicos) enquanto que o Mn pode ser encontrado em quantidades razoáveis nos agregados de caseína (28%) e nos compostos de baixo peso molecular (30%). Por outro lado, Zn está ligado principalmente a lactalbumina, no entanto, frações consideráveis de Zn também podem ser encontradas associadas aos citratos, caseínas, albumina e lactoferrina. O estudo também mostrou que Ca e Mg apresentam uma associação fortemente positiva, enquanto que a associação entre Cu e Zn foi bastante negativa. Esse comportamento confirma a interação competitiva metal-metal nos processos de transferência do trato gastrointestinal para o sangue (Bocca *et al.*, 2000; Franco, 2004).

2.4 – Espectrometria de massas acoplada a plasma induzido (ICP-MS)

2.4.1 – Procedimentos envolvendo digestão ácida

Krushevska *et al.* (Krushevska *et al.*, 1996) empregaram o reagente CFA-C para melhorar os sinais de As e Se e reduzir as interferências isobáricas causadas por ArCl^+ nas determinações por ICP-MS. Foram analisadas amostras certificadas de tecido de ostra, leite desnatado, formulação de dieta e fígado bovino. As amostras foram decompostas usando três diferentes procedimentos, digestão em forno de microondas, digestão sob alta pressão (HPA) e por via seca. Às soluções resultantes dos dois últimos procedimentos adicionou-se CFA-C 10% v/v. Comparando os procedimentos, em termos de limites de detecção e interferências causadas por ArCl^+ , com CFA-C ou com a adição de nitrogênio no plasma, foi observado que os resultados obtidos na presença das aminas foram mais exatos. A análise de materiais de referência de tecido de ostra, leite desnatado e fígado bovino atestaram a aplicabilidade do método.

Alkanani *et al.* (Alkanani *et al.*, 1994) investigaram a eficiência de dois procedimentos de digestão para a análise de amostras de leite em pó, leite humano e em formulações infantis por ICP-MS. Os analitos determinados foram As, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb e Zn. As amostras foram digeridas em forno de microondas com cavidade e frascos fechados e em um tubo de digestão (PFA) fechado aquecido em chapa. Utilizando o procedimento de digestão ácida em forno de microondas, os autores obtiveram precisões adequadas (RSD < 5%) para a maioria dos analitos, porém, para alguns analitos (As, Cd e Cr) a precisão obtida foi baixa (RSD > 20%). Isso ocorreu, provavelmente, devido às concentrações desses elementos serem próximas dos limites de detecção.

Uma etapa de pré-concentração ou de pré-separação dos elementos alcalinos com acetato de amônio após a etapa de digestão também foi testada (Alkanani *et al.*, 1994). A primeira alternativa apresentou desempenho inferior ao demonstrado pela análise direta das amostras, enquanto que a segunda reduziu significativamente a concentração dos analitos nas soluções digeridas reduzindo dessa forma problemas de interferências isobáricas. Porém, junto com os metais alcalinos a eluição de outros analitos também foi observada (ex. Pb e Ni), dificultando a quantificação desses elementos na matriz de interesse. Por outro lado, os valores de concentração obtidos usando o método de digestão em chapa aquecida foram concordantes com os valores certificados para a maioria dos analitos investigados. No entanto, esse procedimento levou cerca de 5 dias para ser completado, o que pode ser considerado como uma limitação importante. Já os valores para as amostras de leite materno foram concordantes com os valores da literatura.

Amarasiriwaradena *et al.* (Amarasiriwaradena *et al.*, 1997) digeriram 5 g de leite bovino e humano em um sistema de digestão sob alta pressão (HPA). A digestão das amostras levou cerca de 1,5 h, a 230 °C, sob uma pressão de 115 – 118 bar. Esse procedimento possibilitou a determinação de Ca, Fe, K, Na, Mg, P e Zn por ICP OES e Al, Cu, Mn, Mo, Rb e Se por ICP-MS em amostras de leite desnatado certificado, com adequada exatidão. A análise semi-quantitativa das amostras de leite digeridas identificaram mais de 30 elementos, entre eles As, Hg e Se com boas recuperações. A quantidade de carbono residual nas amostras digeridas foi de 1,2% m/v.

Dois diferentes métodos de preparação da amostra para análise por ICP-MS com diluição isotópica foram investigados por Radlinger e Heumann (Radlinger & Heumann, 1998) com o objetivo de determinar iodo em amostras à base de leite e soja. A quantificação de iodo em três amostras certificadas de leite (BCR 063, 150 e 151) e uma de fígado bovino (BCR 185) após a extração do analito com TMAH, sob alta temperatura em frasco fechado ou

após a decomposição ácida ($\text{HClO}_4 + \text{HNO}_3$) em forno de microondas, apresentou boa exatidão. A análise de amostras de leite líquido (a partir do pó) e de alimento à base de soja feita por ICP-MS com diluição isotópica e por ICP-MS foram concordantes, porém, a taxa de amostragem, o nível de interferências e a precisão foram melhores com a técnica usando diluição isotópica.

Gélinas *et al.* (Gélinas *et al.*, 1998) investigaram três métodos de preparo de amostras para a determinação de iodo por ICP-MS em formulações infantis, mistura dietética e em leite em pó. O método de combustão com oxigênio ativado por radiação infravermelha (*Trace-O-Mat*) e o método de combustão em frasco de Schöniger mostraram bons resultados para as amostras investigadas. Porém, o primeiro método mostrou uma menor taxa de amostragem, maior custo e maior complexidade em relação ao segundo método. Por outro lado, o procedimento baseado na extração à temperatura ambiente com CFA-C 10% v/v apresentou recuperações quantitativas de iodo nas amostras investigadas. A simplicidade do preparo das amostras e a taxa de amostragem foram os maiores atrativos desse método, embora, como destacado pelos autores, o reagente CFA-C parece não ser indicado para a extração de iodo em amostras de tecido de ostra e fígado bovino, por exemplo, devido às baixas recuperações observadas.

2.4.2 - Amostras preparadas como suspensões

Baumann (Baumann, 1990) determinou iodo por ICP-MS após uma simples diluição de amostras de leite em pó certificadas (350 – 400 mg) em amônia 0,5% v/v. A concentração de iodo determinado com o método proposto ficou próxima ao valor de referência (CRM 150) e concordante para a amostra de referência CRM 63. Os valores obtidos por ICP-MS foram comparados com os valores obtidos por fluorescência de raios-X e pelo método analítico. Os resultados foram concordantes para todas as amostras investigadas.

Sturup e Büchert (Sturup & Büchert, 1996) desenvolveram um método baseado na associação de um sistema de injeção em fluxo e um ICP-MS para a determinação de Cu e iodo em leite *in natura* e em leite em pó. O preparo das amostras baseou-se na diluição com KOH 0,05 mol L⁻¹ e TMAH 0,07 mol L⁻¹. Os efeitos de matriz sobre o Cu somente foram contornados com o uso do método de adição padrão. A repetitividade e a reprodutibilidade para o iodo foram inadequadas para um dos materiais de referência certificado (CRM 063)

devido à quantidade medida do analito ser próxima ao seu limite de detecção. Isso ocorreu devido ao alto fator de diluição da amostra usado. No entanto, para as demais amostras de leite em pó certificadas os resultados de exatidão foram adequados. O procedimento desenvolvido apresentou uma frequência de amostragem de aproximadamente 11 amostras/hora, porém, segundo os autores, o método não foi eficaz na determinação de outros elementos como Al, As, Cr, Ni, Cd, Se e Pb devido aos efeitos de memória no ICP-MS, interferências isobáricas ou solubilidade insuficiente dos analitos em meio alcalino.

Carrion *et al.* (Carrion *et al.*, 1994) emulsificaram amostras de leite materno com etoxi-nonilfenol (0,03% m/v) com o objetivo de determinar Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn por ICP-MS. Com a emulsificação foi possível determinar todos os analitos em uma amostra de leite desnatado em pó certificado com exatidão ao nível de 95% de confiança. A precisão do método foi avaliada com a análise de amostras reais de leite integral materno e a precisão das medidas ficou em torno de 0,3 – 2%. Com o método descrito foi possível determinar diferentes analitos no leite de 50 mulheres venezuelanas.

Capítulo 3

Quimiometria

3 – QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. A princípio, esses métodos foram desenvolvidos e empregados em outras áreas do conhecimento, enquanto que as soluções dos problemas em química analítica eram obtidas através de métodos tradicionais de análises por via úmida como, titulação, precipitação, reações específicas, extração, etc. Esses métodos tradicionais ainda muito importantes são, em alguns casos, considerados lentos e dispendiosos. A partir dos anos 70, o desenvolvimento tecnológico relativo ao surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química, possibilitou a geração de uma gama de informações, de forma rápida e com boa qualidade, que além de grandes dimensões, são às vezes, complexas e variadas, não podendo dessa maneira ser explicadas por modelos teóricos da química clássica. Foi então que um certo número de químicos, como S. Wold (Umea University - Suécia), se intitularam como quimiométricos dando origem a uma nova área dentro de química analítica (Borges Neto, 2001; Otto, 1999; Bruns & Faigle, 1995).

A quimiometria enfoca o estudo de medidas analíticas baseando-se na idéia da observação indireta, relacionando essas medidas à composição química de uma substância e deduzindo o valor de uma propriedade de interesse através de alguma relação matemática. Devido à sofisticação das técnicas analíticas, novos métodos quimiométricos são desenvolvidos até os dias de hoje, com o objetivo de resolver problemas de análise de dados multivariados.

Conforme o objetivo do estudo, a quimiometria pode ser dividida em algumas áreas muito aplicadas atualmente como: estatística descritiva, processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados, métodos de inteligência artificial, dentre outras (Otto, 1999; Bruns & Faigle, 1995; Wold & Sjöstrom, 1998; Seasholtz, 1999; Miller & Miller, 2000; Vandeginste *et al.*, 1998; Beebe *et al.*, 1998). Com a real possibilidade de se trabalhar sistemas multivariados, métodos quimiométricos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de resolver os problemas para analisar os dados desse tipo de sistema (Borges Neto, 2005).

3.1 – Figuras de mérito

3.1.1 – Método dos Mínimos Quadrados

Em química analítica, a calibração estabelece a forma com que o sistema responde a alterações no parâmetro medido, enquanto que a rastreabilidade estabelece a exatidão do resultado da medição [VIM 3.5] (Portaria INMETRO nº 029/1995, 2000) através de materiais de referência. Essencialmente, a rastreabilidade é uma propriedade do valor do resultado de uma medição ou do valor transportado por um material de referência, nunca podendo ser atribuída a um método, a um instrumento, a um material ou a um Instituto (Nacional) de Metrologia, mas sempre a outro valor (De Bièvre, 1999). Os métodos estatísticos, por sua vez, são ferramentas indispensáveis no desenvolvimento e na utilização dos procedimentos de medição [VIM 2.5]. Na validação de métodos de análises quantitativos, o conhecimento de uma função da resposta instrumental é essencial, sendo, dentro de uma extensão de aplicação, a relação entre a resposta (o sinal medido) e a concentração ou quantidade do analito na amostra. Esta relação é obtida através de uma simples regressão linear, estimando os parâmetros da regressão, inclinação e intercepto, pelo método dos mínimos quadrados (De Beer *et al.*, 2006). Em análise química instrumental, a regressão linear é usada para fazer a calibração do método de medição. A variável independente é, em geral, a concentração do analito.

A regressão linear é um método para se obter a melhor função $y = f(x; p_1, p_2, \dots, p_m)$, linear nos m parâmetros p_i ajustados, entre a variável independente x e a variável dependente y , *e.g.*: um polinômio de 2º grau: $y = p_1 + p_2x + p_3x^2$. A variável x também é chamada de variável preditora, enquanto a variável y é chamada de resposta instrumental.

O método de regressão linear mais comumente usado é o Método dos Mínimos Quadrados – MMQ. Existem dois tipos básicos de MMQ:

- MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinário ou não ponderado (Ordinary Least Square – OLS).
- MMQP - Método dos Mínimos Quadrados Ponderado (Weighted Least Square – WLS).

Cada um dos dois tipos de MMQ pode ser dividido em dois casos:

- MMQO com variância comum $\sigma^2(y_i) = \sigma^2$ conhecida.
- MMQO com variância comum $\sigma^2(y_i) = \sigma^2$ desconhecida e estimada a partir do desvio padrão do ajuste ou residual s^2 .
- MMQP com variâncias $\sigma^2(y_i)$ conhecidas e diferentes, que chamamos de MMQP Absoluto – MMQPA.
- MMQP com variâncias $\sigma^2(y_i)$ desconhecidas, mas com relação entre elas conhecidas, que chamamos de MMQP Relativo – MMQPR.

Evidentemente nunca conhecemos o valor de σ^2 ou dos $\sigma^2(y_i)$, assim, quando dizemos que eles são conhecidos, queremos significar com isso que, temos estimativas bastante seguras de seus valores. Podemos usar como estimativas seguras dessas variâncias, o quadrado das incertezas experimentais obtidas de uma contabilidade sistemática das contribuições de todas as fontes de incerteza segundo o ISO GUM (INMETRO - GUM, 1998). A maioria da literatura química relata apenas o MMQO. Esse método, porém, só pode ser usado se forem obedecidas as seguintes condições:

- As incertezas de x devem ser nulas: $s_{x_i} = 0$ ou, pelo menos, são desprezíveis em relação as incertezas de y . Para o caso da reta, devemos observar: $bs_{x_i} \ll s_{y_i}$.
- As incertezas de y são as mesmas para todos os pontos $s_{y_i} \cong s_{y_j}$, essa é a condição de homocedasticidade.
- Todas as covariâncias entre x_i e x_j são nulas: $\text{cov}(x_i, x_j) = 0$.

As $\text{cov}(y_i, y_j) = 0$ podem não ser nulas, mas se forem nulas, V_y é diagonal e os cálculos se simplificam. O MMQ não exige que os valores de y obedeçam *fdp* normais (Hamilton, 1964) como geralmente aparece na literatura, mas quando isso ocorre, os estimadores de MMQ são equivalentes aos estimadores de máxima verossimilhança e podemos facilmente atribuir valores de probabilidades aos limites de confiança obtidos, assim como fazer testes de hipóteses.

Atualmente, vários pesquisadores quando realizam a etapa de calibração do método analítico, utilizado para uma dada medição, realizam o Método dos Mínimos Quadrados Ordinário, sem considerar o comportamento dos dados obtidos, como as respostas instrumentais, para certas faixas de concentração do analito a ser analisado. A utilização

$$J = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & a_{ii} & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial y_1}{\partial p_1} & \frac{\partial y_1}{\partial p_2} & \cdots & \frac{\partial y_1}{\partial p_n} \\ \frac{\partial y_2}{\partial p_1} & \frac{\partial y_2}{\partial p_2} & \cdots & \frac{\partial y_2}{\partial p_n} \\ \vdots & \vdots & \frac{\partial y_i}{\partial p_i} & \vdots \\ \frac{\partial y_n}{\partial p_1} & \frac{\partial y_n}{\partial p_2} & \cdots & \frac{\partial y_n}{\partial p_n} \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

Os erros e_i da matriz E têm médias zero e variâncias finitas.

Nosso problema é encontrar o melhor estimador \hat{P} para os parâmetros P . Iniciaremos supondo que conhecemos as variâncias (incertezas $u(y_i) = \sigma_i$) e covariâncias de todos os valores das respostas instrumentais y_i através da matriz das variâncias e covariâncias ou simplesmente matriz das covariâncias V_y :

$$V_y = \begin{bmatrix} \text{var}(y_1) & \text{cov}(y_1, y_2) & \cdots & \text{cov}(y_1, y_n) \\ \text{cov}(y_2, y_1) & \text{var}(y_2) & \cdots & \text{cov}(y_2, y_n) \\ \vdots & \vdots & \text{var}(y_i) & \vdots \\ \text{cov}(y_n, y_1) & \text{cov}(y_n, y_2) & \cdots & \text{var}(y_n) \end{bmatrix} \quad (3.3)$$

ou

$$V_y = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_1 \sigma_2 \rho_{12} & \cdots & \sigma_1 \sigma_n \rho_{1n} \\ \sigma_2 \sigma_1 \rho_{21} & \sigma_2^2 & \cdots & \sigma_2 \sigma_n \rho_{2n} \\ \vdots & \vdots & \sigma_i^2 & \vdots \\ \sigma_n \sigma_1 \rho_{n1} & \sigma_n \sigma_2 \rho_{n2} & \cdots & \sigma_n^2 \end{bmatrix} \quad (3.4)$$

onde:

$$\sigma_i^2 = \text{var}(y_i) = \text{cov}(y_i, y_i) = v_{ii} = \mathcal{E}\{e_i^2\} \quad (3.5)$$

e

$$\sigma_i \sigma_j \rho_{ij} = \text{cov}(y_i, y_j) = v_{ij} = \mathcal{E}\{e_i e_j\} \quad (3.6)$$

O termo ρ_{ij} é o coeficiente de correlação linear entre y_i e y_j :

$$\rho_{ij} = \frac{\text{cov}(y_i, y_j)}{\sqrt{\text{var}(y_i) \cdot \text{var}(y_j)}} = \frac{\sigma_{ij}^2}{\sigma_i \sigma_j} = \frac{\mathcal{E}\{e_i e_j\}}{\sqrt{\mathcal{E}\{e_i^2\} \mathcal{E}\{e_j^2\}}} \quad (3.7)$$

O Método dos Mínimos Quadrados proposto por Gauss, para o caso de variâncias iguais, MMQO, consistia em minimizar a soma dos quadrados dos desvios d_i ou resíduos entre os valores experimentais y_i calculados e estimados \hat{y}_i :

$$SQ = \sum_{i=1}^n d_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3.8)$$

onde

$$\hat{Y} = J\hat{P} \quad (3.9)$$

que é equivalente a minimizar:

$$SQ = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n d_i^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sigma^2} \quad (3.10)$$

Definindo a matriz dos resíduos:

$$D_{n,1} = Y - \hat{Y} = Y - J\hat{P} \quad (3.11)$$

Então, minimizar SQ é equivalente em minimizar a forma quadrática:

$$SQ = \sigma^{-2} D^t D \quad (3.12)$$

Quando as variâncias não são iguais, isto é, quando temos o MMQP, também devemos minimizar a forma quadrática:

$$SQ = D^t V_y^{-1} D = (Y - J\hat{P})^t V_y^{-1} (Y - J\hat{P}) \quad (3.13)$$

Assim, temos:

$$\begin{aligned}
D^t V_y^{-1} D &= (Y - J\hat{P})^t V_y^{-1} (Y - J\hat{P}) \\
&= Y^t V_y^{-1} Y + \hat{P}^t J^t V_y^{-1} J\hat{P} - Y^t V_y^{-1} J\hat{P} - \hat{P}^t J^t V_y^{-1} Y \\
&= Y^t V_y^{-1} Y + (J\hat{P})^t V_y^{-1} J\hat{P} - 2\hat{P}^t J^t V_y^{-1} Y
\end{aligned}$$

Derivando SQ relativamente aos parâmetros a ajustar p_i e igualando a zero:

$$\frac{\partial SQ}{\partial \hat{P}^t} = \frac{\partial (D^t V_y^{-1} D)}{\partial \hat{P}^t} = 2(J^t V_y^{-1} J\hat{P} - J^t V_y^{-1} Y) = 0 \quad (3.14)$$

Obtemos as chamadas equações normais:

$$(J^t V_y^{-1} J)\hat{P} = J^t V_y^{-1} Y \quad (3.15)$$

Definimos a matriz das equações normais B através da equação:

$$B \equiv J^t V_y^{-1} J \quad (3.16)$$

Com a equação (3.16), a equação (3.15) pode ser reescrita:

$$\begin{aligned}
B\hat{P} &= J^t V_y^{-1} Y \\
\hat{P} &= B^{-1} J^t V_y^{-1} Y
\end{aligned} \quad (3.17)$$

O estimador de MMQ de P , dado pela equação (3.17) é de mínima variância e também minimiza a variância de qualquer combinação linear dos parâmetros. Daí a importância do MMQ (Hamilton, 1964). Em particular, usando as incertezas dos parâmetros ajustados, podemos obter a incerteza da interpolação de um dado valor de x_0 a partir da resposta instrumental y_0 medida experimentalmente.

A matriz de covariâncias dos parâmetros ajustados é definida por:

$$V_p = B^{-1} = \sigma^2 (J^t W J)^{-1} \quad (3.18)$$

Então, para obtermos as incertezas dos parâmetros ajustados, precisamos conhecer σ^2 . Por outro lado, podemos estimar as incertezas nos parâmetros ajustados, substituindo σ^2 na equação (3.18) por seu estimador não tendencioso s^2 :

$$\hat{V}_p = s^2 (J^t W J)^{-1} \quad (3.19)$$

Precisamos, então, obter s^2 a partir dos dados experimentais. Assim, usando o método dos momentos, um estimador não tendencioso da variância σ^2 da observação de peso unitário é:

$$s^2 = \hat{\sigma}^2 = \frac{D^t W D}{n - m} \quad (3.20)$$

Onde n é o número de pontos experimentais na calibração e m é o número de parâmetros ajustados de B . O termo s^2 é uma espécie de variância ponderada do ajuste ou variância residual ponderada. Finalmente, inserindo a equação (3.20) na equação (3.18) ou equação (3.19), obtemos um estimador não tendencioso para a matriz das covariâncias para os parâmetros:

$$\hat{V}_p = s^2 B^{-1} = \frac{D^t W D}{n - m} (J^t W J)^{-1} \quad (3.21)$$

Que é o produto do inverso da matriz das equações normais pela estimativa de σ^2 .

No contexto do MMQO, se o valor da variância comum σ^2 é conhecido, então usamos esse valor na equação (3.18) para obter as variâncias dos parâmetros, na diagonal de V_p e as covariâncias entre eles fora da diagonal. Se σ^2 não é conhecido, então estimamos σ^2 pela equação (3.20) e obtemos V_p através da equação (3.19), *i.e.*: calculamos V_p através da equação (3.21). Nos dois casos, usamos $W = I$.

3.1.2 - Qualidade do ajuste do MMQ

Para avaliar a qualidade do ajuste do MMQ podemos calcular os resíduos através da expressão:

$$D_{n,1} = Y - \hat{Y} = Y - J\hat{P} \quad (3.11)$$

Com os resíduos, podemos calcular os resíduos padronizados ou reduzidos $\frac{d_i}{s_i}$, que consistem no resíduo dividido pela incerteza em cada ponto da curva de calibração. Para um bom ajuste, os resíduos padronizados devem ter valores, em módulo, em torno de 1. Também podemos utilizar o valor do chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2) para avaliar a qualidade do ajuste, que possui o intervalo de confiança $IC = 1 - 2\sqrt{\frac{2}{\nu}} < \chi_{red}^2 < 1 + 2\sqrt{\frac{2}{\nu}}$.

Se a $Y \sim N(\mu, \sigma)$ então a soma de quadrados SQ definida na equação (3.13):

$$SQ = D^t V_y^{-1} D = (Y - J\hat{P})^t V_y^{-1} (Y - J\hat{P}) \quad (3.13)$$

Será uma variável de χ^2 , pois $D \approx N(0,1)$, cujo valor esperado é o grau de liberdade $\nu = n - m$:

$$\chi^2 = SQ = D^t V_y^{-1} D \quad (3.22)$$

Definimos como chi-quadrado reduzido, χ_{red}^2 a razão do chi-quadrado pelo seu grau de liberdade:

$$\chi_{red}^2 \equiv \frac{\chi^2}{n - m} = \frac{D^t V_y^{-1} D}{n - m} \quad (3.23)$$

Se os valores de χ_{red}^2 forem muito maiores que 1 ou muito próximo de zero, poderá ser explicado por uma ou ambas das razões a seguir:

➤ A matriz V_y está mal estimada, *i.e.* as incertezas experimentais estão sub ou super estimadas, levando a chi-quadrado reduzido alto ou baixo, respectivamente.

➤ A função ajustada não é adequada, ou ela tem poucos parâmetros a ajustar ou têm parâmetros demais levando a chi-quadrado reduzido alto ou baixo, respectivamente.

Neste trabalho, os testes do chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2) e os resíduos padronizados, foram usados para avaliar a qualidade do ajuste do Método dos Mínimos Quadrados Ponderado Absoluto e do Método dos Mínimos Quadrados Ordinário, quando utilizado.

3.1.3 - Limites de Confiança e Limites de Previsão do Ajuste

As curvas do limite de confiança do ajuste (CLCA) são duas curvas acima e abaixo da reta ajustada que indicam onde devemos encontrar os valores da variável dependente usados na calibração para um dado nível da confiança. As curvas do limite de previsão (CLP) são duas curvas acima e abaixo da reta ajustada que indicam onde devemos encontrar os valores da variável dependente para um dado nível da confiança, no caso de refazermos uma nova medição da resposta instrumental. Essas últimas são as curvas que interessam para químico analítico.

As CLCA no contexto do MMQ somente informam a região ao redor da reta onde devemos encontrar uma dada percentagem dos pontos usados para a calibração e podem ser construídas da seguinte forma:

Consideremos um dado ponto específico de x , digamos x^* , do ajuste da reta $y = a + bx$. Então, para o ponto x^* temos: $y^* = a + bx^*$, onde $a = p_1$ e $b = p_2$ são os parâmetros ajustados pelo MMQ. A variância de y^* será estimada por:

$$s^2(y^*) = s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* \text{cov}(a, b) \quad (3.24)$$

As variâncias e covariâncias aqui consideradas são obtidas da matriz V_p estimada pela equação (3.21). Para o MMQO obtemos:

$$s^2(y^*) = s_{res}^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{Q_{xx}} \right] \quad (3.25)$$

Onde s_{res}^2 é dado pela equação (3.20) com $W = I$, é a variância do ajuste ou variância residual do ajuste [aqui não ponderada como na equação (3.20)]:

$$s_{res}^2 = s^2 = \frac{D^t D}{N - m} \quad (3.26)$$

Onde N é o número total de pontos, incluindo as replicatas. O desvio padrão residual do ajuste obtido da equação (3.26) pode ser escrita na forma não matricial como:

$$s_{res} = \sqrt{\left(\frac{1}{N - 2}\right) \left\{ N a^2 + \sum_{i,j=1}^N y_{i,j}^2 + b^2 \sum_{i,j=1}^N x_{i,j}^2 + 2 a b \sum_{i,j=1}^N x_{i,j} - 2 a \sum_{i,j=1}^N y_{i,j} - 2 b \sum_{i,j=1}^N x_{i,j} y_{i,j} \right\}} \quad (3.27)$$

E o Q_{xx} é o determinante de B dividido por N , o número total de pontos, dado por:

$$Q_{xx} = \sum_{i,j=1}^N (x_{i,j} - \bar{x})^2 = \frac{\det(B)}{N} = \frac{\det(J^t J)}{N} = \sum_{i,j=1}^N x_{i,j}^2 - \frac{\left(\sum_{i,j=1}^N x_{i,j}\right)^2}{N} \quad (3.28)$$

Assim, usando a equação (3.29) podemos construir a CLCA, ponto a ponto, adicionando e subtraindo ao valor de y dado pela curva ajustada $t_{\alpha/2; N-2} s(y^*)$ (Hines & Montgomery, 1990; Vandeginste *et al.*, 1997):

$$LCA_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s^2(y^*)} \equiv y^* \pm \Delta LC_y \quad (3.29)$$

$$LCA_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{Q_{xx}} \right]} \quad (3.30)$$

$$Q_{xx} = \frac{\det[J^t J]}{N} \quad (3.31)$$

Outra forma equivalente do LCA_y é:

$$LCA_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{(y^* - \bar{y})^2}{b^2 Q_{xx}} \right]} \quad (3.32)$$

As CLP de uma nova medição de y são externas às CLCA, pois elas devem incorporar a incerteza $s^2(y)$ devido a nova medição de y , que é uma medição independente daquelas usadas para construir a reta de calibração. Assim, temos:

$$s^2(y^*) = s^2(y) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* \text{cov}(a, b) \quad (3.33)$$

Onde $s^2(y)$ é a variância do novo ponto sendo medido.

No MMQO é assumido que todos os pontos têm a mesma incerteza (homocedasticidade) de y , inclusive o novo y sendo medido, a qual é estimada por $s_{res} = s$ o desvio padrão do ajuste ou desvio padrão residual do ajuste obtido da equação (3.26). Assim, as CLP de MMQO serão obtidas dos Limites de Previsão – LP_y , dados pela equação (3.34), se um único valor de y^* for medido:

$$LP_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s^2(y^*)} \equiv y^* \pm \Delta LP_y \quad (3.34)$$

$$LP_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{Q_{xx}} \right]} \quad (3.35)$$

No caso de se fazer k replicatas da nova medição de y temos:

$$LP_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[\frac{1}{k} + \frac{1}{N} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{Q_{xx}} \right]} \quad (3.36)$$

Outra forma equivalente é:

$$LP_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[\frac{1}{k} + \frac{1}{N} + \frac{(y^* - \bar{y})^2}{b^2 Q_{xx}} \right]} \quad (3.37)$$

Devido a homocedasticidade assumida no ajuste de MMQO, os LP_y , são iguais para todos os pares de pontos equidistantes acima e abaixo do centróide. Calculando os LP_y para vários valores de y^* e os colocando no gráfico da reta de calibração, obtemos as CLP. A partir das CLP podemos obter graficamente a incerteza, s_x , de x^* obtido da interpolação a partir do novo valor de y medido. Para isso, traçamos uma reta paralela ao eixo x no valor de y^* onde essa reta cruzar as CLP lemos os correspondentes valores de x_{inf} e x_{sup} que são os limites inferior e superior de confiança de x^* . E, $\frac{(x_{sup} - x_{inf})}{2}$ nos dá s_{x^*} .

Como podemos observar na figura 3.1, para o ajuste feito através do MMQO, a região de maior precisão, está em torno do centróide, onde é demonstrada pelas curvas de limite de confiança do ajuste e, conseqüentemente, pelas curvas de limite de previsão, que são simétricas em torno do centróide. Com isso, as concentrações na região em torno do centróide devem ser as escolhidas para a preparação de soluções para a verificação da exatidão do método, seja através de soluções a partir de material certificado ou em estudos envolvendo métodos de adição e recuperação, por ser a região onde se tem uma maior precisão do método analítico. Já a figura 3.2, demonstra um ajuste feito através do MMQPA, onde, ao contrário do ajuste feito pelo MMQO, a região de maior precisão, está em torno do baricentro, sendo esta a região de concentração que deve ser escolhida para a preparação de soluções para a verificação da exatidão do método, que é demonstrada pelas curvas de limite de confiança do ajuste, que são simétricas em torno do baricentro, e pelas curvas de limite de previsão, que, geralmente, são assimétricas em torno do baricentro, devido a heterocedasticidade das respostas instrumentais.

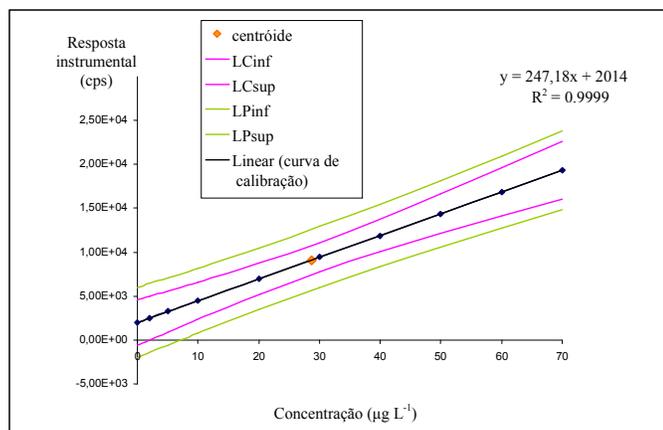


Figura 3.1. Gráfico da curva de calibração ajustada pelo MMQO, juntamente com as curvas de limite de confiança e limite de previsão do ajuste.

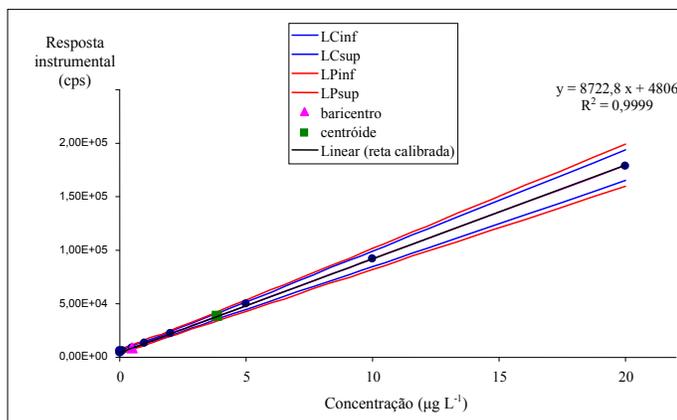


Figura 3.2. Gráfico da curva de calibração ajustada pelo MMQPA, juntamente com as curvas de limite de confiança e limite de previsão do ajuste.

Neste trabalho, utilizamos as curvas de limite de confiança e de previsão do ajuste, para assegurarmos se algum ponto, tanto utilizado na calibração do método analítico, quanto pontos de amostras analisadas, pertenceriam à mesma população de dados, ou seja, se esses pontos seriam *outliers* ou não, e na preparação de soluções para a verificação da exatidão do método.

3.1.4 - Incerteza na previsão do valor da variável regressora x^*

Em química analítica estamos mais interessados na incerteza s_{x^*} da previsão da concentração do analito na amostra de ensaio, $c^* = x^*$, em função do valor médio das absorvâncias (ou outra resposta instrumental) replicadas, $\bar{A}^* = \bar{y}$. Nesse caso, temos:

$$x^* = \frac{y^* - a}{b} \quad (3.38)$$

Aplicando novamente a expressão de propagação das incertezas:

$$s^2(x^*) = \left(\frac{\partial x^*}{\partial y^*}\right)^2 s^2(y^*) + \left(\frac{\partial x^*}{\partial a}\right)^2 s^2(a) + \left(\frac{\partial x^*}{\partial b}\right)^2 s^2(b) + 2 \frac{\partial x^*}{\partial a} \frac{\partial x^*}{\partial b} \text{cov}(a, b) \quad (3.39)$$

Obtendo as derivadas indicadas na equação (3.39) a partir da equação (3.38) e as inserindo na equação (3.39), obtemos:

$$s^2(x^*) = \left(\frac{1}{b}\right)^2 s^2(y^*) + \left(-\frac{1}{b}\right)^2 s^2(a) + \left(-\frac{y^*-a}{b^2}\right)^2 s^2(b) + 2\frac{y^*-a}{b^3} \text{cov}(a, b) \quad (3.40)$$

que conduz a incerteza padrão (EURACHEM/CITAC, 2000):

$$s(x^*) = \sqrt{\frac{s^2(y) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* \text{cov}(a, b)}{b^2}} \quad (3.41)$$

Os limites de previsão para x^* serão:

$$LP_x = x^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s^2(x^*)} \equiv x^* \pm \Delta LP_x \quad (3.42)$$

Podemos usar para os cálculos de LCA_y as equações (3.29) e (3.24), para os cálculos de LP_y as equações (3.34) e (3.33) e para os cálculos de LP_x as equações (3.42) e (3.40) ou (3.41) tanto no MMQO como no MMQPA ou no MMQPR. A partir da equação (3.41), aplicada no contexto do MMQO, obtemos a seguinte expressão, muito encontrada na literatura química (Vandeginste *et al.*, 1997; Meier & Zünd, 2000; Miller & Miller, 2000; EURACHEM/CITAC, 2000) para o cálculo de $s(x^*)$ no caso de uma reta de inclinação b :

$$s(x^*) = \frac{s_{res}}{b} \sqrt{\left[\frac{1}{k} + \frac{1}{N} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{Q_{xx}} \right]} \quad (3.43)$$

Existe na literatura (Vandeginste *et al.*, 1997; Meier & Zünd, 2000; Miller & Miller, 2000) várias propostas de expressões diferentes da equação (3.41) e ao estilo das equações (3.34) e (3.36), para o cálculo de $s(x^*)$ no contexto do MMQP. Somente aquela apresentada em (Cetama, 1983) reproduz o valor correto calculado pela equação (3.41), por isso recomendamos extrema cautela quando não usarem a equação (3.41) para esse cálculo. A expressão dada em (Cetama, 1983) produz somente resultados coincidentes com aqueles das equações (3.40) e (3.41) no MMQPA, assim, sua equação é:

$$\begin{aligned}
s(\bar{x}_{p,wA}) &= \frac{1}{b_{wA}} \sqrt{\frac{1}{k w^*} + \frac{1}{\sum w_i} + \frac{(\bar{x}^* - \bar{x}_{wA})^2 \sum w_i}{\Delta_{xx,wA}}} \\
&= \frac{1}{b_{wA}} \sqrt{\frac{1}{k w^*} + \frac{1}{\sum w_i} + \frac{(\bar{y}^* - \bar{y}_{wA})^2 \sum w_i}{b_{wA}^2 \Delta_{xx,wA}}}
\end{aligned} \tag{3.44}$$

onde os índices wA indicam que a estatística considerada foi calculada com a ponderação pelo inverso das variâncias da variável resposta. w^* é o peso da nova medição de y e pode ser o inverso da variância da média de y , se forem feitas replicatas. E, finalmente:

$$\Delta_{xx,wA} \equiv \det(J^t V_y^{-1} J) = Q_{xx,wA} \sum_{i,j=1}^N w_i = \sum_{i,j=1}^N w_i \sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2 - \left(\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j} \right)^2, \tag{3.45}$$

$$w_i = \frac{1}{s^2(y_i)}$$

Na realidade, para contemplar o fato de que para se obter as CLCA e CLP todos os limites têm de ter “simultaneamente” o mesmo nível de confiança, assim, essas curvas deveriam ser construídas através dos LP obtidos com as equações:

$$LP_x = x^* \pm \Delta LP_x = x^* \pm \sqrt{2 F_{1-\alpha;n-2} s^2(x^*)} \tag{3.46}$$

$$LP_y = y^* \pm \Delta LP_y = y^* \pm \sqrt{2 F_{1-\alpha;n-2} s^2(y^*)} \tag{3.47}$$

O espaço entre as CLP e CLCA pode ser visto como uma região conjunta de confiança, enquanto que os limites de confiança dados pelas equações (3.24) a (3.47) são as seções dessa região em cada valor da variável, são por assim dizer, limites condicionais. Observar que: $F_{1-\alpha;2;n-2} > t_{\alpha/2;n-2}$ para todo n em um dado nível de significância α . As CLP podem ser obtidas tanto a partir dos LP_y como a partir dos LP_x , pois o resultado final será o mesmo.

3.1.5 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

3.1.5.1 – Limite de detecção

Limite de detecção (*limit of detection*, LD) e limite de quantificação (*limit of quantitation*, LQ) têm recebido, nos últimos anos, diferentes conceitos e métodos para o cálculo de seus valores, que são facilmente encontrados na literatura.

O LD, também conhecido como a concentração líquida mínima detectável (*minimum detectable net concentration*) ou como limite de determinação (*limit of determination*) ou ainda limite de decisão (*limit of decision*) (EURACHEM, 1998), expresso como concentração, c , ou quantidade, q , é derivado da menor medida, x , que pode ser detectada com razoável certeza para um dado procedimento analítico. O valor de x é dado pela equação:

$$x = x_b + ks_b \quad (3.48)$$

$$LD = x_b + 3s_b \quad (3.49)$$

onde x_b é a média de medidas do branco, s_b é o desvio padrão dessas medidas e k é um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança desejado. Um valor de 3 para k é recomendado, pois representa um nível de confiança de 99,6%. Na prática, o valor $3s_b$ corresponde ao nível de confiança de 90% (IUPAC, 1985).

O LD também é conceituado como a verdadeira concentração líquida ou quantidade de analito no material analisado, que levará com uma probabilidade $(1 - \alpha)$, à conclusão de que a concentração do analito no material analisado é maior que a da matriz branca (ISO 11843-1, 1997; EURACHEM, 1998) ou também pode ser conceituado como a mais baixa quantidade do analito, se realmente presente, que será detectada e pode ser identificada (EURACHEM, 1998; Thompson & Wood, 1993; AOAC, 1993). Nesse sentido, o EURACHEM (EURACHEM, 1998) oferece breves recomendações sobre o que analisar e o que fazer com os dados para o cálculo do limite de detecção, que está sumarizado no quadro 3.1.

Quadro 3.1. Limite de detecção – Breves recomendações.

Adaptada de (EURACHEM, 1998).

O que analisar	O que calcular com os dados
a) 10 amostras independentes de branco medidas uma vez cada ou b) 10 amostras de branco fortificadas na mais baixa concentração aceitável medidas uma vez cada	Desvio padrão amostral “s” dos a) valores do branco, ou b) dos valores do branco fortificado Expressar o LD como a concentração correspondente a a) média do valor do branco + 3s ou b) 0 + 3s
Nessa abordagem assume-se que um sinal com 3s acima do sinal do branco somente seria advinda de um branco com uma probabilidade muito menor que 1% das observações, e que, portanto, deve advir de outra coisa, tal como o mensurando. A abordagem a) somente é útil se o s do branco for diferente de zero. Obter uma amostra realmente branca (sem a presença do analito) pode ser muito difícil.	
c) 10 amostras de branco fortificadas na mais baixa concentração aceitável medidas uma vez cada	Desvio padrão amostral “s” dos valores do branco fortificado Expressar o LD como a concentração correspondente ao do valor do branco + 4,65s (derivado do teste de hipóteses)
A “mais baixa concentração aceitável” é aquela concentração mais baixa para a qual um certo grau de incerteza aceitável, pode ser obtida. Assume-se como prática normal, avaliar separadamente a amostra e o branco e corrigir para o branco, subtraindo a concentração correspondente ao sinal do branco da concentração correspondente ao sinal da amostra. Se as medições forem feitas sob condição de repetitividade, isso também dará uma medida da precisão de repetitividade. Notar que tanto a média quanto o desvio padrão do branco são dependentes da matriz do branco. Portanto, o limite de detecção é dependente da matriz.	

3.1.5.2 – Limite de Quantificação

Limite de quantificação (LQ), também conhecido como limite de notificação (*limit of reporting*), é a menor concentração de um analito que pode ser mensurada com níveis aceitáveis de precisão (repetitividade) e exatidão sob as condições estabelecidas do ensaio (EURACHEM, 1998). Também pode ser conceituado como a quantidade igual ou maior que o ponto de mais baixa concentração sobre a curva de calibração (EURACHEM, 1998; AOAC, 1993) e também como características de desempenho que marcam a habilidade de um processo de medição química de “quantificar” adequadamente um analito. A habilidade para quantificar é geralmente expressa em termos do sinal ou do valor (verdadeiro) do analito que produzirão estimativas tendo um especificado desvio padrão relativo, comumente de 10%. Então:

$$LQ = k\sigma \quad (3.50)$$

onde LQ é o limite de quantificação, σ é o desvio padrão nesse ponto e k é o multiplicador cujo recíproco é igual ao desvio padrão relativo de quantificação selecionado. O valor padrão de k para a IUPAC é 10 (IUPAC Orange Book).

Nesse sentido, o EURACHEM (EURACHEM, 1998) também oferece breves recomendações sobre o que analisar e o que fazer com os dados para o cálculo do limite de quantificação, que está sumarizado no quadro 3.2.

Quadro 3.2. Limite de quantificação – Breves recomendações.
Adaptada de (EURACHEM, 1998).

O que analisar	O que calcular com os dados
a) 10 amostras independentes de branco medidas uma vez cada.	Desvio padrão amostral “ s ” dos valores do branco. Expressar o LQ como a concentração correspondente à média do valor do branco mais um dos seguintes valores: <i>i) 5s, ii) 6s, iii) 10s</i>
b) Fortificar alíquotas de uma amostra de branco em vários níveis de concentração próximos do LD. Medir, uma vez cada, 10 replicatas independentes em cada nível de concentração.	Calcular o desvio padrão amostral “ s ” do valor do analito em cada concentração. Fazer o gráfico de s versus concentração e estabelecer o valor de LQ por inspeção. Expressar o LQ como a concentração mais baixa que pode ser determinada com um adequado nível de incerteza.
Normalmente o LQ é parte do estudo para determinar a faixa de trabalho. Ele não deve ser determinado por extrapolação abaixo da mais baixa concentração do branco fortificado.	
Se as medições forem feitas sob condições de repetitividade, isso também dará uma medida da precisão de repetitividade.	

Como se pode notar, nem de longe, existe um consenso nos conceitos dos limites de detecção e de quantificação. Esses métodos de determinação do LD e LQ baseados na relação sinal/ruído não levam em consideração:

- O esquema de calibração, que tem forte influência na precisão do mensurando (a concentração da amostra), efeitos de matriz e de interferentes;
- A quase sempre heterocedasticidade da resposta instrumental em função da concentração do analito.
- Esses métodos protegem o resultado contra o Erro do Tipo I, falso positivo (concluir que o analito está presente quando não está), mas não evita o Erro do Tipo II, falso negativo (Meier & Zünd, 2000).

Existem na literatura (Vandeginste *et al.*, 1997; Meier & Zünd, 2000) propostas para obtenção desses limites a partir da curva de calibração e de suas curvas de limites de

confiança, especialmente se as soluções padrões forem preparadas a partir de uma amostra de branco ou de um material de referência certificado, representativos onde levam em consideração, todo o esquema de calibração.

3.1.6 - Limites de previsão na determinação de LD e LQ

As curvas dos LP podem ser usadas para a determinação do LD e LQ. Em (Meier & Zünd, 2000) são usadas as CLCA para a determinação de LD e de LQ, mas recomendamos o uso das CLP por englobarem a incerteza da resposta instrumental na amostra de ensaio. O uso das CLP conduzirá a LD e LQ mais conservadores. A figura 3.3 representa o processo de estimação do LD e do LQ quando o intercepto da reta de calibração é nulo: $a = 0$

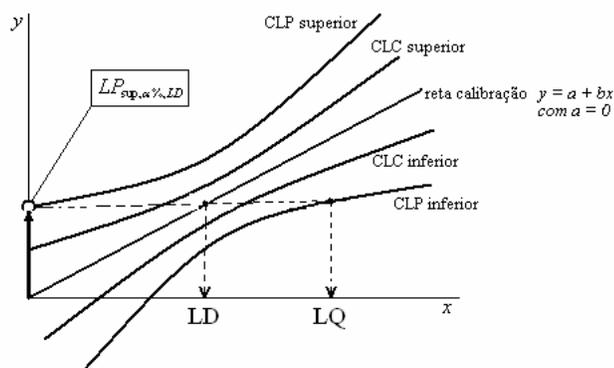


Figura 3.3. Definição dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

Para o caso de um nível de confiança $\alpha = 5\%$, qualquer valor da resposta instrumental ou sinal y , acima do ponto $LP_{sup, \alpha\%, LD}$, marcado com um círculo na figura 3.3, só tem 2,5 % de chance de ser um sinal de branco ou ruído (*noise*). Logo, $H_0: y = \text{ruído}$ é rejeitada. Assim, valores de sinal ou resposta instrumental igual ou acima $LP_{sup, \alpha\%, LD}$, devem de fato resultar da presença do analito. Podemos usar este valor para determinar o LD e LQ conforme mostrado na figura 3.3. Essa abordagem está implicitamente assumindo que a *fdp* que gera a resposta instrumental é normal, mesmo para $y = 0$. E isso é uma restrição a ela, pois certamente essa *fdp* é positivamente assimétrica, visto que, em geral, $y \geq 0$.

Para determinar o valor de $LP_{\text{sup},\alpha\%,LD}$ recomendamos os dois métodos de (Meier & Zünd, 2000) adaptados para LP , dependendo do valor do intercepto a da reta de calibração:

- Se $a \geq 0$, então $LP_{\text{sup},\alpha\%,LD} = a + \Delta LP_y$, onde ΔLP_y é calculado com $x = 0$.
- Se $a < 0$, então $LP_{\text{sup},\alpha\%,LD} = 0 + \Delta LP_y$, onde ΔLP_y é calculado com $x = \frac{-a}{b}$.

Usando as equações (3.34) e (3.36) para encontrarmos o LQ , temos que resolver a equação:

$$a + b LQ - t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s_{res}^2 \left[\frac{1}{k} + \frac{1}{N} + \frac{(LQ - \bar{y})^2}{b^2 Q_{xx}} \right]} - LP_{y,\text{sup},\alpha\%,LD} = 0 \quad (3.51)$$

ou usando as equações (3.33) e (3.34):

$$a + b LQ - t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{s^2(y_{\text{branco}}) + s^2(a) + (LQ)^2 s^2(b) + 2 LQ \text{cov}(a, b)} - LP_{y,\text{sup},\alpha\%,LD} = 0 \quad (3.52)$$

A equação (3.51) só pode ser usada para o cálculo do LQ no MMQO, pois nela usamos o s_{res} para estimar a incerteza constante das respostas instrumentais em toda faixa de medição. A equação (3.52) pode ser usada para o cálculo de LQ tanto no MMQO como no MMQPA ou MMQPR, uma vez que nelas o s_y de cada nova leitura instrumental é avaliada independentemente dos dados de calibração.

Neste trabalho, utilizamos a curva de calibração do método analítico e as curvas de limite de previsão, para obtenção do LD e LQ, na comparação com os outros métodos descritos na literatura, por razões de consistência lógica, por apresentar valores mais conservadores; por levar em consideração a matriz, os interferentes, o analito, enfim, todas as variáveis que influenciam todo o esquema de calibração.

Capítulo 4

ICP-MS

4 – ICP-MS (*espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado*)

4.1 – Aspectos relacionados

O espectrômetro de massas é um instrumento que separa íons em movimento, com base em suas razões massa-carga (m/z). A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), começou a ser estudado no começo dos anos 70 com a procura de uma técnica complementar à espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). As principais razões para o surgimento dessa nova técnica eram a necessidade de minimizar as interferências espectrais e atingir limites de detecção menores do que alcançados pela ICP OES (Ulrich, 2001).

Na espectrometria de emissão, os elementos presentes em uma amostra são atomizados (podendo também ser ionizados) e excitados. A energia emitida na desexcitação dos átomos (na forma de radiação eletromagnética) é então medida. Na espectrometria atômica de massas, as amostras também são atomizadas, mas os átomos gasosos são convertidos em íons positivos e separados com base em suas razões massa-carga (Skoog *et al.*, 2002).

A ICP-MS é uma ferramenta versátil e largamente usada na identificação dos elementos presentes em diversas amostras. Suas principais aplicações são na geoquímica, áreas ambientais, biológicas e de alimentos e isso se deve aos baixos limites de detecção, ao seu alto grau de seletividade, à sua razoável precisão e exatidão, à rápida detecção das razões isotópicas, ao pequeno volume de amostras, além, é claro, à capacidade multielementar. Cerca de 90% dos elementos podem ser determinados com limites de detecção na faixa de 0,1 a 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) em soluções aquosas (Veiga, 2000).

Um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado é composto por 5 partes principais: sistema de introdução de amostras, ICP (fonte de íons), interface (focalização), sistema analisador e sistema de detecção de íons. Na figura 4.1 podemos observar um esquema de um ICP-MS convencional.

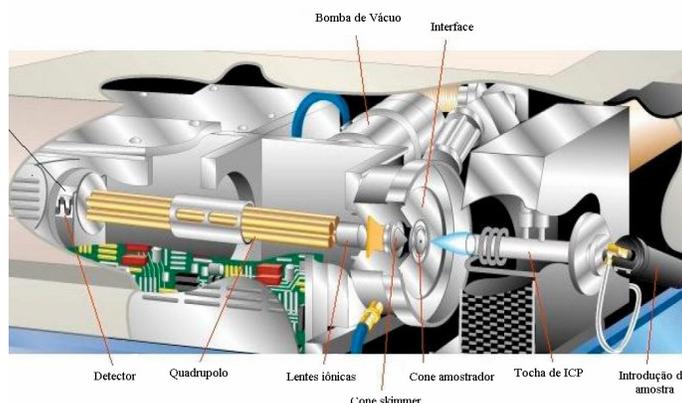


Figura 4.1. Subdivisões do espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado ELAN 9000 PerkinElmer. Fonte: Adaptado de www.perkinelmer.com

As amostras podem ser introduzidas no estado sólido, líquido ou gasoso. A introdução mais utilizada é de amostras líquidas, apresentando vantagens de homogeneidade, facilidade de manipulação e disponibilidade de solução padrão para calibração. A amostra é bombeada até o nebulizador onde é transformada em uma fina névoa. O fluxo de argônio carrega a amostra vaporizada até a tocha do ICP, onde é ionizada. O sistema de introdução de amostras sólidas mais comum é o *Laser Ablation*, onde a amostra é atingida por um feixe de raio laser, vaporizando um determinado volume de amostra. Um gás de arraste, geralmente Ar, carrega as partículas resultantes até o ICP. A introdução de amostras gasosas, *Hydride Generator*, é mais comum em processos de geração de vapor frio, tais como As, Hg e Se (Skoog *et al.*, 2002).

O plasma é um gás com os átomos em estado excitado e total ou parcialmente ionizado. Ele é gerado na tocha, que consiste de três tubos concêntricos para o transporte de gás, como mostra a figura 4.2 a). As temperaturas máximas alcançadas no plasma são da ordem de 10000 K no centro e aproximadamente 800 K nas extremidades.

A tocha é adaptada a uma bobina de indução, resfriada por água ou ar, alimentada por um gerador de radiofrequência que é capaz de produzir de 2 a 5 kW de potência, com frequência de 27 ou 41 MHz. A corrente de radiofrequência que circula através da bobina gera um campo magnético oscilante, figura 4.2 (b), que produz uma região de indução. A ionização do fluxo de argônio é iniciada por uma faísca proveniente da bobina Tesla, que fornece alguns íons e elétrons livres (Skoog *et al.*, 2002). Estes íons e elétrons livres giram em torno das linhas do campo magnético em órbitas circulares e a energia fornecida pela bobina é

convertida em energia cinética dos elétrons. Os elétrons são assim, acelerados e produzem mais íons à medida que colidem com os átomos do gás, fazendo com que a temperatura alcance 7500-8000 K nas regiões mais quentes. Uma vez que as temperaturas de ionização são atingidas, o processo é auto-sustentável, e um plasma é formado quase que instantaneamente (Veiga, 2000).

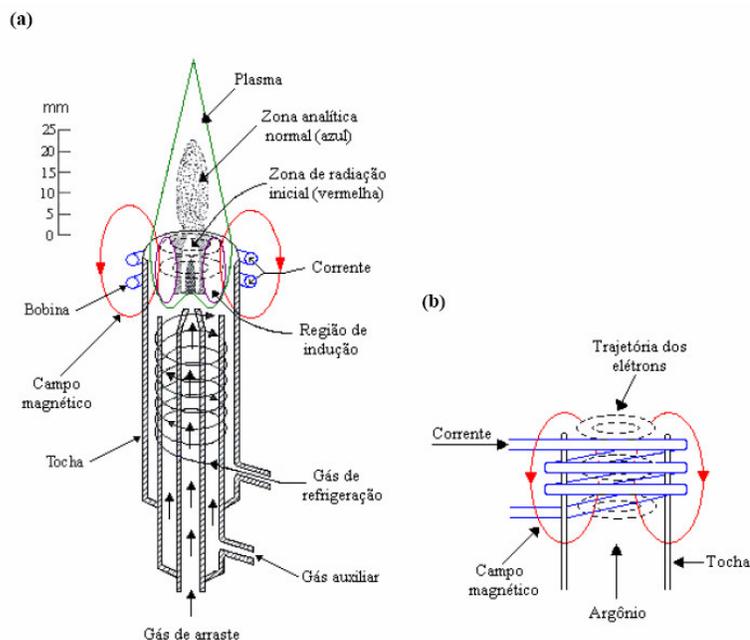


Figura 4.2. (a) Esquema de uma tocha, constituída de três tubos concêntricos, acoplada a uma bobina de indução de um gerador de radiofrequência. (b) Representação do campo magnético gerado pela corrente que circula a bobina (Potts, 1987).

A figura 4.3 mostra os estágios pelos quais o analito atravessa até atingir a atomização e ionização. Primeiramente, a amostra líquida é nebulizada, transforma-se em aerossol, e, no canal central do plasma, sofre dessolvatação passando a sólido. As partículas são, então, volatilizadas (passando a gás) e em seguida as moléculas de vapor são atomizadas (dissociação). Os átomos formados são, então, excitados e ionizados. O analito emerge da tocha como uma mistura de íons e átomos, fragmentos moleculares que podem, ainda, permanecer não dissolvidos. Uma vez que o gás no canal central deixa a tocha, a temperatura começa a cair possibilitando a recombinação dos íons, levando à formação de óxidos (Veiga, 2000).

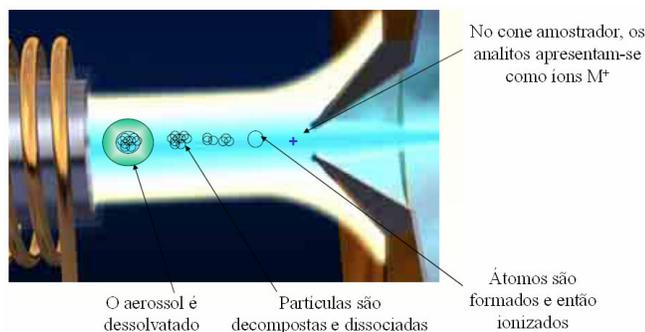


Figura 4.3. Estágios que o analito atravessa até atingir a atomização e ionização.

Fonte: Adaptado de www.agilent.com

A fonte de íons é necessária para produzir partículas carregadas que interajam com os campos elétricos e magnéticos e sejam desviadas conforme sua razão m/z . O plasma utilizado na produção de íons do ICP-MS é o mesmo utilizado nas técnicas de emissão atômica (ICP OES), porém, operando em condições ligeiramente diferentes para que favoreça a produção de íons e não a emissão de radiação, embora os dois fenômenos ocorram simultaneamente (Furusawa, 1999).

Embora a ICP-MS seja uma poderosa técnica, um de seus maiores problemas é a susceptibilidade a interferências, que podem ser divididas em duas categorias: interferências espectroscópicas e não-espectroscópicas. As interferências espectroscópicas podem ocorrer quando uma espécie iônica no plasma tem a mesma razão massa-carga (m/z) que um íon do analito:

Interferências isobáricas: A sobreposição isobárica ocorre quando dois elementos possuem isótopos de mesma massa. Esta interferência raramente impede uma determinação, pois a maioria dos elementos da tabela periódica possui um, dois ou até três isótopos que estão livres da superposição isobárica. Uma exceção é o índio, que tem dois isótopos estáveis ^{113}In e ^{115}In . O primeiro superpõe-se com o ^{113}Cd e o segundo com o ^{115}Sn . Normalmente, uma interferência isobárica ocorre com os isótopos mais abundantes. Um exemplo é a superposição do pico de ^{40}Ar com o pico do isótopo mais abundante do Ca, o ^{40}Ca (97%), tornando necessário o uso do segundo isótopo mais abundante, o ^{44}Ca (2,1%). O maior problema, neste caso, é se o isótopo escolhido for de abundância muito pequena e a concentração a ser determinada for muito baixa. Como as superposições isobáricas são previstas pelas tabelas de abundância, as correções deste problema podem ser feitas com uso de um software apropriado que leva em consideração as abundâncias isotópicas naturais dos elementos químicos (Navarro, 2004; Veiga, 2000; Skoog *et al.*, 2002).

Interferências por Íons Poliatômicos: As espécies poliatômicas são formadas pela combinação de espécies abundantes no plasma (Ar do gás de arraste, O e H da água e ácidos, N, S e Cl dos ácidos utilizados na preparação das amostras) e na matriz do analito. Os possíveis íons moleculares formados podem interferir. Essas interferências são mais encontradas em valores de m/z abaixo de 82, sendo uma das principais causas dos pobres limites de detecção nesta massa fixa. Algumas das interferências poliatômicas mais sérias incluem: $^{14}\text{N}_2^+$ com $^{28}\text{Si}^+$, NOH^+ com $^{31}\text{P}^+$, $^{16}\text{O}_2^+$ com $^{32}\text{S}^+$, $^{40}\text{ArO}^+$ com $^{56}\text{Fe}^+$ e $^{40}\text{Ar}_2^+$ com $^{80}\text{Se}^+$. Alguns dos problemas podem ser corrigidos com vários métodos propostos, tais como: o uso de um branco, uso de um isótopo diferente do analito, correções matemáticas, ajuste experimental das condições do plasma, dessolvatação, introdução de um gás alternativo, separação cromatográfica entre outros (Skoog *et al.*, 2002; Veiga, 2000).

Íons de dupla carga: Os íons de dupla carga aparecerão no espectro com metade da massa do íon desejado, pois eles são filtrados no analisador de massa com base na razão m/z . Com isso, poderá ocorrer uma pequena perda de sinal e interferências em massas semelhantes. Os elementos mais sensíveis a esta interferência são os alcalinos terrosos, alguns metais de transição e os elementos terras-raras, por possuírem baixo potencial de ionização. Este problema pode ser controlado aumentando a vazão do gás carregador e/ou diminuindo a potência de RF.

Interferências por espécies óxido e hidróxido: As espécies de interferências mais sérias no ICP-MS envolvem óxidos e hidróxidos formados pelo analito, pela matriz dos componentes, pelos gases do plasma e pelo vapor de água transportado, uma vez que o analito poderá ser atomizado em um excesso de átomos de oxigênio. A quantidade de água introduzida no plasma também poderá afetar o equilíbrio do plasma. Quase todas as espécies formam, até certo ponto, íons MO^+ e MOH^+ , onde M representa o analito ou o elemento de matriz. A eliminação ou atenuação dos óxidos é fundamental, pois a razão m/z de um óxido pode sobrepor a uma razão m/z de um analito. Um exemplo são os íons de óxidos dos isótopos naturais de titânio, com massas 62, 63, 64, 65 e 66, que podem interferir com os picos de $^{62}\text{Ni}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$ e $^{66}\text{Zn}^+$ do analito. É conhecido que as razões MO^+/M^+ dependem de parâmetros de operação como a potência do plasma, a velocidade do fluxo do gás carregador e as condições instrumentais, como a distância entre a bobina de RF e o cone amostrador, assim como o tamanho dos orifícios dos cones (*sampler* e *skimmer*). A otimização dos parâmetros instrumentais, o uso de plasma de alta potência e a baixa velocidade de fluxo do gás carregador para aumentar o tempo de residência são caminhos para reduzir e controlar a produção das razões de óxidos para níveis menores que 0,02 (2%).

As interferências não-espectroscópicas são basicamente representadas pelos efeitos de supressão e aumento de sinal, como o efeito de matriz, e por efeitos físicos como o efeito de memória.

Efeitos de matriz: No ICP-MS os efeitos de matriz mais severos são aqueles causados por elementos em concentrações maiores que 500 até 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, presentes na matriz. Normalmente esses efeitos causam redução no sinal do analito, embora em alguns casos o aumento do sinal possa ser observado. Geralmente os efeitos de matriz podem ser minimizados pela diluição das amostras, pela alteração do procedimento de introdução de amostras, pela separação das espécies interferentes ou pelo uso de padrões internos apropriados, isto é, pela introdução de um elemento que tenha a mesma massa e potencial de ionização que a do analito, como padrão interno (Skoog *et al.*, 2002).

Efeito de memória: Alguns elementos apresentam efeitos de memória após a passagem de amostras com concentrações elevadas, devido à sua aderência a partes do sistema de introdução de amostras. Assim, para minimizar este efeito, deve-se trabalhar com soluções em concentrações baixas e com soluções pouco viscosas.

4.2 - Objetivo

Dentre os objetivos previstos nesse trabalho podemos destacar o desenvolvimento de metodologias para determinação de ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As em leite materno colostro e maduro, empregando a técnica de ICP-MS e análise quimiométrica aplicada na avaliação do ajuste de modelos de calibração, na avaliação da qualidade dos ajustes e a utilização de curvas de limites de confiança e de previsão na identificação de regiões de maior precisão e para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação.

4.3 – Parte experimental

4.3.1 – Instrumentação

4.3.1.1 – Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado

Para a quantificação dos isótopos ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As , um espectrômetro Perkin-Elmer Sciex® ELAN 9000 ICP-MS quadrupolo (Concord, Toronto, Canadá) foi utilizado em todas as medidas. O instrumento foi equipado com um nebulizador de fluxo cruzado (*cross-flow*) acoplado a uma câmara de nebulização duplo-passo tipo *Scott* e um tubo injetor da tocha com 2,0 mm de diâmetro interno. Também foi utilizado argônio com 99,98% de pureza (Air Liquide, Contagem, Minas Gerais, Brasil). Os parâmetros operacionais utilizados estão mostrados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Parâmetros operacionais para o ICP-MS.

Parâmetro	
RF (40 MHz)	
Potência da RF	1000 W
Potência Refletida	< 5 W
Voltagem das Lentes	6 volts
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,86 L min ⁻¹
Medidas	Altura do pico
Varreduras	4
Leituras/Replicatas	3
Replicatas	3
Tempo de residência	50 ms
Tempo de integração	600 ms

4.3.1.2 – Forno de microondas

Um forno de microondas de média pressão (MLS 1200 MEGA, Milestone, Bergamo, Italy) equipado com 10 recipientes de Teflon®, foi utilizado para digestão das amostras de leite materno e amostras de material de referência certificado. O programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, no forno de microondas, está sumarizado na tabela 4.2 e o para a digestão das amostras certificadas na tabela 4.3. Para os dois programas de aquecimento, 10 minutos de ventilação foram necessários, para um primeiro resfriamento dos

recipientes e logo após esta etapa, os recipientes foram colocados por 30 minutos em banho com água corrente, à temperatura ambiente, para um posterior resfriamento. Os programas de aquecimento utilizados foram baseados em métodos propostos pelo fabricante para as matrizes digeridas e também através das seguintes referências: (Li *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 2001; Ikem *et al.*, 2002; Naveiro *et al.*, 2005; Vinas *et al.*, 2000; Vinas *et al.*, 2001).

Tabela 4.2. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, em forno de microondas.

Etapa	tempo (min)	Potência (W)
1	5	250
2	5	400
3	5	500
4	1	600

Tabela 4.3. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de material de referência certificado, em forno de microondas.

Etapa	tempo (min)	Potência (W)
1	1	250
2	1	0
3	6	250
4	6	400
5	4.5	600
6	1.5	250

4.3.2 - Reagentes e soluções

Foi utilizada uma solução multielementar de 1000 mg L⁻¹ (Std. 3 Perkin Elmer Pure Plus) contendo todos os elementos estudados, ácido nítrico (65% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% v/v) todos da marca Merk. Todas as soluções padrões utilizadas foram preparadas diariamente da solução estoque por simples diluição com água ultrapura Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) e acidificadas com HNO₃ a 2% v/v. O material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) foi obtido do *National Institute of Standards and Technology* (Gaithersburg, MD, EUA).

4.3.3 – Amostras

Amostras de leite materno (colostró e maduro) foram fornecidas pelo banco de leite materno da Maternidade Odete Valadares, situada em Belo Horizonte, Minas Gerais. Para o método proposto, foram analisadas 34 amostras, sendo que, 20 eram de leite maduro e 14 de leite colostró. Para as análises envolvendo estudos de adição e recuperação de analito, foi utilizada uma mistura de vários leites maternos, incluindo leite maduro e colostró. As amostras eram de mães residentes na região metropolitana de Belo Horizonte e na região centro-oeste de Minas Gerais. As amostras foram mantidas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. As amostras foram analisadas no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3.4 – Procedimento

4.3.4.1 – Preparação das amostras

Para a determinação das concentrações dos elementos estudados, alíquotas de 1,0 mL de leite humano, foram transferidas para recipientes de Teflon[®], juntamente com 2,0 mL de HNO_3 65% v/v e 0,5 mL de H_2O_2 30% v/v. Estas soluções foram digeridas em forno de microondas de média pressão, com etapas de potência que variaram de 250 a 600 W (tabela 4.2). Soluções totalmente digeridas, homogêneas e incolores foram obtidas. As amostras de leite materno, então, foram diluídas na proporção de 1:50 com água Milli-Q, preparadas em triplicatas independentes e lidas em triplicatas aleatórias. O material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) também foi digerido em forno de microondas de média pressão, pesando-se 0,05 g do mesmo e adicionando-se 2 mL de HNO_3 65% v/v, 0,5 mL de H_2O_2 30% v/v e 1 mL de água Milli-Q, para um volume final de 25 mL (tabela 4.3). As soluções de material certificado foram preparadas em triplicatas independentes e lidas em triplicatas aleatórias. Os programas de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno e de material certificado estão descritos no item 4.3.1.2.

4.3.4.2 - Parâmetros de mérito

4.3.4.2.1 – Otimização e calibração de massas do ICP-MS

A otimização do equipamento foi realizada diariamente pelo monitoramento dos sinais produzidos por uma solução contendo todos os concomitantes presentes nas amostras a serem analisadas (3,6 mg L⁻¹ de Ca, 0,5 mg L⁻¹ de Mg, 7,1 mg L⁻¹ de K, 2,3 mg L⁻¹ de Na, H₂O₂ e HNO₃) e pelo monitoramento dos sinais produzidos por uma solução multielementar contendo 10 µg L⁻¹ Mg, Rh e Pb, monitorando-se o sinal na razão massa/carga (m/z) e ajustando-se a posição da tocha em relação ao cone de amostragem. Em continuação, ajustaram-se as diferenças de potenciais aplicadas ao extrator, coletor e demais lentes, de forma a obter máxima sensibilidade. Posteriormente, foi realizada a calibração de massas usando os isótopos ²⁴Mg, ¹⁰³Rh e ²⁰⁸Pb. Depois de realizada a calibração, a resolução do quadrupolo foi ajustada em 0,6 u.m.a. As condições selecionadas foram aquelas em que maximizaram o sinal de ²⁴Mg, ¹⁰³Rh e ²⁰⁸Pb (os parâmetros operacionais para o ICP-MS estão sumarizados na tabela 4.1); então, após esta etapa, o plasma foi estabilizado por 30 min antes das análises das amostras.

4.3.4.2.2 - Linearidade e efeito de matriz

Linearidade em um método analítico é a capacidade de se obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analitos em amostras, em uma faixa de concentração específica (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003). É determinada através da análise de uma série de padrões que abrangem a faixa de concentração de interesse gerando uma curva de calibração. O coeficiente de correlação da reta gerada pela curva de calibração deve ser igual ou maior que 0,99.

A verificação da existência ou não de efeito de matriz pode ser feita comparando o perfil das curvas obtidas pela calibração aquosa e pela curva de ajuste de matriz. Se apresentarem perfis semelhantes e paralelos, o sistema não apresenta efeito de matriz. Caso a análise visual não seja possível, os coeficientes angulares das curvas podem ser comparados empregando o teste *t student* e/ou o teste F, verificando se há diferença significativa entre seus valores (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

Nesse trabalho, foi estudada uma faixa de linearidade que variou entre 0,01 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os isótopos ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As . A curva de linearidade foi construída com as soluções padrão em água ($n = 3$) e em leite materno digerido ($n = 3$), todas preparadas no mesmo dia. As inclinações das curvas de cada analito, em água e em leite digerido, foram comparadas avaliando a existência ou não de efeito de matriz significativos. As contagens por segundo (CPS) de cada concentração foram medidas três vezes e os respectivos valores médios usados para a construção das curvas de linearidade.

4.3.4.2.3 – Determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ)

Para a determinação dos parâmetros de mérito LD e LQ, comparamos as várias metodologias presentes na literatura e suas consistências lógicas. As medidas foram feitas em condições robustas pré-estabelecidas no instrumento.

4.3.4.2.4 – Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada calculando o R.S.D. (%) de 10 amostras independentes, lidas em triplicatas aleatórias, para as seguintes concentrações: 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ba, V, Se, Cr, Ni, Mn, Pb, Cu, Co, Cd, As e Al; 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe e Zn, que correspondem aos pontos de maior precisão (ver item 3.1.3), referentes à curva de calibração.

A exatidão do método foi avaliada empregando a quantificação de amostras de material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) e estudos de adição e recuperação de analito. A exatidão do método, utilizando o material de referência, foi avaliada empregando o teste t de *Student*. No caso de estudos envolvendo adição e recuperação de analito, uma recuperação ideal e desejada seria de 100%, mas flutuações de 10% são consideradas bons resultados e dentro da faixa de 20% podem ser consideradas aceitáveis (Welz & Sperling,

1999; EPA, 1998). Para o estudo de adição e recuperação de analito, soluções de leite materno foram contaminadas e preparadas em 3 níveis de concentração, 1,0, 5,0 e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito utilizado, antes da digestão em forno de microondas, preparadas em triplicatas independentes e medidas em triplicatas, nas condições robustas de operação. Os valores obtidos foram comparados com os valores adicionados (100%) e o resultado expresso em porcentagem de recuperação (%).

4.3.4.3 - Análise de amostras reais

A quantificação dos analitos de interesse, nas amostras reais, foi realizada com amostras fornecidas pelo banco de leite materno da Maternidade Odete Valadares, empregando a técnica de ICP-MS e curva de calibração aquosa, baseada nas condições ótimas de operação.

4.3.4.4 – Avaliação e emprego de padrão interno

A escolha do padrão interno apropriado na tentativa de minimizar algum efeito interferente que pudesse ocorrer sobre as linhas analíticas, foi feita pela avaliação do perfil de resposta às alterações do plasma utilizando uma solução contendo 1,0 mg L^{-1} de padrão interno. Os elementos testados como padrão interno foram Rh, In, e Ge. A utilização de padrão interno, neste trabalho, não foi necessária, sendo que, os sinais analíticos de soluções com a presença de padrão interno, não tiveram diferença significativa em relação às soluções sem a presença de padrão interno.

4.3.5 – Resultados e discussão

4.3.5.1 – Linearidade e efeito de matriz

Para o estudo da linearidade e do efeito de matriz, foram construídas três curvas de calibração aquosa e três curvas de ajuste de matriz em leite materno digerido. O método apresentou resposta linear na faixa testada de 0,01 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os isótopos ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As , tanto em curva aquosa quanto na presença da matriz.

A verificação da ocorrência de efeito de matriz foi realizada comparando os coeficientes angulares das curvas obtidas pela calibração aquosa e pela curva de ajuste de matriz, empregando o teste *t* pareado de *Student*, verificando se há diferença significativa entre seus valores. A tabela 4.4 apresenta os parâmetros analíticos para as curvas aquosa e ajuste de matriz, para o elemento ^{138}Ba , que foram ajustadas através do MMQPA.

Tabela 4.4. Parâmetros analíticos para o elemento ^{138}Ba .

Curva	Equação da reta	r^2
Curva aquosa	$y = 7293,6 (\pm 56,5) x + 461,2 (\pm 8,9)$	0,9999
Curva de ajuste	$y = 7290,7 (\pm 45,8) x + 355,3 (\pm 7,6)$	0,9997

Aplicando o teste *t* pareado de *Student*, para comparar os coeficientes angulares das duas curvas analíticas, o *t* crítico (t_c) obtido foi de 0,068; sendo este valor muito menor que $t_{95\%, 2}$, que corresponde a 4,303. Assim, verificamos que, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas, não apresentaram diferença estatística entre si, podendo assim, concluir que, não há interferência da matriz sobre os resultados medidos. A expressão aplicada neste trabalho, para calcular o *t* crítico (t_c) de *Student*, é a seguinte:

$$t_c = \frac{(x_{aq} - x_{ad})\sqrt{n}}{s} \quad (4.1)$$

onde x_{aq} corresponde ao coeficiente angular da curva aquosa, x_{ad} corresponde ao coeficiente angular da curva de ajuste, n é o número de medidas feitas ($n = 3$) e s corresponde ao desvio padrão para um nível de confiança de 95%. A figura 4.4 mostra as curvas analíticas para o elemento ^{138}Ba .

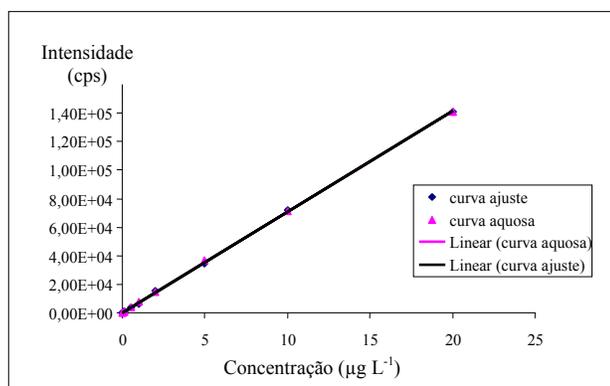


Figura 4.4. Curvas de calibração aquosa e ajuste de matriz para o elemento ^{138}Ba .

O mesmo teste foi aplicado a todos os outros metais analisados e foi demonstrado que não existe diferença significativa, em um intervalo de confiança de 95%, entre as curvas, em uma faixa de 0,01 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A figura 4.5 apresenta as curvas de calibração dos analitos presentes em água e em leite materno digerido, determinados por ICP-MS, mostrando a linearidade na faixa estudada. Assim, a calibração aquosa foi utilizada na determinação de todos os elementos analisados por ICP-MS.

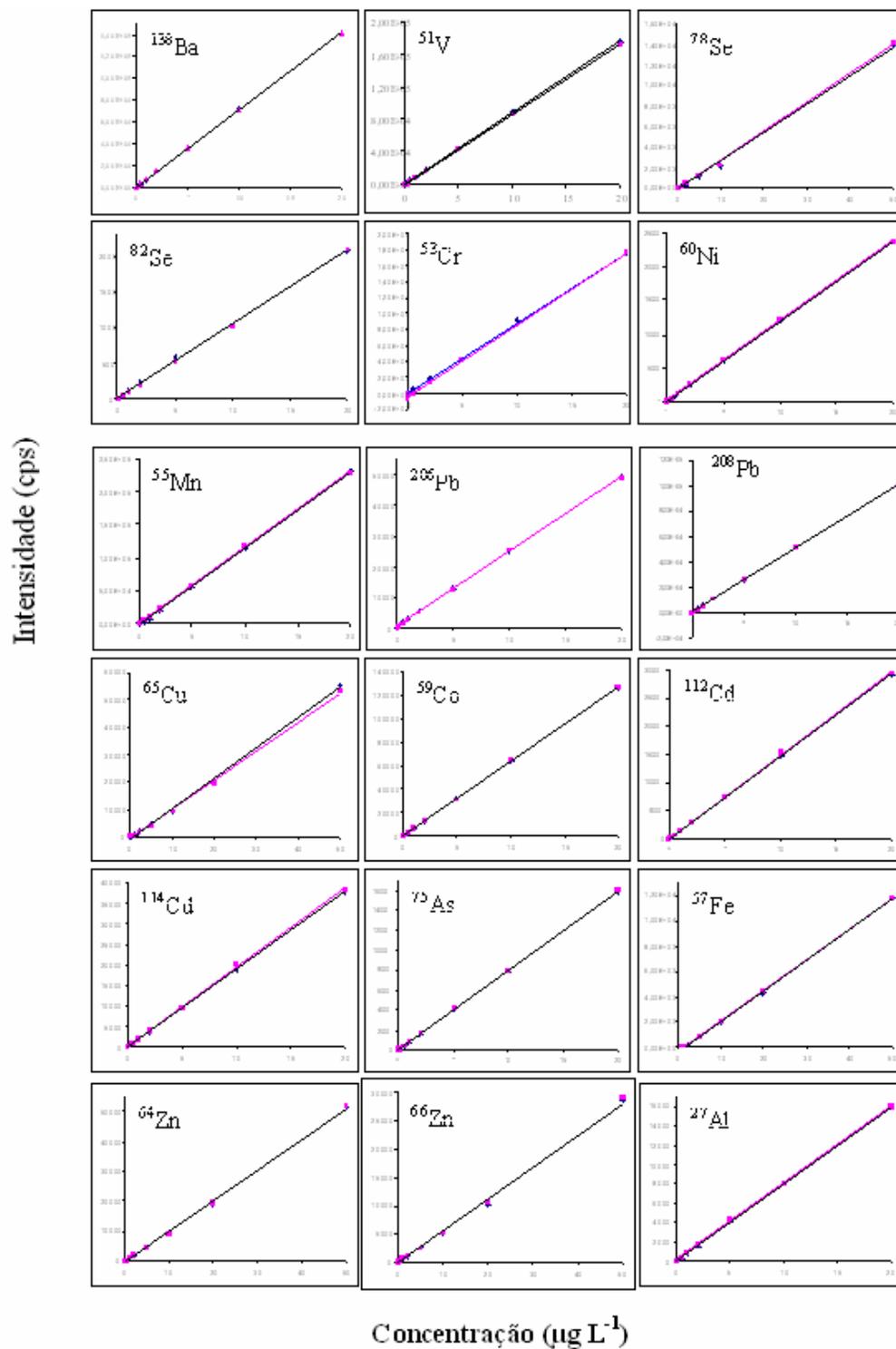


Figura 4.5. Curvas de calibração dos analitos em água e em leite materno digerido determinados por ICP-MS, demonstrando a linearidade na faixa estudada.

4.3.5.2 – Calibração a partir do MMQO e do MMQPA

Para construção da calibração, a partir do MMQO ou do MMQPA, partimos da multiplicação de várias matrizes de dados (Hamilton, 1964). Este procedimento nos oferece várias vantagens como: os parâmetros da reta de calibração e suas incertezas, os resíduos para avaliar a qualidade do ajuste, as incertezas em x e y , construção das curvas de limite de confiança e de previsão do ajuste e várias outras vantagens.

Primeiramente, para construção da calibração a partir de ambos os métodos de regressão linear, necessitamos:

- da matriz Jacobiano ou matriz de planejamento J (eq. 3.2), que é dependente dos valores de x_i ;
- da matriz Y (eq. 3.1), que corresponde à média das respostas instrumentais;
- da matriz $s_{\bar{y}}$, que corresponde ao desvio padrão da média;
- da matriz V_y (eq. 3.3), que corresponde à matriz das variâncias e covariâncias das respostas instrumentais;
- e, a partir da matriz J e da matriz V_y , obtemos suas matrizes transposta e inversa.

O problema, neste caso, é encontrar o melhor estimador \hat{P} para os parâmetros P , da reta de calibração. Assim, para ajustarmos a calibração pelo MMQO, devemos apenas multiplicar as matrizes B^{-1} (que consiste na matriz das equações normais inversa, que é obtida através da multiplicação das matrizes J e J') pelas matrizes J' e Y :

$$P = B^{-1}J'Y \quad (4.2)$$

Mas, para ajustarmos a calibração pelo MMQPA, devemos apenas adicionar a matriz de variâncias e covariâncias das respostas instrumentais inversa (V_y^{-1}), na mesma multiplicação de matrizes, para o ajuste pelo MMQO, que, neste caso, irá ponderar os valores pelo comportamento heterocedástico das variâncias das respostas instrumentais:

$$P = B^{-1}J'YV_y^{-1} \quad (4.3)$$

Com a matriz de covariâncias dos parâmetros ajustados, V_p , (eq. 3.21) obtemos as incertezas $s_{(a)}$ e $s_{(b)}$, para os parâmetros ajustados. Neste trabalho, foi realizada a comparação somente entre os métodos MMQO e MMQPA, por conhecermos as variâncias dos dados e seus comportamentos (se possuem variâncias iguais ou diferentes). Assim, não houve a necessidade de compararmos também o MMQPR.

4.3.5.3 – Comparação entre o MMQO e o MMQPA

Primeiramente, antes de realizar a calibração, foi avaliado qual o método de regressão linear (MMQO ou MMQPA) iríamos utilizar. Sabe-se que, a utilização inadequada de um método, para realizar uma regressão linear, contribui com um erro sistemático no processo de medição (ver item 3.1). Para isto, verificamos se a variância da resposta instrumental, de todos os analitos estudados, apresentava um comportamento homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes).

Os isótopos ^{27}Al , ^{65}Cu , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As apresentaram variâncias diferentes, sendo assim, deveriam ser calibrados a partir do MMQPA. Os outros isótopos ^{78}Se , ^{53}Cr , ^{60}Ni , ^{55}Mn , ^{64}Zn , ^{66}Zn e ^{57}Fe , apresentaram variâncias iguais e, sendo assim, deveriam ser calibrados a partir do MMQO. Mas, antes de aplicar esses métodos, avaliamos se eles são estatisticamente iguais ou diferentes, na calibração do mesmo analito, visando que, o MMQPA é um método mais laborioso que o MMQO. A figura 4.6 apresenta o comportamento dos dados para o elemento ^{138}Ba . Esta figura mostra claramente que as variâncias aumentam com a concentração, indicando que elas apresentam um comportamento heterocedástico.

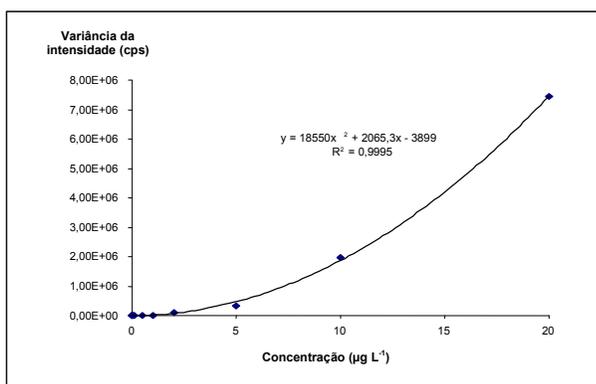


Figura 4.6. Comportamento heterocedástico dos dados, para o elemento ^{138}Ba .

A figura 4.7 apresenta o comportamento homocedástico dos dados para o elemento ^{57}Fe . Podemos observar que os dados para o elemento ^{57}Fe apresentam variâncias aleatórias, não indicando nenhum comportamento crescente ou diminutivo das variâncias.

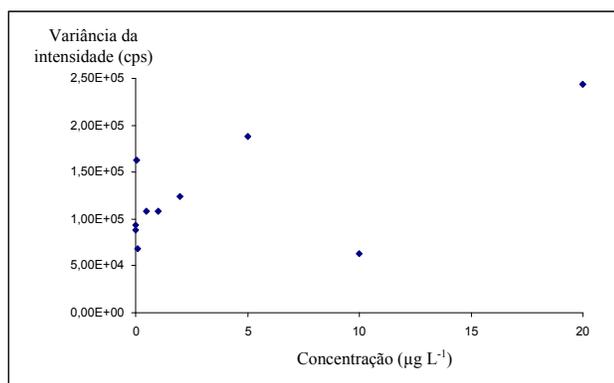


Figura 4.7. Comportamento homocedástico dos dados, para o elemento ^{57}Fe .

Para avaliar se o MMQO e o MMQPA são métodos estatisticamente iguais ou diferentes, aplicamos o teste t pareado de *Student*, para comparar os coeficientes angulares das duas curvas aquosas construídas, uma utilizando o MMQO e a outra utilizando o MMQPA, para todos os elementos estudados. A tabela 4.5 apresenta as equações das regressões lineares realizadas a partir do MMQO e do MMQPA, com o respectivo t_c de *Student*. O valor de $t_{95\%, 2}$, corresponde a 4,303, assim, na tabela 4.5 podemos observar que somente para os isótopos ^{138}Ba e ^{78}Se os métodos foram estatisticamente diferentes, sendo assim, para o ^{138}Ba , a calibração deve ser realizada utilizando o MMQPA e para o ^{78}Se , a calibração deve ser realizada utilizando o MMQO. Como para os demais elementos, os métodos empregados não foram estatisticamente diferentes, a escolha de realizar a calibração utilizando o MMQO ou o MMQPA, para estes analitos, não afetará significativamente seus resultados finais, na amostra de interesse. Com isso, preferimos utilizar o MMQO para realizar a calibração, para os demais analitos, visto que, é um método mais simples e que pode ser realizado por vários programas disponíveis no mercado, inclusive com o próprio programa do equipamento.

Tabela 4.5. Comparação entre os métodos MMQO e MMQPA, para análises feitas utilizando ICP-MS.

Analito	Equação ajustada pelo MMQO	Equação ajustada pelo MMQPA	t_c de Student
¹³⁸ Ba	$y = 7066,1 (\pm 22,9)x + 762,0 (\pm 167,1)$	$y = 7293,6 (\pm 56,5)x + 461,2 (\pm 8,9)$	6,460
⁵¹ V	$y = 8794,2 (\pm 206,0)x + 4140,9 (\pm 301,8)$	$y = 8683,4 (\pm 38,1)x + 4911,5 (\pm 277,9)$	0,916
⁷⁸ Se	$y = 279,1 (\pm 4,4)x - 207,8 (\pm 3,4)$	$y = 302,5 (\pm 6,3)x - 230,6 (\pm 5,8)$	7,218
⁸² Se	$y = 102,4 (\pm 1,7)x + 9,2 (\pm 1,8)$	$y = 104,1 (\pm 0,5)x + 7,5 (\pm 3,7)$	1,590
⁵³ Cr	$y = 893,9 (\pm 6,4)x - 353,8 (\pm 2,2)$	$y = 890,6 (\pm 5,6)x - 461,8 (\pm 4,4)$	0,655
⁶⁰ Ni	$y = 1184,4 (\pm 102,1)x + 44,7 (\pm 1,4)$	$y = 1201,6 (\pm 8,5)x + 66,4 (\pm 2,2)$	0,291
⁵⁵ Mn	$y = 11645,0 (\pm 19,3)x - 3258,4 (\pm 141,2)$	$y = 11677,0 (\pm 23,1)x - 3344,8 (\pm 122,4)$	1,836
²⁰⁶ Pb	$y = 2544,5 (\pm 7,3)x + 730,4 (\pm 53,3)$	$y = 2483,7 (\pm 26,2)x + 816,0 (\pm 2,2)$	3,866
²⁰⁸ Pb	$y = 5163,9 (\pm 29,9)x + 1517,5 (\pm 4,0)$	$y = 5084,1 (\pm 19,7)x + 1797,7 (\pm 143,6)$	3,857
⁶⁵ Cu	$y = 1085,9 (\pm 10,1)x - 471,5 (\pm 3,3)$	$y = 1096,4 (\pm 15,2)x - 511,2 (\pm 2,5)$	0,993
⁵⁹ Co	$y = 6266,5 (\pm 24,1)x + 178,2 (\pm 1,8)$	$y = 6334,8 (\pm 18,1)x + 269,5 (\pm 1,8)$	3,917
¹¹² Cd	$y = 1474,8 (\pm 26,5)x + 75,0 (\pm 8,6)$	$y = 1454,5 (\pm 4,3)x + 114,7 (\pm 31,8)$	1,311
¹¹⁴ Cd	$y = 1905,0 (\pm 35,8)x + 93,6 (\pm 12,4)$	$y = 1891,1 (\pm 4,5)x + 128,3 (\pm 32,9)$	0,668
⁷⁵ As	$y = 802,6 (\pm 14,5)x + 63,5 (\pm 3,4)$	$y = 795,1 (\pm 2,1)x + 86,7 (\pm 15,5)$	0,888
⁵⁷ Fe	$y = 239,8 (\pm 4,6)x - 472,2 (\pm 5,6)$	$y = 242,1 (\pm 10,0)x - 503,1 (\pm 8,4)$	0,363
⁶⁴ Zn	$y = 1075,4 (\pm 11,9)x - 589,0 (\pm 84,3)$	$y = 1103,9 (\pm 30,3)x - 682,1 (\pm 42,3)$	1,514
⁶⁶ Zn	$y = 613,4 (\pm 14,5)x - 325,9 (\pm 8,3)$	$y = 633,6 (\pm 20,4)x - 473,1 (\pm 11,2)$	1,393
²⁷ Al	$y = 7184,7 (\pm 264,9)x - 7870,8 (\pm 275,8)$	$y = 7090,3 (\pm 126,4)x - 7563,4 (\pm 321,4)$	0,557

$t_{95\%, 2} = 4,303$

4.3.5.4 – Avaliação da qualidade do ajuste do MMQ

Para avaliar a qualidade dos ajustes feitos pelo Método dos Mínimos Quadrados, escolhidos no item 4.3.5.3, para realizar a calibração dos elementos estudados, utilizamos os resíduos padronizados, que consistem no resíduo dividido pela incerteza em cada ponto da curva de calibração e o valor do chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2). Para um bom ajuste, os resíduos padronizados devem ter valores, em módulo, em torno de 1 (ver item 3.1.2). Para todos os analitos estudados, os resíduos padronizados ficaram em torno de 1. Assim, podemos concluir que, as matrizes V_y de todos os analitos estudados, estão bem estimadas e os métodos de calibração utilizados também são adequados. As figuras 4.8 e 4.9 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e a tabela 4.6 apresenta as equações utilizadas na calibração do método analítico e os valores de χ_{red}^2 , para todos os analitos, analisados por ICP-MS.

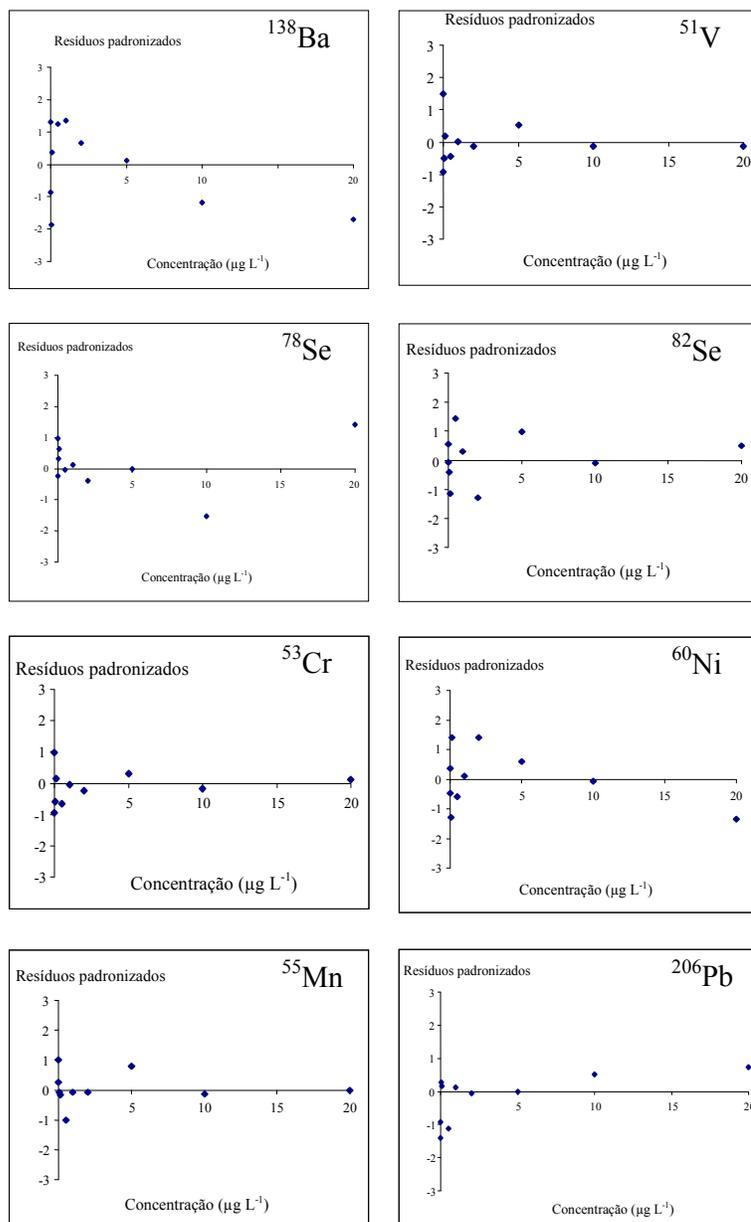


Figura 4.8. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP-MS.

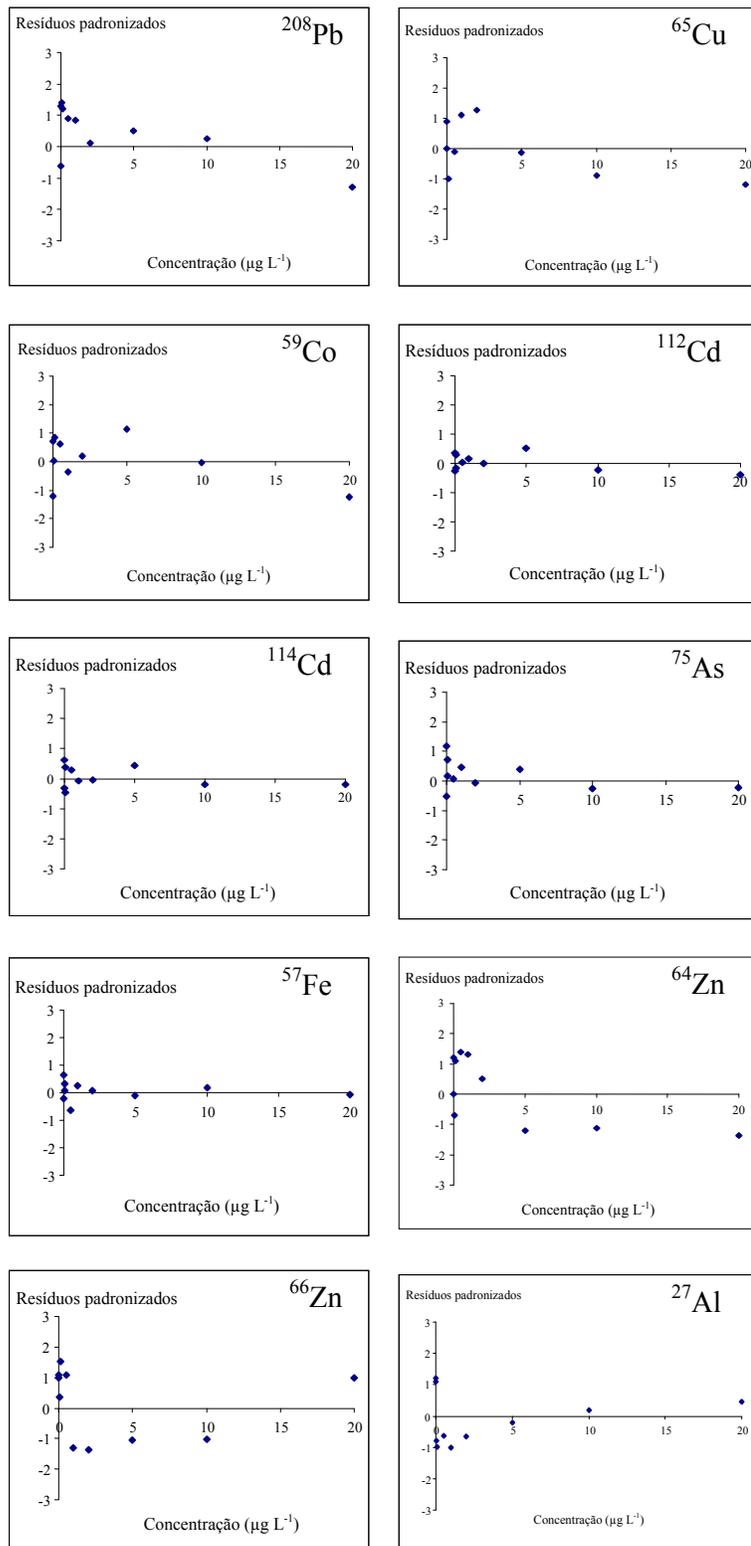


Figura 4.9. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP-MS, continuação.

Tabela 4.6. Valores de χ_{red}^2 para os elementos analisados por ICP-MS.

Analito	Equação da reta de calibração utilizada	Ajuste utilizado	χ_{red}^2
^{138}Ba	$y = 7293,6 (\pm 56,5) x + 461,2 (\pm 8,9)$	MMQPA	1,79
^{51}V	$y = 8794,2 (\pm 206,0) x + 4140,9 (\pm 301,8)$	MMQO	0,22
^{78}Se	$y = 279,1 (\pm 4,4) x - 207,8 (\pm 3,4)$	MMQO	0,75
^{82}Se	$y = 102,4 (\pm 1,7) x + 9,2 (\pm 1,8)$	MMQO	0,86
^{53}Cr	$y = 893,9 (\pm 6,4) x - 353,8 (\pm 2,2)$	MMQO	0,36
^{60}Ni	$y = 1184,4 (\pm 102,1) x + 44,7 (\pm 1,4)$	MMQO	1,67
^{55}Mn	$y = 11645,0 (\pm 19,3) x - 3258,4 (\pm 141,2)$	MMQO	0,36
^{206}Pb	$y = 2544,5 (\pm 7,3) x + 730,4 (\pm 53,3)$	MMQO	0,81
^{208}Pb	$y = 5163,9 (\pm 29,9) x + 1517,5 (\pm 4,0)$	MMQO	2,18
^{65}Cu	$y = 1085,9 (\pm 10,1) x - 471,5 (\pm 3,3)$	MMQO	2,04
^{59}Co	$y = 6266,5 (\pm 24,1) x + 178,2 (\pm 1,8)$	MMQO	1,08
^{112}Cd	$y = 1474,8 (\pm 26,5) x + 75,0 (\pm 8,6)$	MMQO	0,97
^{114}Cd	$y = 1905,0 (\pm 35,8) x + 93,6 (\pm 12,4)$	MMQO	0,15
^{75}As	$y = 802,6 (\pm 14,5) x + 63,5 (\pm 3,4)$	MMQO	0,34
^{57}Fe	$y = 239,8 (\pm 4,6) x - 472,2 (\pm 5,6)$	MMQO	0,13
^{64}Zn	$y = 1075,4 (\pm 11,9) x - 589,0 (\pm 84,3)$	MMQO	2,04
^{66}Zn	$y = 613,4 (\pm 14,5) x - 325,9 (\pm 8,3)$	MMQO	2,24
^{27}Al	$y = 7184,7 (\pm 264,9) x - 7870,8 (\pm 275,8)$	MMQO	1,51

O χ_{red}^2 , a um nível de confiança de 95%, possui $\chi_{8,95\%}^2 = 2,73$, com isso, como podemos observar na tabela 4.6, os valores obtidos de χ_{red}^2 para os isótopos estudados, estão abaixo do valor tabelado de 2,73, onde podemos concluir que, as matrizes V_y de todos os analitos estudados, estão bem estimadas e os métodos de calibração utilizados também são adequados.

4.3.5.5 - Limites de Confiança e Limites de Previsão do Ajuste

Neste trabalho, utilizamos as curvas do limite de confiança do ajuste, juntamente com a reta de calibração, para termos uma melhor estimativa de possíveis valores espúrios (*outlier*), ou seja, medidas que não pertencem a mesma população, utilizados para construir a reta de calibração. Também utilizamos, no mesmo gráfico, as curvas do limite de previsão do ajuste, para obtermos a região em que podemos encontrar valores dos analitos, analisados em amostras reais.

A figura 4.10 apresenta as curvas: de calibração, do limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{138}Ba , que obteve sua calibração, realizada a partir do MMQPA, por razões vistas anteriormente. Nestas curvas é possível observar que os pontos de maior precisão estão abaixo do centróide e em torno do baricentro. Isso nos ajuda a identificar as regiões em que possuem dados com maior precisão, quando necessitamos preparar soluções envolvendo adições de analitos ou na preparação de soluções de materiais de referência para certificação de um método, que devem levar em consideração essa região.

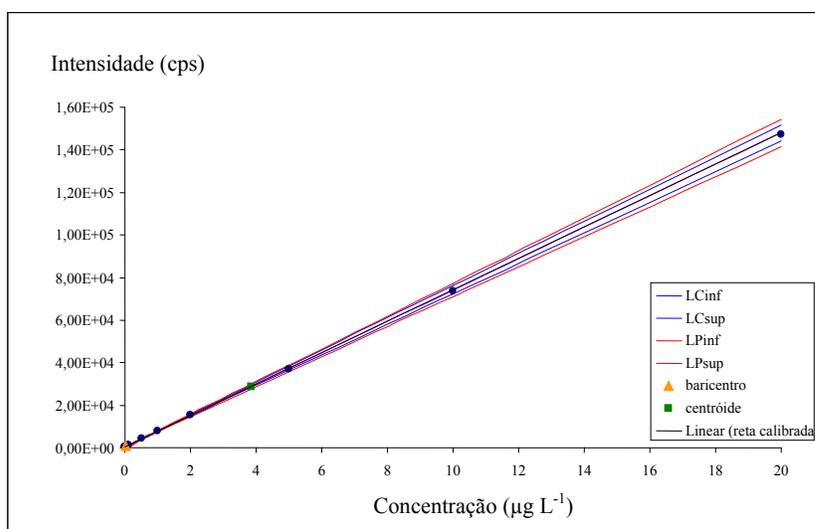


Figura 4.10. Curvas: de calibração, do limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{138}Ba , calibrado através do MMQPA e analisado por ICP-MS.

No caso de elementos que tiveram a calibração realizada a partir do MMQO, como podemos observar na figura 4.11, que apresenta as curvas de calibração, de limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{65}Cu , os pontos de maior precisão estão em torno do centróide. Esta região também deve ser considerada na preparação de soluções

envolvendo adições de analitos ou na preparação de soluções de materiais de referência para certificação de um método, para os elementos assim calibrados.

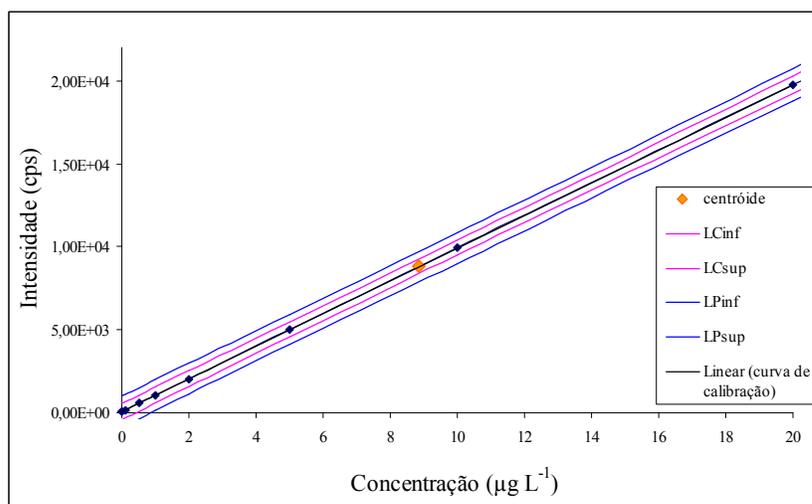


Figura 4.11. Curvas de calibração, de limite de confiança e do limite de previsão do ajuste, para o analito ^{65}Cu , calibrado através do MMQO e analisado por ICP-MS.

4.3.5.6 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação

Os LD e LQ foram determinados através de uma curva aquosa, utilizando as equações de calibração demonstradas na tabela 4.6, para os respectivos elementos estudados neste trabalho. Para a determinação dos LD e LQ, 10 amostras independentes de branco foram medidas 10 vezes e 10 amostras independentes fortificadas na mais baixa concentração ($0,01 \mu\text{g L}^{-1}$), utilizada na curva de calibração, foram medidas também 10 vezes. Os desvios padrão do branco e das amostras fortificadas foram utilizados na obtenção destas figuras de mérito. As medidas foram realizadas empregando as condições robustas de operação.

Como descrito no item 3.1.5, existem várias metodologias na literatura para determinação dos limites de detecção e de quantificação, mas não existe nenhum consenso e nenhuma padronização em qual metodologia utilizar. Nesse sentido, avaliamos as várias metodologias, para decidir qual a melhor para ser utilizada neste trabalho. A tabela 4.7 apresenta os métodos utilizados para a determinação dos LD e LQ, que estão descritos nas tabelas 4.8, 4.9 e 4.10, para todos os analitos.

Tabela 4.7. Métodos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação.

Método	LD		LQ	
	Equação	Comentários	Equação	Comentários
A*	$\bar{x}_b + 3s_b$	\bar{x}_b é a média de 10 amostras independentes de branco, com seu respectivo desvio padrão s_b (Ver item 3.1.5)	$\bar{x}_b + 10s_b$	\bar{x}_b é a média de 10 amostras independentes de branco, com seu respectivo desvio padrão s_b (Ver item 3.1.5)
B*	$3s_b$	desvio padrão, s_b , de 10 amostras independentes de branco (Ver item 3.1.5)	$10s_b$	desvio padrão, s_b , de 10 amostras independentes de branco (Ver item 3.1.5)
C**	$\bar{x}_b + 4,65s_b$	\bar{x}_b é a média de 10 amostras independentes de branco, com seu respectivo desvio padrão s_b (Ver item 3.1.5)	$\bar{x}_b + 6s_b$	\bar{x}_b é a média de 10 amostras independentes de branco, com seu respectivo desvio padrão s_b (Ver item 3.1.5)
D**	$\bar{x}_b + 3s_b$	Neste caso, \bar{x}_b é a média de 10 amostras de branco fortificadas na mais baixa concentração, utilizada na curva de calibração, com seu respectivo desvio padrão s_b	$\bar{x}_b + 10s_b$	Neste caso, \bar{x}_b é a média de 10 amostras de branco fortificadas na mais baixa concentração, com seu respectivo desvio padrão s_b
E**	$3s_b$	desvio padrão, s_b , de 10 amostras independentes de branco fortificadas na mais baixa concentração, utilizada na curva de calibração	$10s_b$	desvio padrão, s_b , de 10 amostras independentes de branco fortificadas na mais baixa concentração, utilizada na curva de calibração
F***	Eq. 3.52 (MMQPA) Eq. 3.51 (MMQO)	Ver itens 3.1.3 e 3.1.6	Eq. 3.52 (MMQPA) Eq. 3.51 (MMQO)	Ver itens 3.1.3 e 3.1.6

* (EURACHEM, 1998; IUPAC, 1985)

** (EURACHEM, 1998)

*** (Meier *et al.*, 2000)

Tabela 4.8. Limites de detecção, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno.

Analito	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F
^{138}Ba	0,004	0,003	0,006	0,022	0,010	0,007
^{51}V	0,163	0,114	0,226	0,084	0,005	0,441
^{78}Se	0,662	0,487	0,928	0,386	0,121	1,583
^{82}Se	0,062	0,047	0,088	0,047	0,026	0,302
^{53}Cr	0,134	0,087	0,182	0,283	0,027	0,314
^{60}Ni	0,054	0,039	0,075	0,072	0,041	0,145
^{55}Mn	0,009	0,005	0,012	0,009	0,006	0,072
^{206}Pb	0,009	0,006	0,012	0,036	0,027	0,042
^{208}Pb	0,002	0,001	0,003	0,075	0,047	0,022
^{65}Cu	0,726	0,058	0,758	0,696	0,017	0,123
^{59}Co	0,019	0,009	0,024	0,034	0,008	0,011
^{112}Cd	0,017	0,012	0,023	0,038	0,029	0,087
^{114}Cd	0,015	0,010	0,021	0,022	0,013	0,084
^{75}As	0,037	0,021	0,049	0,060	0,034	0,102
^{57}Fe	1,153	0,829	1,609	0,663	0,215	1,092
^{64}Zn	1,415	0,105	1,473	1,353	0,030	0,562
^{66}Zn	1,331	0,121	1,398	1,281	0,050	0,675
^{27}Al	0,629	0,041	0,651	0,788	0,048	1,950

Tabela 4.9. Limites de quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno.

Analito	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F
^{138}Ba	0,011	0,009	0,007	0,044	0,032	0,014
^{51}V	0,430	0,381	0,277	0,095	0,015	0,880
^{78}Se	1,789	1,610	1,145	0,667	0,402	5,031
^{82}Se	0,173	0,158	0,110	0,107	0,085	0,612
^{53}Cr	0,338	0,291	0,222	0,346	0,090	1,752
^{60}Ni	0,145	0,131	0,093	0,166	0,135	0,252
^{55}Mn	0,022	0,018	0,014	0,023	0,020	0,661
^{206}Pb	0,022	0,019	0,014	0,099	0,090	0,074

Tabela 4.10. Limites de quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para os analitos determinados por ICP-MS, em leite materno, continuação.

Analito	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F
^{208}Pb	0,004	0,003	0,003	0,184	0,155	0,044
^{65}Cu	0,862	0,194	0,784	0,736	0,057	0,253
^{59}Co	0,041	0,031	0,029	0,052	0,026	0,022
^{112}Cd	0,044	0,039	0,029	0,104	0,095	0,155
^{114}Cd	0,040	0,034	0,026	0,051	0,042	0,164
^{75}As	0,087	0,071	0,059	0,139	0,112	0,201
^{57}Fe	3,088	2,765	1,982	1,164	0,716	2,125
^{64}Zn	1,661	0,351	1,521	1,423	0,100	1,112
^{66}Zn	1,614	0,404	1,452	1,396	0,165	1,243
^{27}Al	0,724	0,136	0,670	0,900	0,160	3,914

Como podemos observar, os métodos A, B e C utilizam dados somente referentes ao branco, quer dizer, não consideram o comportamento do analito juntamente com seus interferentes, toda a calibração que tem forte influência na precisão do mensurando (a concentração da amostra), se houver a heterocedasticidade da resposta instrumental em função da concentração do analito, e sem contar que, esses métodos protegem o resultado contra o Erro do Tipo I, falso positivo (concluir que o analito está presente quando não está), mas também não evita o Erro do Tipo II, falso negativo (concluir que o analito não está presente quando, na verdade, ele está).

Os métodos D, E e F já consideram o comportamento do analito juntamente com seus interferentes, todo o esquema de calibração e, se houver, a heterocedasticidade da resposta instrumental em função da concentração do analito, que está incorporada na equação que foi ajustada, para fazer a calibração dos analitos de interesse. Observando os valores de LD e LQ, apresentados nas tabelas 4.8, 4.9 e 4.10, descartamos o método F por apresentar valores mais conservadores que os demais. Assim, escolhemos o método E para determinar o LD e o LQ de cada analito, por razões de consistência lógica, por levar em consideração o comportamento do analito junto com seus interferentes, e por apresentar valores mais próximos da menor concentração utilizada, com a exceção de poucos analitos como ^{78}Se e ^{57}Fe . A tabela 4.11 apresenta a relação do coeficiente de correlação, a equação de calibração para os isótopos analisados por ICP-MS ($n = 3$) e limites de detecção e de quantificação determinados pelo método E.

Tabela 4.11. Relação do coeficiente de correlação e equação de calibração dos isótopos analisados por ICP-MS (n = 3) com seus respectivos limites de detecção e de quantificação, determinados pelo método E.

Analito	Coeficiente de correlação	Equação de calibração	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
^{138}Ba	0,9999	$y = 7293,6 (\pm 56,5) x + 461,2 (\pm 8,9)$	0,010	0,032
^{51}V	0,9997	$y = 8794,2 (\pm 206,0) x + 4140,9 (\pm 301,8)$	0,005	0,015
^{78}Se	0,9995	$y = 279,1 (\pm 4,4) x - 207,8 (\pm 3,4)$	0,121	0,402
^{82}Se	0,9998	$y = 102,4 (\pm 1,7) x + 9,2 (\pm 1,8)$	0,026	0,085
^{53}Cr	0,9992	$y = 893,9 (\pm 6,4) x - 353,8 (\pm 2,2)$	0,027	0,090
^{60}Ni	0,9999	$y = 1184,4 (\pm 102,1) x + 44,7 (\pm 1,4)$	0,041	0,135
^{55}Mn	0,9997	$y = 11645,0 (\pm 19,3) x - 3258,4 (\pm 141,2)$	0,006	0,020
^{206}Pb	0,9997	$y = 2544,5 (\pm 7,3) x + 730,4 (\pm 53,3)$	0,027	0,090
^{208}Pb	0,9997	$y = 5163,9 (\pm 29,9) x + 1517,5 (\pm 4,0)$	0,047	0,155
^{65}Cu	0,9957	$y = 1085,9 (\pm 10,1) x - 471,5 (\pm 3,3)$	0,017	0,057
^{59}Co	0,9999	$y = 6266,5 (\pm 24,1) x + 178,2 (\pm 1,8)$	0,008	0,026
^{112}Cd	0,9999	$y = 1474,8 (\pm 26,5) x + 75,0 (\pm 8,6)$	0,029	0,095
^{114}Cd	1,0000	$y = 1905,0 (\pm 35,8) x + 93,6 (\pm 12,4)$	0,013	0,042
^{75}As	0,9999	$y = 802,6 (\pm 14,5) x + 63,5 (\pm 3,4)$	0,034	0,112
^{57}Fe	0,9984	$y = 239,8 (\pm 4,6) x - 472,2 (\pm 5,6)$	0,215	0,716
^{64}Zn	0,9954	$y = 1075,4 (\pm 11,9) x - 589,0 (\pm 84,3)$	0,030	0,100
^{66}Zn	0,9950	$y = 613,4 (\pm 14,5) x - 325,9 (\pm 8,3)$	0,050	0,165
^{27}Al	0,9984	$y = 7184,7 (\pm 264,9) x - 7870,8 (\pm 275,8)$	0,048	0,160

4.3.5.7 – Precisão e exatidão

A tabela 4.12 apresenta os parâmetros analíticos do método para a quantificação dos analitos por ICP-MS, em leite materno, em termos do LQ, precisão e exatidão. Para o estudo da exatidão do método, foram preparadas soluções com concentrações diferentes e independentes do material de referência certificado NIST SRM 1846 Infant Formula, para o estudo dos isótopos analisados. O poder de detecção resultante esteve em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a precisão, expressa como desvio padrão relativo (R.S.D), foi melhor ou igual a 3,4%. Para checar a exatidão do método, estudos envolvendo adição e recuperação de analito também foram utilizados. Adequadas quantidades dos elementos foram adicionadas ao leite antes da digestão da amostra. As recuperações obtidas foram na faixa de 80,8 - 110,9%, que estão listadas na tabela 4.13.

O elemento Fe não foi possível recuperar no nível de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, por ser esta uma concentração muito baixa para esse metal, tendo em vista a sua grande quantidade presente no

leite materno e o elemento Ni não foi possível recuperar no nível de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, por ter, possivelmente, ocorrido interferências poliatômicas dos compostos $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$ ou $^{36}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$. Os isótopos dos analitos eventualmente utilizados nas medidas finais foram: ^{27}Al , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{112}Cd , ^{114}Cd , ^{206}Pb , ^{208}Pb , ^{138}Ba , ^{51}V , ^{59}Co e ^{75}As , porque eles são os isótopos mais abundantes, que não sofreram interferências e por terem fornecido melhores resultados.

Em termos gerais, as recuperações obtidas e, os valores encontrados comparados com os valores recomendados, no material de referência certificado, apresentaram concordância entre si, para um nível de confiança de 95%. Assim, podemos concluir que o método proposto é adequado para quantificação dos elementos analisados por ICP-MS, presentes em leite materno.

Tabela 4.12. Parâmetros analíticos do método, para a quantificação dos analitos por ICP-MS, em leite materno ($t_{95\%, 2} = 4,303$).

Analito	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetitividade ^a R.S.D. (%)	Exatidão ^b			<i>t</i> de Student
			Certificado ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inexatidão (%)	
^{138}Ba	0,032	1,4	nc ^d	-	-	-
^{51}V	0,015	1,0	nc	-	-	-
^{78}Se	0,402	2,1	$0,162 \pm 0,001$	$0,159 \pm 0,012$	98,5	0,364
^{82}Se	0,085	1,4	$0,162 \pm 0,001$	$0,171 \pm 0,011$	105,4	1,373
^{53}Cr	0,090	1,6	nc	-	-	-
^{60}Ni	0,135	2,5	nc	-	-	-
^{55}Mn	0,020	1,7	$0,811 \pm 0,006$	$0,918 \pm 0,115$	113,2	1,604
^{206}Pb	0,090	1,7	nc	-	-	-
^{208}Pb	0,155	1,5	nc	-	-	-
^{65}Cu	0,057	2,1	$10,2 \pm 0,1$	$9,34 \pm 1,28$	91,3	1,287
^{59}Co	0,026	0,7	nc	-	-	-
^{112}Cd	0,095	1,6	nc	-	-	-
^{114}Cd	0,042	1,4	nc	-	-	-
^{75}As	0,112	0,8	nc	-	-	-
^{57}Fe	0,716	2,9	$127,9 \pm 0,9$	$126,8 \pm 3,2$	99,1	0,614
^{64}Zn	0,100	3,1	$122,1 \pm 1,1$	$120,7 \pm 3,4$	98,8	0,223
^{66}Zn	0,165	2,6	$122,1 \pm 1,1$	$123,9 \pm 2,1$	101,4	1,243
^{27}Al	0,160	3,4	nc	-	-	-

^aCalculado sobre 10 amostras independentes, lidas em triplicatas aleatórias para as seguintes concentrações: $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ba, V, Se, Cr, Ni, Mn, Pb, Cu, Co, Cd, As e Al; $15,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para Fe e Zn.

^bRealizado utilizando o material certificado NIST SRM 1846 Infant Formula.

^cMédia \pm S.D.

^dnc: não certificado.

Tabela 4.13. Recuperação (%) dos elementos em amostras de leite materno digerido (n = 3), analisadas por ICP-MS.

Analito	Recuperação (%)		
	1,0 µg L ⁻¹	5,0 µg L ⁻¹	15,0 µg L ⁻¹
¹³⁸ Ba	95,9 ± 7,1	95,1 ± 1,3	98,5 ± 3,0
⁵¹ V	85,2 ± 4,2	90,8 ± 0,7	95,4 ± 0,9
⁷⁸ Se	110,9 ± 5,2	102,5 ± 7,7	100,0 ± 1,2
⁸² Se	104,0 ± 9,0	98,8 ± 0,7	101,1 ± 0,7
⁵³ Cr	102,0 ± 2,2	99,2 ± 1,2	94,1 ± 2,3
⁶⁰ Ni	<u>39,5 ± 1,2</u>	82,7 ± 0,1	82,6 ± 0,2
⁵⁵ Mn	105,8 ± 1,1	92,4 ± 0,9	91,6 ± 0,7
²⁰⁶ Pb	81,8 ± 1,1	99,9 ± 1,7	101,3 ± 0,6
²⁰⁸ Pb	83,4 ± 0,8	98,9 ± 1,2	101,6 ± 1,7
⁶⁵ Cu	101,4 ± 15,1	99,2 ± 2,3	98,2 ± 1,2
⁵⁹ Co	85,5 ± 0,3	80,8 ± 0,3	82,2 ± 1,3
¹¹² Cd	109,0 ± 1,2	100,7 ± 1,5	100,9 ± 2,5
¹¹⁴ Cd	107,5 ± 1,1	100,5 ± 1,0	99,3 ± 2,1
⁷⁵ As	102,6 ± 6,8	102,3 ± 0,8	101,2 ± 0,8
⁵⁷ Fe	<u>62,7 ± 1,1</u>	93,2 ± 4,2	100,4 ± 2,6
⁶⁴ Zn	98,1 ± 14,3	100,0 ± 1,6	98,3 ± 3,2
⁶⁶ Zn	100,2 ± 5,7	101,2 ± 2,8	100,3 ± 1,9
²⁷ Al	103,7 ± 7,7	98,6 ± 1,6	88,8 ± 2,9

4.3.5.8 – Quantificação de amostras reais

As tabelas 4.15 e 4.16 apresentam os valores das concentrações dos analitos estudados, presentes em 14 amostras de leite materno colostro e as tabelas 4.17 e 4.18 os valores das concentrações dos analitos presentes em 20 amostras de leite materno maduro. As faixas das concentrações obtidas são comparáveis com os valores encontrados na literatura, especialmente para aqueles vindos de estudos colaborativos da Organização Mundial de Saúde - WHO IAEA (WHO, 1989), para o conteúdo de traços de elementos em leite materno no mundo todo. Em termos gerais, os teores encontrados nas amostras não são preocupantes em

relação à toxicidade para os elementos considerados potencialmente tóxicos. A alta concentração obtida para Fe em relação à literatura, possivelmente, é devido ao fato de que as amostras analisadas são de uma região em que há exploração de minério de Fe. Em relação ao analito ^{51}V , não foi encontrado na literatura valores que apontam a presença desse metal em leite materno. Em relação às amostras de mães fumantes que, neste caso, correspondem às amostras nomeadas como mãe 4, mãe 5 e mãe 6, os teores encontrados, dos elementos considerados potencialmente tóxicos, nestas amostras, não são preocupantes em relação à toxicidade dos mesmos, mas a amostra mãe 6, apresentou um alto nível de Al, enquanto que a concentração de Cr nessas amostras não foi detectada, houve uma alta concentração em Zn e uma baixa concentração de V em relação às demais amostras.

Tabela 4.14. Faixas dos analitos em leite materno, presentes na literatura, em $\mu\text{g L}^{-1}$ (Jensen, 1995; WHO, 1989).

Analito	Faixa na literatura	Analito	Faixa na literatura
^{138}Ba	0,9 – 47	^{65}Cu	180 - 751
^{51}V	-	^{59}Co	0,1 – 2,0
^{78}Se	5 - 23	^{112}Cd	0,7 – 4,6
^{82}Se	5 - 23	^{114}Cd	0,7 – 4,6
^{53}Cr	0,2 – 59	^{75}As	0,2 - 19
^{60}Ni	0,5 – 10	^{57}Fe	200 - 800
^{55}Mn	3 - 40	^{64}Zn	700 - 4000
^{206}Pb	2 - 200	^{66}Zn	700 - 4000
^{208}Pb	2 - 200	^{27}Al	3 - 125

Tabela 4.15. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Amostras	^{138}Ba	^{51}V	^{78}Se	^{82}Se	^{53}Cr	^{60}Ni	^{55}Mn	^{206}Pb	^{208}Pb
Mãe 1	8,02 ± 0,53	15,1 ± 0,6	85,8 ± 4,3	30,2 ± 2,0	84,1 ± 5,3	11,4 ± 0,8	8,20 ± 0,58	2,04 ± 0,23	3,46 ± 0,18
Mãe 2	8,25 ± 0,73	14,6 ± 0,4	74,1 ± 4,4	43,0 ± 3,3	78,2 ± 3,5	6,9 ± 0,6	5,11 ± 0,61	0,061 ± 0,012	5,70 ± 0,38
Mãe 3	8,23 ± 0,47	9,54 ± 0,37	58,9 ± 4,1	55,1 ± 3,8	66,0 ± 4,3	16,0 ± 0,8	6,87 ± 0,33	2,06 ± 0,17	1,53 ± 0,03
Mãe 4	9,44 ± 0,52	8,05 ± 0,45	15,0 ± 0,8	20,4 ± 1,0	nd	6,18 ± 0,50	6,22 ± 0,93	0,101 ± 0,076	nd
Mãe 5	9,71 ± 0,62	9,19 ± 0,62	9,70 ± 0,81	24,3 ± 1,2	nd	4,96 ± 0,43	5,75 ± 0,43	nd	0,15 ± 0,05
Mãe 6	9,30 ± 0,48	1,80 ± 0,18	13,2 ± 0,3	28,5 ± 1,9	nd	11,2 ± 0,3	6,99 ± 0,83	0,490 ± 0,033	nd
Mãe 7	4,64 ± 0,32	57,5 ± 4,3	12,3 ± 0,7	37,9 ± 2,3	nd	12,8 ± 0,8	38,96 ± 2,87	4,60 ± 0,55	4,64 ± 0,48
Mãe 8	16,7 ± 1,2	79,9 ± 4,8	21,3 ± 1,2	21,7 ± 1,0	80,7 ± 5,3	5,71 ± 0,42	5,38 ± 0,37	7,20 ± 0,73	7,69 ± 0,43
Mãe 9	3,96 ± 0,43	23,4 ± 2,1	9,70 ± 0,38	31,1 ± 2,3	nd	4,18 ± 0,58	1,93 ± 0,28	1,83 ± 0,32	1,45 ± 0,28
Mãe 10	51,9 ± 2,1	51,5 ± 3,8	15,0 ± 0,8	75,1 ± 6,8	nd	6,07 ± 0,69	6,74 ± 0,42	4,50 ± 0,33	4,74 ± 0,69
Mãe 11	7,28 ± 0,58	11,1 ± 0,8	14,1 ± 0,9	45,0 ± 22,3	nd	5,20 ± 0,20	9,27 ± 0,73	11,8 ± 1,0	11,9 ± 1,0
Mãe 12	13,0 ± 0,6	74,8 ± 4,3	11,4 ± 0,9	78,7 ± 3,4	38,9 ± 2,3	3,63 ± 0,24	3,27 ± 0,34	1,04 ± 0,03	0,960 ± 0,034
Mãe 13	12,7 ± 0,5	50,4 ± 2,3	7,91 ± 0,53	21,3 ± 1,2	nd	18,8 ± 0,8	24,6 ± 2,1	8,38 ± 0,43	7,25 ± 0,53
Mãe 14	12,1 ± 0,4	81,6 ± 3,4	5,22 ± 0,33	68,2 ± 3,3	85,9 ± 3,4	5,17 ± 0,43	17,1 ± 1,0	13,2 ± 1,0	13,3 ± 0,7

nd = não detectado

Tabela 4.16. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), continuação.

Amostras	^{65}Cu	^{59}Co	^{112}Cd	^{114}Cd	^{75}As	^{57}Fe	^{64}Zn	^{66}Zn	^{27}Al
Mãe 1	546 ± 13	0,246 ± 0,093	0,502 ± 0,170	0,245 ± 0,077	11,3 ± 0,2	1080 ± 21	2465 ± 23	2490 ± 21	81,5 ± 7,4
Mãe 2	468 ± 16	nd	0,261 ± 0,073	0,303 ± 0,055	4,16 ± 0,23	621 ± 12	3565 ± 26	3660 ± 21	73,0 ± 6,6
Mãe 3	508 ± 19	0,236 ± 0,012	0,168 ± 0,034	0,135 ± 0,022	3,09 ± 0,18	1593 ± 15	2673 ± 27	2750 ± 28	24,1 ± 0,9
Mãe 4	227 ± 8	0,400 ± 0,013	0,216 ± 0,044	nd	2,68 ± 0,19	825 ± 19	7350 ± 43	7843 ± 40	42,7 ± 6,7
Mãe 5	215 ± 9	0,315 ± 0,039	0,338 ± 0,032	0,297 ± 0,024	4,55 ± 0,28	950 ± 17	7326 ± 47	7601 ± 49	56,6 ± 7,0
Mãe 6	216 ± 9	0,328 ± 0,073	0,149 ± 0,073	0,153 ± 0,093	0,938 ± 0,123	846 ± 15	7373 ± 37	7666 ± 43	208 ± 13
Mãe 7	595 ± 16	0,283 ± 0,173	0,278 ± 0,053	0,316 ± 0,066	45,2 ± 7,5	1481 ± 16	2432 ± 26	2539 ± 28	179 ± 8
Mãe 8	569 ± 16	0,319 ± 0,094	0,190 ± 0,029	0,345 ± 0,031	43,0 ± 6,8	1134 ± 12	3235 ± 25	3407 ± 27	225 ± 9
Mãe 9	312 ± 11	0,271 ± 0,083	0,258 ± 0,071	0,024 ± 0,003	12,2 ± 0,7	770 ± 13	2865 ± 21	2958 ± 22	131 ± 4
Mãe 10	434 ± 12	0,280 ± 0,093	0,357 ± 0,062	0,034 ± 0,006	29,9 ± 4,3	1096 ± 11	3822 ± 33	3978 ± 31	204 ± 11
Mãe 11	83 ± 8	0,251 ± 0,031	0,343 ± 0,082	0,268 ± 0,087	6,15 ± 0,39	940 ± 12	5257 ± 47	5412 ± 42	31,2 ± 5,0
Mãe 12	184 ± 9	0,392 ± 0,273	0,193 ± 0,029	0,143 ± 0,013	41,7 ± 5,9	1283 ± 13	1344 ± 25	1406 ± 21	35,1 ± 6,3
Mãe 13	173 ± 14	0,376 ± 0,087	0,416 ± 0,133	0,700 ± 0,284	26,7 ± 3,3	960 ± 15	668 ± 12	705 ± 13	210 ± 9
Mãe 14	408 ± 18	0,546 ± 0,102	0,662 ± 0,263	0,866 ± 0,244	43,7 ± 7,3	1572 ± 21	3026 ± 26	3256 ± 25	87,8 ± 4,6

nd = não detectado

Tabela 4.17. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Amostras	^{138}Ba	^{51}V	^{78}Se	^{82}Se	^{53}Cr	^{60}Ni	^{55}Mn	^{206}Pb	^{208}Pb
Mãe 15	4,22 ± 0,49	25,0 ± 2,8	75,6 ± 3,4	61,1 ± 4,8	22,3 ± 1,2	10,1 ± 0,8	16,4 ± 0,7	2,88 ± 0,38	3,34 ± 0,13
Mãe 16	0,417 ± 0,187	15,5 ± 0,8	30,9 ± 2,6	85,2 ± 6,5	91,0 ± 5,4	2,59 ± 0,33	5,97 ± 0,58	1,41 ± 0,43	1,60 ± 0,21
Mãe 17	3,63 ± 0,47	8,45 ± 0,42	84,3 ± 6,5	55,1 ± 3,8	65,8 ± 4,6	9,30 ± 0,83	4,72 ± 0,20	0,376 ± 0,022	0,74 ± 0,18
Mãe 18	10,9 ± 0,5	22,1 ± 0,8	29,7 ± 1,8	70,7 ± 4,3	102 ± 7	6,43 ± 0,24	8,84 ± 0,50	4,78 ± 0,69	4,08 ± 0,43
Mãe 19	14,1 ± 0,5	15,5 ± 0,6	21,9 ± 0,5	40,4 ± 3,8	85,4 ± 5,6	15,3 ± 0,6	14,5 ± 0,8	8,15 ± 0,83	8,22 ± 0,50
Mãe 20	7,90 ± 0,62	1,80 ± 0,38	10,5 ± 0,8	85,2 ± 7,4	nd	21,0 ± 1,8	4,65 ± 0,29	nd	nd
Mãe 21	4,68 ± 0,38	102 ± 8	15,0 ± 0,8	24,3 ± 1,5	73,3 ± 4,6	3,24 ± 0,27	12,8 ± 0,5	11,0 ± 0,6	10,9 ± 0,2
Mãe 22	5,88 ± 0,48	24,2 ± 1,8	20,4 ± 0,5	16,8 ± 0,8	nd	5,45 ± 0,43	0,430 ± 0,223	1,70 ± 0,29	2,43 ± 0,28
Mãe 23	5,60 ± 0,46	77,7 ± 3,5	6,11 ± 0,43	1,31 ± 0,18	60,1 ± 3,8	nd	6,60 ± 0,38	6,80 ± 0,43	6,58 ± 0,83
Mãe 24	6,73 ± 0,42	59,2 ± 2,4	25,8 ± 1,5	8,84 ± 0,69	12,3 ± 0,9	61,3 ± 8,2	6,63 ± 0,24	12,2 ± 0,8	12,3 ± 0,8
Mãe 25	11,94 ± 0,86	25,9 ± 2,8	31,1 ± 4,6	21,8 ± 1,8	nd	4,33 ± 0,87	8,41 ± 0,43	2,34 ± 0,2	2,68 ± 0,33
Mãe 26	7,80 ± 0,58	61,5 ± 4,4	17,7 ± 0,4	29,3 ± 1,3	11,8 ± 0,5	7,35 ± 0,69	6,36 ± 0,83	3,83 ± 0,42	4,30 ± 0,81
Mãe 27	9,20 ± 0,79	11,7 ± 0,4	12,3 ± 0,8	66,8 ± 7,2	nd	2,51 ± 0,31	8,42 ± 0,64	3,61 ± 0,22	3,04 ± 0,29
Mãe 28	6,73 ± 0,43	78,9 ± 6,6	2,5 ± 0,1	20,1 ± 1,4	67,3 ± 5,8	18,3 ± 0,9	8,28 ± 0,43	8,54 ± 0,50	8,96 ± 0,83
Mãe 29	6,87 ± 0,39	94,2 ± 7,6	13,2 ± 0,8	21,3 ± 0,8	107 ± 7	nd	9,44 ± 0,83	4,34 ± 0,24	4,06 ± 0,20
Mãe 30	14,4 ± 0,9	67,4 ± 4,4	32,9 ± 2,4	38,9 ± 3,8	33,8 ± 2,8	12,5 ± 0,3	7,68 ± 0,43	24,6 ± 1,5	24,3 ± 1,8
Mãe 31	11,8 ± 0,7	81,4 ± 7,8	11,4 ± 0,2	16,0 ± 0,2	72,4 ± 7,2	1,95 ± 0,29	14,3 ± 0,5	13,5 ± 0,4	12,9 ± 0,8
Mãe 32	12,6 ± 0,6	85,6 ± 8,2	18,6 ± 0,6	9,19 ± 0,58	87,2 ± 6,3	8,65 ± 0,43	6,39 ± 0,45	7,43 ± 0,83	7,80 ± 0,69
Mãe 33	19,2 ± 0,8	112 ± 7	9,70 ± 0,38	6,40 ± 0,43	142 ± 8,9	9,44 ± 0,82	9,16 ± 0,69	3,17 ± 0,22	2,48 ± 0,21
Mãe 34	19,4 ± 0,9	115 ± 8	19,2 ± 0,8	17,8 ± 0,8	156 ± 7	11,0 ± 0,2	12,7 ± 0,6	8,37 ± 0,58	8,38 ± 0,42

nd = não detectado

Tabela 4.18. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), continuação.

Amostras	⁶⁵ Cu	⁵⁹ Co	¹¹² Cd	¹¹⁴ Cd	⁷⁵ As	⁵⁷ Fe	⁶⁴ Zn	⁶⁶ Zn	²⁷ Al
Mãe 15	230 ± 10	0,292 ± 0,097	0,221 ± 0,067	0,478 ± 0,116	15,2 ± 0,8	1479 ± 22	1027 ± 14	1084 ± 27	39,1 ± 3,0
Mãe 16	112 ± 9	0,234 ± 0,076	nd	0,150 ± 0,023	4,11 ± 0,11	767 ± 19	324 ± 13	317 ± 12	158 ± 7
Mãe 17	442 ± 16	0,226 ± 0,063	0,369 ± 0,033	0,276 ± 0,032	14,0 ± 0,2	1062 ± 26	2992 ± 27	3056 ± 31	44,9 ± 4,0
Mãe 18	390 ± 12	0,518 ± 0,152	0,525 ± 0,194	0,366 ± 0,094	5,44 ± 0,27	795 ± 14	4061 ± 32	4148 ± 59	34,7 ± 3,3
Mãe 19	455 ± 11	0,332 ± 0,093	0,239 ± 0,075	0,475 ± 0,153	7,12 ± 0,32	781 ± 16	4808 ± 43	4882 ± 45	89,5 ± 6,0
Mãe 20	225 ± 10	0,192 ± 0,073	0,066 ± 0,003	0,090 ± 0,007	0,731 ± 0,055	1367 ± 29	1051 ± 21	1129 ± 25	62,2 ± 6,0
Mãe 21	365 ± 16	0,331 ± 0,082	0,633 ± 0,031	0,785 ± 0,294	52,4 ± 8,5	1752 ± 21	1835 ± 22	1914 ± 27	123 ± 11
Mãe 22	289 ± 13	0,335 ± 0,092	0,076 ± 0,008	0,132 ± 0,012	12,5 ± 0,2	1096 ± 27	2235 ± 32	2346 ± 31	37,8 ± 3,4
Mãe 23	116 ± 9	0,175 ± 0,031	0,061 ± 0,009	0,129 ± 0,011	40,7 ± 8,6	637 ± 16	354 ± 14	387 ± 11	62,5 ± 7,0
Mãe 24	122 ± 8	0,323 ± 0,063	0,346 ± 0,070	0,620 ± 0,119	31,6 ± 6,0	887 ± 19	1152 ± 13	1200 ± 25	126 ± 9
Mãe 25	95,4 ± 9,4	0,748 ± 0,111	0,206 ± 0,022	0,131 ± 0,015	16,2 ± 0,9	525 ± 12	156 ± 9	160 ± 8	84,8 ± 6,4
Mãe 26	84,6 ± 8,0	0,259 ± 0,033	0,305 ± 0,053	0,195 ± 0,046	31,5 ± 3,9	856 ± 14	329 ± 11	339 ± 11	292 ± 11
Mãe 27	408 ± 11	0,958 ± 0,110	1,76 ± 0,19	1,60 ± 0,17	5,81 ± 0,32	583 ± 14	3253 ± 43	3458 ± 29	34,7 ± 2,0
Mãe 28	524 ± 14	0,562 ± 0,173	0,300 ± 0,102	0,360 ± 0,031	42,7 ± 4,0	1238 ± 19	2372 ± 32	2485 ± 26	138 ± 5
Mãe 29	286 ± 11	0,027 ± 0,006	0,065 ± 0,008	0,242 ± 0,013	43,9 ± 5,8	1065 ± 14	2151 ± 43	2265 ± 32	21,8 ± 1,0
Mãe 30	431 ± 14	0,363 ± 0,032	0,236 ± 0,113	0,594 ± 0,183	32,4 ± 4,9	1113 ± 14	4288 ± 43	4542 ± 45	180 ± 8
Mãe 31	206 ± 9	0,139 ± 0,014	0,218 ± 0,016	0,267 ± 0,022	40,5 ± 4,3	1106 ± 26	812 ± 16	868 ± 11	101 ± 6,9
Mãe 32	346 ± 12	0,107 ± 0,021	0,310 ± 0,019	0,132 ± 0,025	38,3 ± 3,2	744 ± 12	1403 ± 22	1439 ± 27	141 ± 7
Mãe 33	288 ± 13	0,381 ± 0,033	0,226 ± 0,043	0,148 ± 0,011	50,7 ± 5,0	891 ± 16	2279 ± 32	2405 ± 25	94,1 ± 6,9
Mãe 34	177 ± 12	0,248 ± 0,013	0,179 ± 0,044	0,100 ± 0,005	54,7 ± 6,3	1343 ± 21	489 ± 10	516 ± 11	161 ± 4

nd = não detectado

Capítulo 5

ICP OES

5 – ICP OES (*espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado*)

5.1 – Aspectos relacionados

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é muito empregada para a determinação de constituintes inorgânicos em materiais biológicos. Nessa técnica o plasma é dividido em regiões e as medidas de emissão são coletadas em uma região denominada zona analítica normal (NAZ, *normal analytical Zone*) como representada na Figura 5.1. Até recentemente, era utilizado com maior frequência, o modo de observação radial ou lateral, onde as medidas de emissão são coletadas pelo posicionamento lateral da tocha (Boss & Fredeen, 1999) como mostra a Figura 5.2 (A).

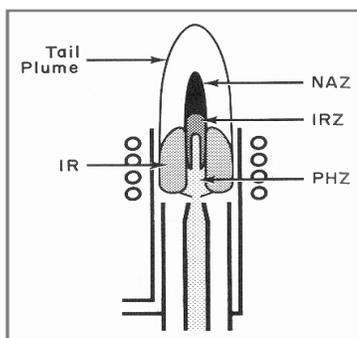


Figura 5.1- Regiões do plasma. [IR – Região de indução, PHZ – Região de pré-aquecimento, IRZ – Região inicial de radiação, NAZ – região analítica, “Tail Plume” - região de menor temperatura ($\pm 6000^{\circ}\text{C}$)]. Fonte: Boss & Fredeen , 1999, p. 2-4.

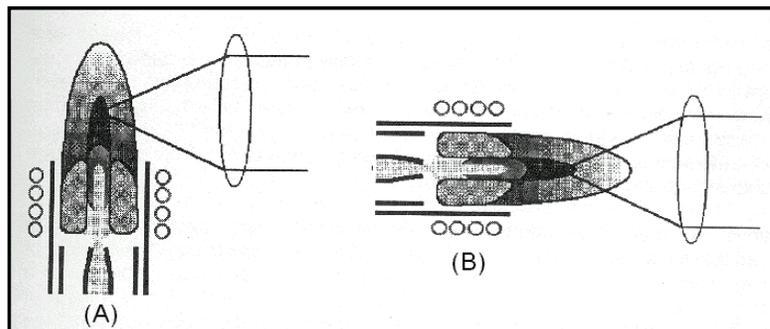


Figura 5.2 - Modos de observação do plasma. (A) Visão radial, (B) Visão Axial
Fonte: Boss & Fredeen , 1999, p. 3-17

Na década de 70, foi proposto a utilização do modo de observação axial da tocha, AX - ICP OES (Abdallah *et al.*, 1976). O plasma é posicionado horizontalmente e a região de observação é na parte frontal do plasma, Figura 5.2 (B). Nesta posição, um caminho óptico maior é percorrido aumentando o tempo de residência do analito no canal central do plasma, o que produz um aumento na emissão do analito proporcionando maior sensibilidade e um ganho de 5 a 10 vezes no limite de detecção (Boss & Fredeen, 1999). Entretanto, juntamente com o aumento da sensibilidade, também é observado um aumento dos efeitos da matriz e de interferências espectrais (Brenner & Zander, 2000; Todoli *et al.*, 1998). O modo de observação radial, apesar de menos sensível, está menos sujeito a interferências espectrais podendo ser utilizado na análise de matrizes complexas (Silva *et al.*, 2002).

No modo de observação axial, os efeitos de matriz, que são atribuídos à presença de elementos facilmente ionizáveis (EIE) e Ca, (Brenner & Zander, 1997) e os efeitos de auto-absorção, são minimizados pela aplicação de um fluxo gasoso que remove a extremidade de menor temperatura do plasma (cauda), protegendo a interface ótica de danos térmicos e prevenindo depósitos de sais nas lentes óticas de entrada e de espelhos. Este fluxo de gás torna possível a determinação de elementos na região do ultravioleta.

5.2 - Diagnóstico Mg II / Mg I

A razão de intensidade Mg II (280,270 nm) / Mg I (285,213 nm) ou Mg iônico / Mg atômico é um critério prático utilizado para determinar a “robustez” de um plasma e avaliar seu desempenho analítico (Hill, 1999).

O termo “robustez” representa a eficiência na transferência de energia, na resposta do plasma às mudanças nas condições de atomização e excitação, e na composição química da solução aspirada (Brenner & Zander, 2000; Silva *et al.*, 2002). A condição robusta é obtida quando o plasma está próximo das condições de LTE (Equilíbrio Termodinâmico Local). De acordo com a equação de Saha-Boltzman (5.1), levando em consideração os valores de densidade eletrônica geralmente observados no plasma ($10^{20} - 10^{22} \text{ m}^{-3}$) e que sob LTE as temperaturas de excitação e do elétron são iguais ($> 6.500 \text{ K}$), o valor teórico para a razão Mg II / Mg I em condições robustas é ≥ 8 . Isso significa que quando o valor experimental para a razão Mg II / Mg I for ≥ 8 , os processos de atomização, excitação e ionização foram completados.

$$\frac{I_i}{I_a} = \left(1,76 \times 10^{21} / n_e \right) T^{3/2} \exp \left(-88732 / T \right) \quad (5.1)$$

As linhas iônicas, em contraste com as linhas atômicas, são bastante sensíveis às alterações nos parâmetros operacionais. Então, quaisquer mudanças no sinal devido à variação das propriedades do plasma, podem ser identificadas e avaliadas. A linha iônica Mg II 280,270 nm é utilizada, pois a soma de suas energias está na faixa 11-13 eV o que a torna mais sensível a alguma mudança nos parâmetros (Mermet, 1991).

Condições robustas (Mg II / Mg I \geq 8) podem ser obtidas quando forem usadas: baixa vazão de nebulização (aumentando o tempo de residência do analito), alta potência (aumentando a quantidade de espécies excitadas) e diâmetro do tubo injetor da tocha de \geq 2,0 mm, pois quanto maior o diâmetro menor é a velocidade do gás no canal central do plasma (Brenner & Zander, 2000; Silva *et al.*, 2002).

Vários estudos foram realizados aplicando-se a razão Mg II / Mg I para avaliar a robustez do plasma em condições diversas como a alta concentração de EIE's por Brenner e Zander (Brenner & Zander, 2000) a avaliação dos modos de observação radial e axial por Silva *et al.* (Silva *et al.*, 2002) na determinação de metais em vinagre para avaliar efeitos de matriz por Silva *et al.* (Silva *et al.*, 2004).

5.3 – Objetivo

Este trabalho também tem como objetivo desenvolver metodologias para determinação de Ca, K, Mg, Na, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, Ba, Al, Cd, Pb, V, Ni, Co e Li em leite materno colostro e maduro empregando a técnica de ICP OES e análise quimiométrica aplicada na avaliação do ajuste de modelos de calibração, na avaliação da qualidade dos ajustes e a utilização de curvas de limites de confiança e de previsão na identificação de regiões de maior precisão e para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação.

5.4 – Parte experimental

5.4.1 – Instrumentação

5.4.1.1 – Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Para a quantificação das espécies inorgânicas Ca, K, Mg, Na, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, Ba, Al, Cd, Pb, V, Ni, Co e Li, em leite materno, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica empregando configuração axial (AX-ICP OES), modelo Optima 2000 DV (Dual View, Perkin Elmer, Shelton, USA) equipado com fonte de rádio frequência de 40MHz que incorpora uma grade Echelle (79 linhas nm^{-1}) e fornece potências de 750–1500 W, um detector de estado sólido, um tubo injetor da tocha com 2,0 mm de diâmetro interno, um nebulizador de fluxo cruzado (*cross – flow*) acoplado com uma câmara de nebulização duplo-passo tipo *Scott* (DP). O equipamento também possui uma interface que introduz perpendicularmente à tocha uma alta vazão de ar que remove a extremidade de menor temperatura do plasma (*Shear gas*). O sistema de introdução da amostra é composto de um amostrador automático AS 90 Plus (Perkin Elmer). Os parâmetros operacionais utilizados estão mostrados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Condições operacionais para o ICP OES

Parâmetro	
Potência aplicada (kW)	1,3
Vazão do gás de nebulização (L min^{-1})	0,6
Vazão da amostra (mL min^{-1})	1,0
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	0,2
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	15
Vazão de bombeamento (mL min^{-1})	1,0
Diâmetro do tubo injetor (mm)	2,0
Altura da visão radial (mm)	14
Interface	<i>Shear gas</i>

5.4.1.2 - Seleção do Comprimento de Onda (λ)

Os comprimentos de onda de macro elementos (Ca, K, Mg e Na), micro elementos e constituintes traços (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Li, V, Ni, Co, Zn e Pb) utilizados são apresentados na tabela 5.2. A escolha dos comprimentos de onda utilizados para a maioria dos elementos foi baseada na literatura.

Tabela 5.2 – Dados para as linhas espectrais utilizadas.

Elemento	Linha	λ (nm)	E(eV)
K	I	766,49	5,96
Na	I	589,59	7,24
Ba	II	455,403	7,93
Al	I	396,153	9,13
Cu	I	324,75	11,55
Mg	I	285,213	11,99
Mn	II	257,61	12,25
Cr	II	267,716	12,95
Fe	II	238,204	13,07
Ca	I	317,933	13,15
Ni	II	221,65	13,67
Co	II	228,62	13,7
Cd	II	214,44	14,77
Pb	II	220,35	14,79
Zn	II	213,86	15,19
Li	I	670,784	7,24
V	II	270,094	11,37

I = Linha atômica II = linha iônica

5.4.1.3 – Forno de microondas

Um forno de microondas de média pressão (MLS 1200 MEGA, Milestone, Bergamo, Itália) equipado com 10 recipientes de Teflon[®], foi utilizado para digestão das amostras de

leite materno e amostras de material de referência certificado. O programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, no forno de microondas, está sumarizado na tabela 5.3 e o das amostras certificadas na tabela 5.4. Para os dois programas de aquecimento, 10 minutos de ventilação foram necessários, para um primeiro resfriamento dos recipientes e logo após esta etapa, os recipientes foram colocados por 30 minutos em banho com água corrente, à temperatura ambiente, para um posterior resfriamento. Os programas de aquecimento utilizados foram baseados em métodos propostos pelo fabricante para as matrizes digeridas e também através das seguintes referências: (Li *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 2001; Ikem *et al.*, 2002; Naveiro *et al.*, 2005; Vinas *et al.*, 2000; Vinas *et al.*, 2001).

Tabela 5.3. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno, em forno de microondas.

Etapa	tempo (min)	Potência (W)
1	5	250
2	5	400
3	5	500
4	1	600

Tabela 5.4. Programa de aquecimento para a digestão das amostras de material de referência certificado, em forno de microondas.

Etapa	tempo (min)	Potência (W)
1	1	250
2	1	0
3	6	250
4	6	400
5	4,5	600
6	1,5	250

5.4.2. Reagentes e soluções

Solução multielementar de 1000 mg L⁻¹ (Std. 3 Perkin Elmer Pure Plus) contendo todos os elementos estudados foi usada. HNO₃ (65% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% v/v) todos Merk, também foram utilizados. Todas as soluções padrões utilizadas foram preparadas diariamente da solução estoque por diluição com água ultrapura Milli-Q (Millipore, Milford,

MA, USA) e acidificadas com HNO_3 a 2% v/v. O material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) foi obtido do *National Institute of Standards and Technology* (Gaithersburg, MD, EUA).

5.4.3 – Amostras

Amostras de leite materno (colostró e maduro) foram fornecidas pelo banco de leite materno da Maternidade Odete Valadares, situada em Belo Horizonte, Minas Gerais. Para o método proposto, foram analisadas 29 amostras, sendo que, 17 eram de leite maduro e 12 de leite colostró. Para as análises envolvendo estudos de adição e recuperação de analito, foi utilizada uma mistura de vários leites maternos, incluindo leite maduro e colostró. As amostras eram de mães residentes na região metropolitana de Belo Horizonte e na região centro-oeste de Minas Gerais. As amostras foram mantidas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ até a análise. As amostras foram analisadas na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

5.4.4 – Procedimento

5.4.4.1 – Preparação das amostras

Para a determinação das concentrações dos elementos estudados, alíquotas de 1,0 mL de leite humano, foram transferidas para recipientes de Teflon[®], juntamente com 2,0 mL de HNO_3 65% v/v e 0,5 mL de H_2O_2 30% v/v. Estas soluções foram digeridas em forno de microondas de média pressão, com etapas de potência que variaram de 250 a 600 W. Soluções totalmente digeridas, homogêneas e incolores foram obtidas. As amostras de leite materno, então, foram diluídas na proporção de 1:50 com água Milli-Q. O material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) também foi digerido em forno de microondas de média pressão, pesando-se 0,05 g de SRM e adicionou-se 2 mL de HNO_3 65% v/v, 0,5 mL de H_2O_2 30 v/v e 1 mL de água Milli-Q, para um volume final de 25 mL. As soluções de material certificado foram preparadas em triplicatas independentes e lidas medidas em

triplicatas aleatórias. Os programas de aquecimento para a digestão das amostras de leite materno e de material certificado estão descritos no item 5.4.1.3.

5.4.4.2 - Parâmetros de mérito

5.4.4.2.1 - Verificação da estabilidade e da robustez do plasma

A avaliação da estabilidade do plasma em curto e longo período (*Short e long-term stability*) foi feita em solução de leite materno digerido (1:50) contendo 2 mg L⁻¹ de Mg em HNO₃ 2% (v/v). Para a estabilidade em curto período foram feitas 15 medidas consecutivas da intensidade da linha de Mg II 280,265 nm e posterior análise do desvio padrão relativo. Para o teste de estabilidade em longo período a emissão da linha de Mg foi monitorada durante um período de 2,0 horas sendo realizadas 8 medidas com intervalos de 15 minutos. Ambos os testes foram feitos empregando o AX-ICP OES e operando em condições fixas com vazão do gás de nebulização de 0,6 L min⁻¹ e potência aplicada de 1,3 kW, como sugerido pela literatura (Silva *et al.*, 2002).

O ajuste do ICP foi feito empregando uma vazão do gás de nebulização que variou de 0,3 – 1,1 L min⁻¹ e a potência variando de 1,1 – 1,5 kW. A robustez do plasma, submetido a alterações desses parâmetros, foi avaliada empregando como diagnóstico, a razão Mg II / Mg I. O plasma é considerado robusto quando a razão Mg II / Mg I \geq 8 (Brenner & Zander, 2000).

5.4.4.2.2 - Linearidade e efeito de matriz

Linearidade em um método analítico é a capacidade de se obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analitos em amostras, em uma faixa de concentração específica (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003). É determinada através da análise de uma série de padrões que abrangem a faixa de concentração de interesse gerando uma curva de

calibração. O coeficiente de correlação da reta gerada pela curva de calibração deve ser igual ou maior que 0,99.

A verificação da existência ou não de efeito de matriz pode ser feita comparando o perfil das curvas obtidas pela calibração aquosa e de ajuste de matriz. Se apresentarem perfis semelhantes e paralelos, o sistema não apresenta efeito de matriz. Caso a análise visual não seja possível, os coeficientes angulares das curvas podem ser comparados empregando o teste *t* de *Student* e/ou o teste F, verificando se há diferença significativa entre seus valores (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

Nesse trabalho, foi estudada uma faixa de linearidade que variou entre 2,0 e 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os metais Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, V, Co e Li; uma faixa de 10,0 a 600,0 mg L^{-1} para Ca, 5,0 a 80,0 mg L^{-1} para Mg e Na, e uma faixa de 15,0 a 900,0 mg L^{-1} para K. A curva de linearidade foi construída com as soluções padrão em água ($n = 3$) e em leite materno digerido ($n = 3$). As inclinações das curvas de cada analito, em água e em leite digerido, foram comparadas avaliando a existência ou não de efeito de matriz significativos. As contagens por segundo (CPS) de cada concentração foram medidas três vezes e os respectivos valores médios usados para a construção das curvas de linearidade.

5.4.4.2.3 – Determinação dos LD e LQ

Para a determinação dos parâmetros de mérito LD e LQ, comparamos as várias metodologias presentes na literatura e suas consistências lógicas. As medidas foram feitas em condições robustas pré-estabelecidas no instrumento e empregando modo de observação axial.

5.4.4.2.4 – Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada calculando o RSD (%) de 10 amostras independentes, lidas em triplicatas aleatórias, para as seguintes concentrações: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Li, Ba, V, Cr, Ni, Mn, Pb, Cu, Co, Cd, e Al; 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe e Zn; 200,0 mg L^{-1} para

Ca; 300,0 mg L⁻¹ para K e 30,0 mg L⁻¹ para Mg e Na; que correspondem aos pontos de maior precisão (ver item 3.1.3), referentes à curva de calibração.

A exatidão também foi avaliada empregando a quantificação de amostras de material de referência certificado *Infant Formula* (NIST SRM 1846) e através de estudos de adição e recuperação de analito. A exatidão do método, utilizando o material de referência, foi avaliada empregando o teste *t* de Student. No caso de estudos envolvendo adição e recuperação de analito, uma recuperação ideal e desejada seria de 100%, mas flutuações de 10% são consideradas bons resultados e dentro da faixa de 20% podem ser consideradas aceitáveis (Welz & Sperling, 1999; EPA). Para o estudo de adição e recuperação de analito, soluções foram contaminadas e preparadas em 3 níveis de concentração, 5,0; 20,0 e 40,0 µg L⁻¹ para os analitos Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, V, Co e Li; níveis de 50,0; 200,0 e 400,0 mg L⁻¹ para Ca; 20,0, 40,0 e 60,0 mg L⁻¹ para Mg e Na; e 75,0; 300,0 e 600,0 mg L⁻¹ para K, antes da digestão em forno de microondas, preparadas em triplicatas independentes e medidas em triplicatas, nas condições robustas de operação. Os valores obtidos foram comparados com os valores adicionados (100%) e o resultado expresso em porcentagem de recuperação (%).

5.4.4.3 - Análise de amostras reais

A quantificação dos analitos de interesse, nas amostras reais, foi realizada com amostras fornecidas pelo banco de leite materno da Maternidade Odete Valadares, empregando ICP OES e curva de calibração aquosa baseada nas condições ótimas de operação.

5.4.4.4 – Avaliação e emprego de padrão interno

A escolha do padrão interno apropriado na tentativa de minimizar algum efeito interferente que pudesse ocorrer sobre as linhas analíticas, foi feita pela avaliação do perfil de resposta às alterações do plasma utilizando uma solução contendo 2,0 mg L⁻¹ de todos os analitos e 2,0 mg L⁻¹ de padrão interno. Os elementos testados como padrão interno e suas respectivas linhas analíticas foram Co 228,61 nm (13,7 eV), Li 670,78 nm (3,87 eV), Ni 231,60 nm (14,03 eV) e Y 371,03 nm (9,9 eV). A utilização de padrão interno nessa etapa não

foi necessária, pois os sinais analíticos de soluções com a presença de padrão interno não diferem significativamente em relação às soluções sem a presença de padrão interno.

5.4.5 – Resultados e discussão

5.4.5.1 – Estabilidade do plasma

A estabilidade do plasma foi verificada aplicando-se os testes de estabilidade do plasma em curto e longo período, descritos no item 5.4.4.2.1. Ambos os testes foram feitos empregando o AX-ICP OES e operando em condições fixas com vazão do gás de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$ e potência aplicada de $1,3 \text{ kW}$, como sugerido pela literatura (Silva *et al.*, 2002). A precisão obtida para as medidas em curto período foi de $0,84\%$ e para as medidas em longo período foi de $1,08\%$, respectivamente, o que são resultados concordantes com os obtidos por (Silva *et al.*, 2002). Os bons valores de RSD obtidos possibilitam análises contínuas e com significativa precisão.

5.4.5.2 – Linearidade e efeito de matriz

Para o estudo da linearidade e do efeito matriz foram construídas três curvas de calibração aquosa e três curvas de ajuste de matriz em leite materno digerido. O método apresentou resposta linear às concentrações de todos os analitos na faixa testada de $2,0$ a $70,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para os metais Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, V, Co e Li; uma faixa de $10,0$ a $600,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Ca, $5,0$ a $80,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Mg e Na, e uma faixa de $15,0$ a $900,0 \text{ mg L}^{-1}$ para K, tanto em curva aquosa quanto em leite materno digerido.

A verificação da ocorrência de efeito de matriz foi realizada comparando os coeficientes angulares das curvas obtidas pela calibração aquosa e pela curva de ajuste de matriz, empregando o teste *t* pareado de *Student*, verificando se há diferença significativa

entre seus valores. Assim, como obtido para as análises realizadas pelo ICP-MS, para as amostras analisadas pelo ICP OES, verificamos que, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas, não apresentaram diferença significativa entre si, em um intervalo de confiança de 95%, para uma faixa de 2,0 a 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os metais Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, V, Co e Li; 10,0 a 600,0 mg L^{-1} para Ca, 5,0 a 80,0 mg L^{-1} para Mg e Na e uma faixa de 15,0 a 900,0 mg L^{-1} para K, podendo concluir que, não há interferência da matriz sobre os resultados medidos. Assim, a calibração aquosa foi utilizada na determinação de todos os elementos analisados por ICP OES.

5.4.5.3 – Comparação entre o MMQO e o MMQPA

Da mesma forma que foi realizada a comparação entre os métodos de regressão linear, MMQO e o MMQPA, na determinação dos elementos por ICP-MS, também foi feita para os elementos analisados por ICP OES. Primeiramente foi verificado se as variâncias das respostas instrumentais, de todos os analitos estudados, apresentavam um comportamento homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes). Os elementos Ca, K, Mg, Na, Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Li, Ni, Co, Zn e Pb apresentaram variâncias diferentes, sendo que, neste caso, deveriam ser calibrados através do MMQPA; e os elementos V e Al apresentaram variâncias iguais, sendo assim, deveriam ser calibrados pelo MMQO. Neste sentido, avaliamos se estes métodos são estatisticamente iguais ou diferentes, na calibração do mesmo analito, lembrando que, o MMQPA é um método mais laborioso que o MMQO.

Para avaliar se o MMQO e o MMQPA são métodos estatisticamente iguais ou diferentes, foi aplicado o teste *t* pareado de *Student*, para comparar os coeficientes angulares das duas curvas aquosas construídas, uma utilizando o MMQO e a outra utilizando o MMQPA, para todos os elementos estudados. A tabela 5.5 apresenta as equações das regressões lineares realizadas a partir do MMQO e do MMQPA, com o respectivo t_c de *Student*. O valor de $t_{95\%, 2}$, corresponde a 4,303, assim, na tabela 5.5, podemos observar que, para os elementos Cu, Cd, Zn, Al, Ca, Mg, Na, K e Fe, os métodos foram estatisticamente diferentes, sendo assim, para os elementos supra-citados, a calibração deve ser realizada utilizando o MMQPA e somente para o Al e V, a calibração deve ser realizada utilizando o MMQO, obrigatoriamente. Como para os demais elementos (Ba, Cr, Mn, Li, Ni, Co e Pb), os métodos empregados não foram estatisticamente diferentes, a escolha de realizar a calibração

utilizando o MMQO ou o MMQPA, para estes analitos, não afetará significativamente seus resultados finais, na amostra de interesse. Com isso, preferimos utilizar o MMQO para realizar a calibração, para os demais analitos, visto que, é um método mais simples e que pode ser realizado por vários programas disponíveis no mercado, inclusive com o próprio programa do equipamento, como já discutido anteriormente.

Tabela 5.5. Comparação entre os métodos MMQO e MMQPA, para análises feitas utilizando ICP OES.

Analito	Equação ajustada pelo MMQO	Equação ajustada pelo MMQPA	t_c de Student
Ba	$y = 23527,0 (\pm 32,9) x - 11052,0 (\pm 42,3)$	$y = 23171,8 (\pm 234,3) x + 9599,9 (\pm 142,5)$	2,600
V	$y = 220,7 (\pm 2,7) x + 405,0 (\pm 3,0)$	$y = 230,4 (\pm 2,8) x + 25163,7 (\pm 104,5)$	4,185
Cr	$y = 172,6 (\pm 0,4) x - 12,8 (\pm 0,1)$	$y = 173,4 (\pm 2,5) x + 1157,8 (\pm 9,4)$	0,562
Ni	$y = 26,4 (\pm 0,1) x + 28,3 (\pm 1,8)$	$y = 27,0 (\pm 1,1) x + 68,6 (\pm 2,4)$	0,893
Mn	$y = 1307,6 (\pm 1,0) x - 70,3 (\pm 0,9)$	$y = 1308,7 (\pm 3,2) x + 2372,5 (\pm 9,7)$	0,584
Pb	$y = 6,4 (\pm 0,1) x + 7,2 (\pm 0,1)$	$y = 6,3 (\pm 0,2) x + 194,0 (\pm 4,0)$	0,614
Cu	$y = 220,4 (\pm 3,1) x + 1713,0 (\pm 24,9)$	$y = 211,5 (\pm 1,1) x + 150,3 (\pm 1,4)$	<u>4,627</u>
Co	$y = 58,8 (\pm 0,1) x - 68,8 (\pm 0,5)$	$y = 59,0 (\pm 0,1) x + 30,9 (\pm 0,3)$	1,732
Cd	$y = 72,0 (\pm 0,2) x - 192,4 (\pm 1,2)$	$y = 74,7 (\pm 0,2) x - 227,3 (\pm 1,7)$	<u>13,231</u>
Zn	$y = 63,8 (\pm 0,4) x - 86,4 (\pm 2,0)$	$y = 66,7 (\pm 0,1) x - 79,9 (\pm 1,5)$	<u>10,356</u>
Al	$y = 183,6 (\pm 3,6) x + 361,5 (\pm 2,4)$	$y = 151,9 (\pm 0,4) x + 5984,3 (\pm 6,4)$	<u>14,867</u>
Li	$y = 29541 (\pm 1151) x - 27109 (\pm 114)$	$y = 26743 (\pm 1261) x + 41528 (\pm 118)$	2,837
Ca	$y = 1140000 (\pm 29211) x + 2430964 (\pm 9842)$	$y = 1000000 (\pm 28143) x - 123707 (\pm 8211)$	<u>5,971</u>
Mg	$y = 4500000 (\pm 24753) x + 2100000 (\pm 7147)$	$y = 5000000 (\pm 26845) x - 2000000 (\pm 8286)$	<u>23,717</u>
Na	$y = 1300000 (\pm 31128) x + 2200000 (\pm 2478)$	$y = 1000000 (\pm 31657) x - 20203 (\pm 1101)$	<u>11,703</u>
K	$y = 506000 (\pm 2642) x + 584000 (\pm 121)$	$y = 480815 (\pm 2401) x - 85804 (\pm 140)$	<u>12,217</u>
Fe	$y = 163,4 (\pm 1,3) x + 2388,9 (\pm 6,3)$	$y = 172,1 (\pm 0,2) x + 1447,7 (\pm 5,4)$	<u>11,193</u>

$t_{95\%, 2} = 4,303$

5.4.5.4 – Avaliação da qualidade do ajuste do MMQ

Para avaliar a qualidade dos ajustes feitos pelo Método dos Mínimos Quadrados, escolhidos no item 5.4.5.3, para realizar a calibração dos elementos estudados, utilizamos os resíduos padronizados, que consistem no resíduo dividido pela incerteza em cada ponto da curva de calibração e o valor do chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2). Para um bom ajuste, os resíduos padronizados devem ter valores, em módulo, em torno de 1 (ver item 3.1.2). Para todos os analitos estudados, os resíduos padronizados ficaram em torno de 1. O χ_{red}^2 , a um nível de confiança de 95%, possui $\chi_{8,95\%}^2 = 2,73$, com isso, como podemos observar na tabela 5.6, os valores obtidos de χ_{red}^2 , para os elementos estudados, estão abaixo do valor tabelado de 2,73, onde podemos concluir que, as matrizes V_y estão bem estimadas e os métodos de calibração utilizados também são adequados. As figuras 5.3 e 5.4 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e a tabela 5.6 apresenta as equações utilizadas na calibração do método analítico e os valores de χ_{red}^2 , para todos os analitos, analisados por ICP OES.

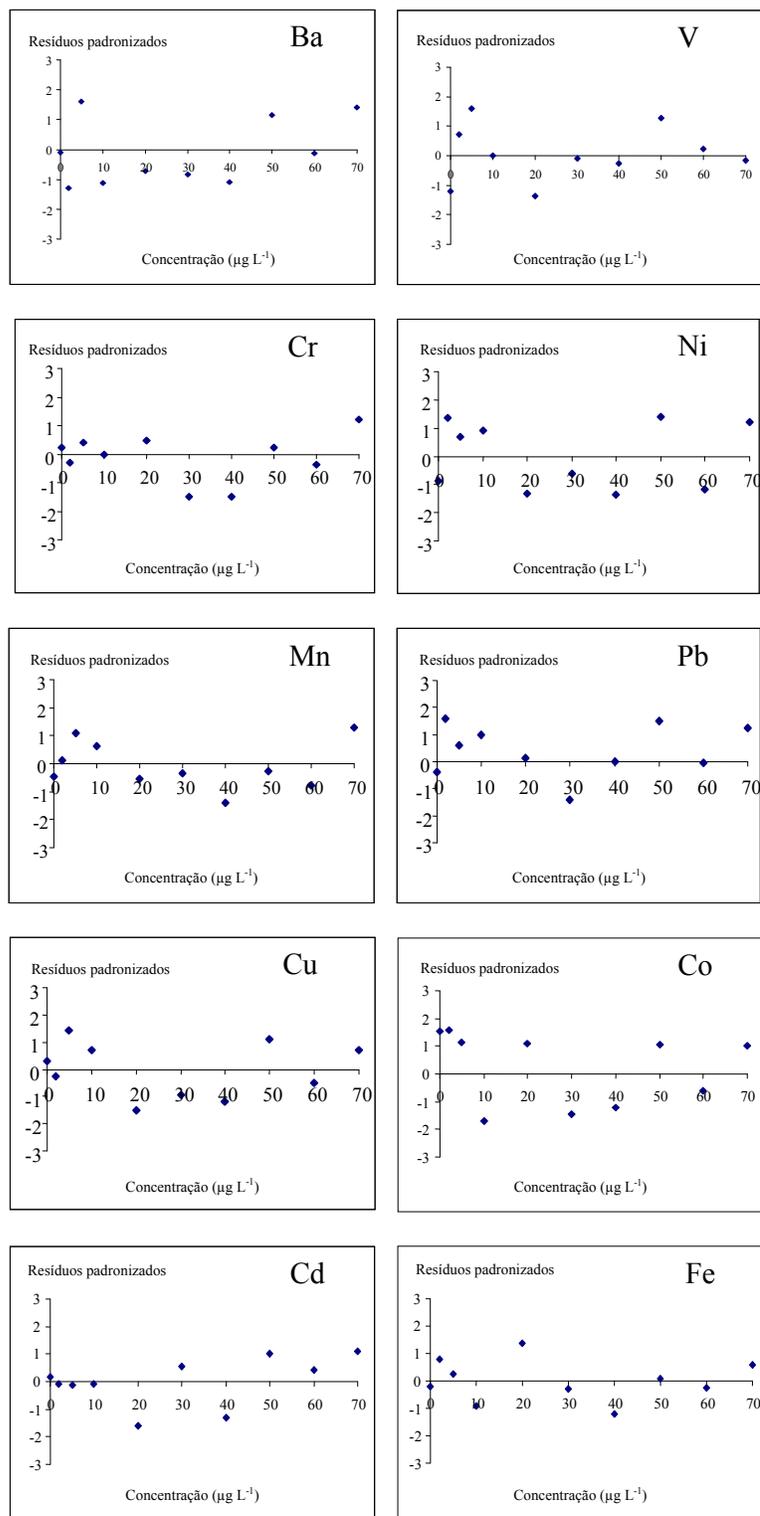


Figura 5.3. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP OES.

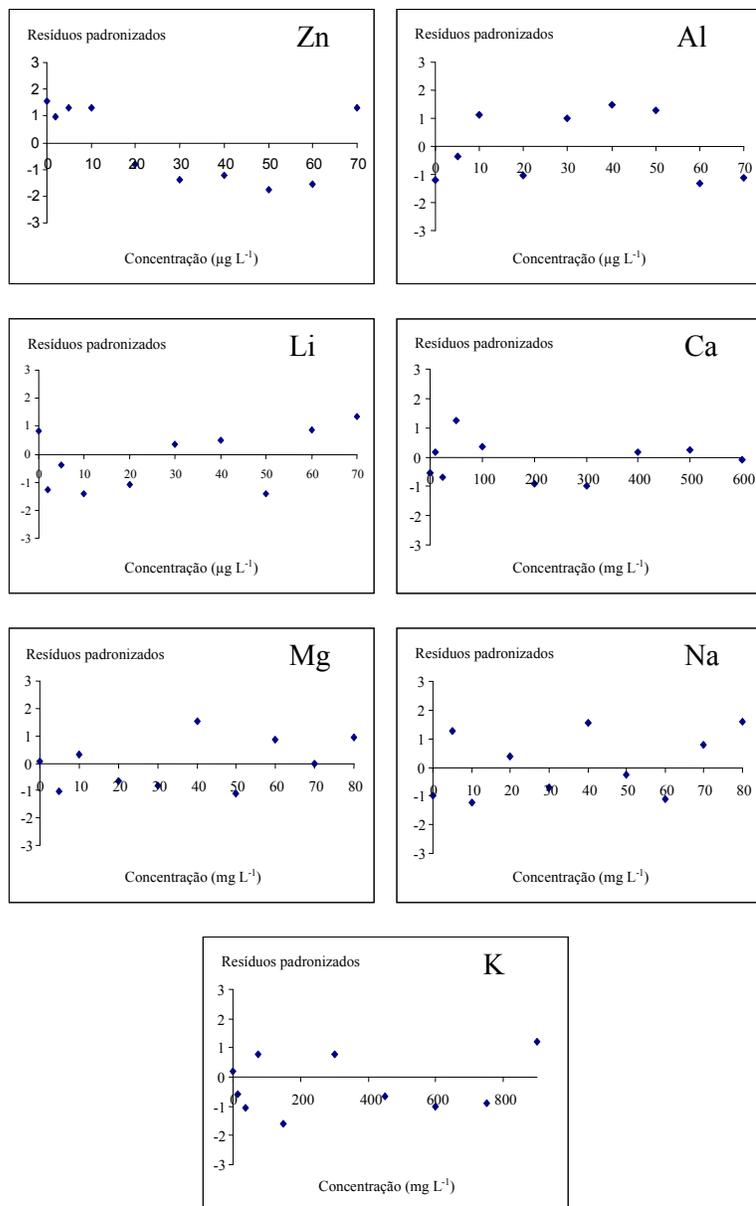


Figura 5.4. Resíduos padronizados dos elementos analisados por ICP OES, continuação.

Tabela 5.6. Valores de χ_{red}^2 para os elementos analisados por ICP OES.

Analito	Equação da reta de calibração utilizada	Ajuste utilizado	χ_{red}^2
Ba	$y = 23527,0 (\pm 32,9) x - 11052,0 (\pm 42,3)$	MMQO	2,29
V	$y = 220,7 (\pm 2,7) x + 405,0 (\pm 3,0)$	MMQO	2,05
Cr	$y = 172,6 (\pm 0,4) x - 12,8 (\pm 0,1)$	MMQO	1,71
Ni	$y = 26,4 (\pm 0,1) x + 28,3 (\pm 1,8)$	MMQO	2,36
Mn	$y = 1307,6 (\pm 1,0) x - 70,3 (\pm 0,9)$	MMQO	2,11
Pb	$y = 6,4 (\pm 0,1) x + 7,2 (\pm 0,1)$	MMQO	1,22
Cu	$y = 211,5 (\pm 1,1) x + 150,3 (\pm 1,4)$	MMQPA	2,55
Co	$y = 58,8 (\pm 0,1) x - 68,8 (\pm 0,5)$	MMQO	2,68
Cd	$y = 74,7 (\pm 0,2) x - 227,3 (\pm 1,7)$	MMQPA	2,10
Zn	$y = 66,7 (\pm 0,1) x - 79,9 (\pm 1,5)$	MMQPA	1,09
Al	$y = 183,6 (\pm 3,6) x + 361,5 (\pm 2,4)$	MMQO	1,57
Li	$y = 29541 (\pm 1151) x - 27109 (\pm 114)$	MMQO	2,07
Ca	$y = 1000000 (\pm 28143) x - 123707 (\pm 8211)$	MMQPA	1,93
Mg	$y = 5000000 (\pm 26845) x - 2000000 (\pm 8286)$	MMQPA	1,28
Na	$y = 1000000 (\pm 31657) x - 20203 (\pm 1101)$	MMQPA	2,62
K	$y = 480815 (\pm 2401) x - 85804 (\pm 140)$	MMQPA	2,69
Fe	$y = 172,1 (\pm 0,2) x + 1447,7 (\pm 5,4)$	MMQPA	1,50

5.4.5.5 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação

Os LD e LQ foram determinados através de uma curva aquosa, utilizando as equações de calibração demonstradas na tabela 5.6, para os respectivos elementos estudados neste trabalho. Estas curvas foram medidas em triplicatas, 10 amostras independentes de branco foram medidas 10 vezes e 10 amostras independentes fortificadas na mais baixa concentração (10,0 mg L⁻¹ para Ca, 5,0 mg L⁻¹ para Mg e Na, 15,0 mg L⁻¹ para K e 2,0 µg L⁻¹ para os demais elementos), utilizada na curva de calibração, foram também medidas 10 vezes. Os desvios padrão do branco e das amostras fortificadas foram utilizados na obtenção destas

figuras de mérito. As medidas foram realizadas empregando as condições robustas de operação.

Assim como no estudo envolvendo as análises realizadas por ICP-MS, avaliamos as várias metodologias da literatura para determinação dos LD e LQ, para decidir qual a melhor para ser utilizada, nas análises feitas por ICP OES. A tabela 4.7 apresenta os métodos utilizados para a determinação dos LD e LQ; os resultados encontrados estão descritos nas tabelas 5.7 e 5.8, para todos os analitos.

Tabela 5.7. Limites de detecção, em mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹ para os demais analitos, determinados por ICP OES, em leite materno.

Analito	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F
Ba	1,203	0,009	1,208	3,184	0,101	0,012
V	3,982	2,787	5,515	5,932	0,954	2,220
Cr	0,476	0,261	0,620	2,789	0,972	0,431
Ni	1,906	0,466	2,162	4,925	1,080	0,540
Mn	1,906	0,046	1,931	3,980	0,109	0,052
Pb	0,914	0,549	1,216	4,849	1,743	4,410
Cu	0,669	0,414	0,897	2,850	0,891	1,220
Co	1,746	0,046	1,771	4,232	0,429	0,060
Cd	0,595	0,125	0,663	3,038	0,618	2,831
Zn	0,173	0,120	0,239	2,937	0,858	0,320
Al	0,119	0,060	0,152	2,423	0,423	4,461
Li	0,458	0,033	0,476	2,515	0,174	0,045
Ca	2,609	0,062	2,643	13,972	0,017	74,231
Mg	0,826	0,009	0,831	5,483	0,164	12,098
Na	2,244	0,072	2,284	8,614	0,046	4,390
K	1,406	0,012	1,413	17,243	0,128	7,101
Fe	0,310	0,210	0,426	2,642	0,558	0,121

Tabela 5.8. Limites de quantificação, em mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹ para os demais analitos, determinados por ICP OES, em leite materno.

Analito	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F
Ba	1,224	0,031	1,212	3,418	0,335	0,024
V	10,485	9,290	6,769	8,158	3,180	6,890
Cr	1,085	0,870	0,737	5,057	3,240	0,861
Ni	2,993	1,553	2,372	7,445	3,600	1,080
Mn	2,013	0,153	1,952	4,233	0,362	0,100
Pb	2,195	1,830	1,463	8,916	5,810	8,531
Cu	1,635	1,380	1,083	4,929	2,970	2,440
Co	1,853	0,153	1,792	5,233	1,430	0,121
Cd	0,886	0,416	0,720	4,480	2,060	3,002
Zn	0,453	0,400	0,293	4,939	2,860	0,642
Al	0,259	0,200	0,179	3,410	1,410	6,980
Li	0,535	0,110	0,491	2,921	0,580	0,080
Ca	2,753	0,205	2,671	14,012	0,056	148,011
Mg	0,847	0,031	0,835	5,865	0,546	23,091
Na	2,413	0,241	2,317	8,722	0,154	8,790
K	1,434	0,040	1,418	17,541	0,426	14,201
Fe	0,800	0,700	0,520	3,944	1,860	0,231

Como já mencionado anteriormente, os métodos A, B e C utilizam dados somente referentes ao branco, quer dizer, não consideram outros fatores importantes, não protegem o resultados contra o Erro do Tipo I, falso positivo e também não evita o Erro do Tipo II, falso negativo.

Por sua vez os métodos D, E e F já consideram tais fatores como descrito anteriormente. Assim, observando os valores de LD e LQ, apresentados nas tabelas 5.7 e 5.8, descartamos o método F por apresentar valores mais conservadores que os demais métodos, principalmente para os metais Ca e Mg. Já o método E mostrou-se melhor para a maioria dos elementos. Assim, em relação aos demais métodos, escolhemos o método E para determinar o LD e o LQ dos elementos Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, V, Co, Li, Ca, Mg, Na e K, por razões de consistência lógica, por levarem em consideração o comportamento do analito junto com seus interferentes, e por apresentarem valores mais próximos da menor

concentração utilizada, com a exceção de poucos analitos. A tabela 5.9 apresenta a relação do coeficiente de correlação, a equação de calibração dos analitos analisados por ICP OES (n = 3) e limites de detecção e de quantificação escolhidos para este método.

Tabela 5.9. Relação do coeficiente de correlação e equação de calibração dos analitos analisados por ICP OES (n = 3) e limites de detecção e de quantificação.

Analito	Coeficiente de correlação	Equação de calibração	^aLD	^aLQ
Ba	0,9980	$y = 23527,0 (\pm 32,9) x - 11052,0 (\pm 42,3)$	0,101	0,335
V	0,9995	$y = 220,7 (\pm 2,7) x + 405,0 (\pm 3,0)$	0,954	3,180
Cr	0,9999	$y = 172,6 (\pm 0,4) x - 12,8 (\pm 0,1)$	0,972	3,240
Ni	0,9992	$y = 26,4 (\pm 0,1) x + 28,3 (\pm 1,8)$	1,080	3,600
Mn	0,9999	$y = 1307,6 (\pm 1,0) x - 70,3 (\pm 0,9)$	0,109	0,362
Pb	0,9979	$y = 6,4 (\pm 0,1) x + 7,2 (\pm 0,1)$	1,743	5,810
Cu	0,9998	$y = 211,5 (\pm 1,1) x + 150,3 (\pm 1,4)$	0,891	2,970
Co	0,9992	$y = 58,8 (\pm 0,1) x - 68,8 (\pm 0,5)$	0,429	1,430
Cd	0,9981	$y = 74,7 (\pm 0,2) x - 227,3 (\pm 1,7)$	0,618	2,060
Zn	0,9992	$y = 66,7 (\pm 0,1) x - 79,9 (\pm 1,5)$	0,858	2,860
Al	0,9993	$y = 183,6 (\pm 3,6) x + 361,5 (\pm 2,4)$	0,423	1,410
Li	0,9990	$y = 29541 (\pm 1151) x - 27109 (\pm 114)$	0,174	0,580
Ca	0,9990	$y = 1000000 (\pm 28143) x - 123707 (\pm 8211)$	0,017	0,056
Mg	0,9973	$y = 5000000 (\pm 26845) x - 2000000 (\pm 8286)$	0,164	0,546
Na	0,9985	$y = 1000000 (\pm 31657) x - 20203 (\pm 1101)$	0,046	0,154
K	0,9973	$y = 480815 (\pm 2401) x - 85804 (\pm 140)$	0,128	0,426
Fe	0,9978	$y = 172,1 (\pm 0,2) x + 1447,7 (\pm 5,4)$	0,558	1,860

^aLD e LQ em mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K; e para os demais analitos em µg L⁻¹.

5.4.5.6 – Precisão e exatidão

A tabela 5.10 apresenta os parâmetros analíticos do método para a quantificação dos analitos por ICP OES, em leite materno, em termos do LQ, precisão e exatidão. Para o estudo da exatidão do método, foram preparadas soluções com concentrações diferentes e independentes do material de referência certificado NIST SRM 1846 Infant Formula, para o estudo dos isótopos analisados. O poder de detecção resultante esteve em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ para os microelementos e em mg L^{-1} para os macroelementos (Ca, Na, Mg e K), enquanto que a precisão, expressa como desvio padrão relativo (R.S.D), foi melhor ou igual a 3,3%. Para checar a exatidão do método, estudos envolvendo adição e recuperação de analito também foram utilizados. Adequadas quantidades dos elementos foram adicionadas ao leite antes da digestão da amostra. As recuperações obtidas para os elementos analisados estiveram na faixa de 83,1 – 117,3% e estão listadas na tabela 5.11.

Os elementos Al e V não foram possíveis de recuperar no nível de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$, por ser esta uma concentração muito alta para esses metais, tendo em vista as suas pequenas quantidades presentes no leite materno. O contrário aconteceu com os metais Cu, Zn, Ca, Na e K e Fe, onde não foi possível recuperá-los nos níveis de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cu e Zn; $50,0 \text{mg L}^{-1}$ para Ca; $75,0 \text{mg L}^{-1}$ para K e $20,0 \text{mg L}^{-1}$ para Na, por serem estas concentrações muito baixas, tendo em vista as suas altas quantidades no leite materno. O elemento Cu não foi possível recuperá-lo no estudo de material certificado, como mostra a tabela 5.10, porque a quantidade desse metal presente na solução preparada de material certificado foi baixa e a concentração de Mn não foi determinada por ICP OES, por apresentar baixa concentração desse metal no material certificado, sendo impossibilitada a digestão de uma grande quantidade de amostra desse material.

Em termos gerais, as recuperações obtidas e, os valores obtidos comparados com os valores recomendados, no material de referência certificado, apresentaram concordância entre si, para um nível de confiança de 95%. Assim, podemos concluir que o método proposto é adequado para quantificação dos metais analisados por ICP OES, presentes em leite materno.

Tabela 5.10. Parâmetros analíticos do método, para a quantificação dos analitos por ICP OES, em leite materno ($t_{95\%,2} = 4,303$).

Analito	LQ ^a	Repetitividade ^b R.S.D. (%)	Exatidão ^c			<i>t</i> de Student
			Certificado ^d ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ^d ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inexatidão (%)	
Ba	0,335	1,8	nc ^e	-	-	-
V	3,180	2,2	nc	-	-	-
Cr	3,240	1,7	nc	-	-	-
Ni	3,600	1,1	nc	-	-	-
Mn	0,362	2,3	ci	-	-	-
Pb	5,810	2,8	nc	-	-	-
Cu	2,970	3,1	10,2 ± 0,1	5,31 ± 0,08	52,0	80,24
Co	1,430	0,9	nc	-	-	-
Cd	2,060	1,6	nc	-	-	-
Zn	2,860	2,0	122,1 ± 1,1	116,8 ± 2,9	95,6	2,944
Al	1,410	1,2	nc	-	-	-
Li	0,580	1,8	nc	-	-	-
Ca	0,056	2,7	7,38 ± 0,21	7,16 ± 0,54	96,9	0,678
Mg	0,546	1,5	1,08 ± 0,02	1,08 ± 0,09	99,9	0,020
Na	0,154	3,3	4,84 ± 0,35	5,61 ± 0,51	115,8	2,134
K	0,426	2,8	14,4 ± 0,5	14,3 ± 0,8	99,6	0,093
Fe	1,860	2,4	126,9 ± 1,9	119,5 ± 3,1	94,2	3,533

^aLQ em mg L^{-1} para Ca, Na, Mg e K; e para os demais analitos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

^bCalculado sobre 10 amostras independentes, lidas em triplicatas aleatórias para as seguintes concentrações: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Li, Ba, V, Cr, Ni, Mn, Pb, Cu, Co, Cd, e Al; 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe e Zn, 200,0 mg L^{-1} para Ca, 300,0 mg L^{-1} para K e 30,0 mg L^{-1} para Mg e Na.

^cRealizado com o NIST SRM 1846 Infant Formula.

^dMédia ± S.D.

^enc: não certificado e ci: concentração informada

Tabela 5.11. Recuperação (%) dos elementos em amostras de leite materno digerido (n = 3), analisadas por ICP OES.

Analito	Recuperação (%)		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Ba	107,4 ± 4,3	94,6 ± 0,4	90,0 ± 0,3
V	107,9 ± 10,8	84,8 ± 2,3	<u>74,5 ± 2,2</u>
Cr	107,8 ± 8,6	96,5 ± 3,0	91,9 ± 0,3
Ni	93,3 ± 1,7	89,0 ± 2,9	86,8 ± 0,8
Mn	100,9 ± 6,5	94,2 ± 1,9	91,0 ± 0,8
Pb	103,4 ± 9,4	100,1 ± 10,2	83,2 ± 1,0
Cu	<u>134,1 ± 2,3</u>	100,4 ± 1,0	97,2 ± 1,2
Co	106,6 ± 5,5	97,5 ± 1,4	90,3 ± 0,7
Cd	100,3 ± 2,2	90,9 ± 1,2	86,4 ± 0,5
Zn	<u>161,8 ± 3,0</u>	105,8 ± 4,3	117,3 ± 2,8
Al	101,8 ± 13,6	91,8 ± 5,5	<u>72,7 ± 1,9</u>
Li	115,5 ± 5,5	97,9 ± 1,9	95,8 ± 1,3
Ca	<u>168,7 ± 3,6</u>	113,6 ± 5,9	109,9 ± 1,8
Mg	104,5 ± 4,3	91,4 ± 0,8	114,2 ± 1,6
Na	<u>184,5 ± 3,4</u>	115,6 ± 3,4	114,3 ± 6,4
K	<u>218,1 ± 2,7</u>	113,8 ± 5,7	110,8 ± 1,1
Fe	<u>43,2 ± 3,3</u>	95,7 ± 3,3	83,1 ± 2,5

Nível 1: 50,0 mg L⁻¹ para Ca; 75,0 mg L⁻¹ para K; 20,0 mg L⁻¹ para Mg e Na; e 5,0 µg L⁻¹ para os demais metais.
Nível 2: 200,0 mg L⁻¹ para Ca; 300,0 mg L⁻¹ para K; 40,0 mg L⁻¹ para Mg e Na; e 20,0 µg L⁻¹ para os demais metais.
Nível 3: 400,0 mg L⁻¹ para Ca; 600,0 mg L⁻¹ para K; 60,0 mg L⁻¹ para Mg e Na; e 40,0 µg L⁻¹ para os demais metais.

5.4.5.7 – Quantificação de amostras reais

As tabelas 5.12 e 5.13 apresentam os valores das concentrações dos analitos estudados, presentes em 12 amostras de leite materno colostro e as tabelas 5.14 e 5.15 os presentes em 17 amostras de leite materno maduro. As faixas das concentrações obtidas também são comparáveis com os valores encontrados na literatura, especialmente para aqueles vindos de estudos colaborativos da WHO IAEA (WHO, 1989), para o conteúdo de traços de elementos

em leite materno no mundo todo. Em termos gerais, os dados obtidos pela análise por ICP OES, também não indicam a presença de elementos potencialmente tóxicos em relação aos valores encontrados na literatura. Em relação ao analito ^{51}V , não foi encontrado na literatura valores que apontam a extensão desse metal em leite materno. Em relação às amostras de mães fumantes que correspondem às amostras nomeadas como mãe 4, mãe 5 e mãe 6, essas amostras não apresentaram a presença de elementos potencialmente tóxicos, mas a amostra mãe 5, apresentou um alto nível de Ni e Al; enquanto que houve também uma alta concentração em Zn e uma baixa concentração de Fe em relação às demais amostras.

Tabela 5.12. Faixas dos analitos em leite materno, presentes na literatura, em mg L^{-1} para Ca, Mg, Na e K, e em $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais metais (Jensen, 1995; WHO, 1989).

Analito	Faixa na literatura	Analito	Faixa na literatura
Ba	0,9 – 47	Cd	0,7 – 4,6
V	-	Cu	180 - 751
Li	0,08 – 1,3	Fe	200 - 800
Al	3 - 125	Zn	700 - 4000
Cr	0,2 – 59,0	Ca	180 - 300
Ni	0,5 – 10	Mg	9,5 – 62,5
Mn	3 - 40	Na	75,9 – 506,0
Pb	2 - 200	K	351 - 741
Co	0,1 – 2,0		

Tabela 5.13. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP OES (mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹, para os demais analitos).

Amostras	Ba	V	Cr	Ni	Mn	Pb	Cu	Co	Cd
Mãe 1	7,38 ± 0,49	85,8 ± 3,1	67,0 ± 6,4	48,3 ± 2,2	12,1 ± 0,7	14,5 ± 0,9	805 ± 32	1,22 ± 0,29	nd
Mãe 2	15,8 ± 0,3	176 ± 11	60,5 ± 5,5	111 ± 7	17,8 ± 1,4	nd	785 ± 28	1,71 ± 0,18	nd
Mãe 3	9,31 ± 0,72	193 ± 24	58,5 ± 7,3	76,3 ± 3,2	15,4 ± 0,9	34,9 ± 4,5	801 ± 36	1,45 ± 0,32	nd
Mãe 4	10,2 ± 0,4	nd	35,8 ± 3,0	2,92 ± 0,32	63,2 ± 4,5	127 ± 12	357 ± 19	1,47 ± 0,28	nd
Mãe 5	10,9 ± 0,5	101 ± 21	25,0 ± 3,4	40,7 ± 5,4	55,2 ± 5,4	nd	365 ± 23	1,44 ± 0,11	nd
Mãe 6	11,9 ± 1,0	76,6 ± 4,5	37,3 ± 5,4	7,66 ± 0,58	53,1 ± 4,9	56,2 ± 6,3	359 ± 15	1,78 ± 0,39	nd
Mãe 7	4,60 ± 0,37	158 ± 24	30,7 ± 2,3	49,1 ± 6,6	67,7 ± 6,5	111 ± 11	989 ± 38	1,38 ± 0,28	nd
Mãe 8	20,1 ± 1,0	284 ± 28	38,8 ± 4,2	58,7 ± 5,0	22,6 ± 2,3	174 ± 14	967 ± 37	1,38 ± 0,27	nd
Mãe 9	4,56 ± 0,43	60,8 ± 4,8	46,8 ± 5,3	4,26 ± 0,48	14,4 ± 0,9	128 ± 8	521 ± 18	nd	nd
Mãe 10	56,7 ± 3,7	67,0 ± 5,5	46,2 ± 4,5	13,7 ± 0,8	19,2 ± 0,8	125 ± 6	707 ± 19	nd	nd
Mãe 11	7,84 ± 0,58	68,4 ± 7,4	56,7 ± 3,3	nd	9,42 ± 0,54	76,3 ± 4,3	126 ± 5	1,57 ± 0,32	nd
Mãe 12	13,6 ± 0,8	10,5 ± 1,0	17,0 ± 1,1	13,9 ± 0,8	2,99 ± 0,30	1,89 ± 0,30	262 ± 11	1,17 ± 0,18	nd

nd = não detectado

Tabela 5.14. Quantificação de amostras de leite materno colostro (n = 3) por ICP OES (mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹, para os demais analitos),
continuação.

Amostras	Zn	Al	Li	Ca	Mg	Na	K	Fe
Mãe 1	3211 ± 45	nd	2,60 ± 0,20	288 ± 12	30,3 ± 3,4	761 ± 21	603 ± 18	273 ± 9
Mãe 2	4592 ± 53	nd	3,47 ± 0,43	138 ± 23	23,1 ± 5,4	558 ± 20	641 ± 17	921 ± 20
Mãe 3	3992 ± 38	nd	2,69 ± 0,32	334 ± 18	23,4 ± 3,4	470 ± 19	695 ± 19	1028 ± 28
Mãe 4	9187 ± 59	89,4 ± 8,4	8,26 ± 5,49	236 ± 15	21,1 ± 4,3	333 ± 12	736 ± 15	192 ± 9
Mãe 5	8608 ± 62	126 ± 10	3,91 ± 0,43	231 ± 14	19,5 ± 3,4	298 ± 9	656 ± 17	259 ± 12
Mãe 6	9418 ± 64	266 ± 12	nd	241 ± 16	21,1 ± 2,3	332 ± 11	736 ± 15	219 ± 10
Mãe 7	3388 ± 34	nd	nd	391 ± 18	25,5 ± 3,4	703 ± 18	784 ± 19	467 ± 12
Mãe 8	4519 ± 49	84,5 ± 7,2	nd	324 ± 24	27,9 ± 2,3	450 ± 14	553 ± 16	506 ± 15
Mãe 9	3564 ± 43	145 ± 8	nd	255 ± 15	22,4 ± 1,8	1008 ± 32	678 ± 12	138 ± 5
Mãe 10	4836 ± 53	244 ± 24	nd	325 ± 17	27,7 ± 1,2	707 ± 19	733 ± 9	128 ± 12
Mãe 11	6765 ± 59	nd	nd	286 ± 20	16,6 ± 0,9	324 ± 9	857 ± 11	163 ± 9
Mãe 12	1636 ± 32	nd	nd	245 ± 17	17,8 ± 1,8	1309 ± 28	559 ± 10	771 ± 13

nd = não detectado

Tabela 5.15. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP OES (mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹, para os demais analitos).

Amostras	Ba	V	Cr	Ni	Mn	Pb	Cu	Co	Cd
Mãe 15	7,88 ± 0,59	nd	31,6 ± 2,4	51,9 ± 2,2	28,9 ± 0,7	75,9 ± 2,3	403 ± 13	1,81 ± 0,29	nd
Mãe 16	1,60 ± 0,48	nd	26,4 ± 1,5	14,9 ± 0,4	12,0 ± 0,5	15,7 ± 0,8	202 ± 11	1,53 ± 0,23	nd
Mãe 17	8,98 ± 0,70	248 ± 7	59,1 ± 1,2	nd	16,5 ± 0,9	60,7 ± 3,2	848 ± 23	1,88 ± 0,18	nd
Mãe 18	11,9 ± 0,4	72,1 ± 8,0	23,7 ± 2,0	24,1 ± 0,8	11,7 ± 0,5	36,0 ± 2,3	459 ± 15	1,02 ± 0,32	nd
Mãe 19	13,3 ± 0,5	238 ± 24	32,6 ± 1,1	95,5 ± 3,2	30,7 ± 2,3	41,7 ± 4,3	644 ± 18	1,91 ± 0,27	nd
Mãe 20	9,50 ± 1,01	107 ± 10	44,6 ± 3,3	6,57 ± 0,89	43,5 ± 3,4	90,8 ± 6,4	340 ± 19	1,27 ± 0,28	nd
Mãe 21	5,27 ± 0,37	110 ± 4	30,9 ± 2,5	52,6 ± 3,4	41,9 ± 2,3	67,7 ± 3,4	596 ± 18	nd	nd
Mãe 22	7,08 ± 0,33	56,7 ± 4,2	28,5 ± 1,3	14,9 ± 0,3	26,0 ± 1,2	nd	464 ± 15	nd	nd
Mãe 23	4,40 ± 0,43	15,1 ± 1,0	42,8 ± 3,2	20,4 ± 1,0	25,2 ± 1,4	32,2 ± 3,2	152 ± 14	nd	nd
Mãe 24	6,07 ± 0,69	6,47 ± 0,33	45,4 ± 2,3	135 ± 6	23,9 ± 1,2	130 ± 8	190 ± 9	nd	nd
Mãe 25	10,8 ± 0,5	64,1 ± 4,8	39,3 ± 2,4	11,5 ± 0,5	17,9 ± 0,9	17,8 ± 0,8	141 ± 8	nd	nd
Mãe 26	7,68 ± 0,87	126 ± 8	51,1 ± 3,4	nd	21,5 ± 2,3	nd	125 ± 11	nd	nd
Mãe 27	7,96 ± 0,42	115 ± 9	1,31 ± 0,23	nd	0,436 ± 0,183	10,7 ± 0,4	606 ± 22	1,63 ± 0,39	nd
Mãe 28	5,18 ± 0,81	107 ± 7	14,8 ± 0,3	44,8 ± 2,0	1,37 ± 0,12	94,4 ± 4,5	828 ± 36	nd	nd
Mãe 29	6,45 ± 0,38	107 ± 6	34,3 ± 2,4	nd	4,19 ± 0,44	98,7 ± 4,5	408 ± 16	1,46 ± 0,28	nd
Mãe 30	15,0 ± 0,4	96,3 ± 5,5	13,9 ± 0,4	52,8 ± 3,2	2,68 ± 0,32	44,8 ± 3,4	632 ± 18	1,17 ± 0,11	nd
Mãe 31	5,56 ± 0,62	161 ± 8	5,25 ± 0,32	nd	6,05 ± 0,48	nd	292 ± 12	1,10 ± 0,23	nd

nd = não detectado

Tabela 5.16. Quantificação de amostras de leite materno maduro (n = 3) por ICP OES (mg L⁻¹ para Ca, Na, Mg e K, e em µg L⁻¹, para os demais analitos),
continuação.

Amostras	Zn	Al	Li	Ca	Mg	Na	K	Fe
Mãe 15	2271 ± 45	189 ± 16	4,24 ± 0,65	389 ± 19	34,5 ± 1,8	176 ± 10	482 ± 18	798 ± 18
Mãe 16	501 ± 14	nd	3,32 ± 0,56	241 ± 12	33,8 ± 2,3	1078 ± 18	385 ± 12	nd
Mãe 17	5085 ± 43	nd	5,69 ± 0,64	336 ± 13	23,1 ± 2,3	478 ± 11	866 ± 19	527 ± 12
Mãe 18	5408 ± 26	nd	4,47 ± 0,43	210 ± 10	22,0 ± 1,2	845 ± 28	548 ± 10	nd
Mãe 19	6657 ± 32	nd	4,18 ± 0,48	148 ± 8	23,2 ± 3,4	372 ± 19	727 ± 11	282 ± 7
Mãe 20	1382 ± 19	nd	nd	302 ± 11	20,7 ± 1,8	117 ± 8	691 ± 12	627 ± 11
Mãe 21	2609 ± 25	nd	nd	342 ± 14	17,2 ± 0,7	276 ± 14	562 ± 9	1175 ± 16
Mãe 22	2787 ± 27	nd	nd	316 ± 13	23,7 ± 2,3	802 ± 32	671 ± 11	186 ± 8
Mãe 23	525 ± 12	220 ± 13	nd	204 ± 11	21,0 ± 1,2	117 ± 9	345 ± 7	nd
Mãe 24	1454 ± 21	nd	nd	269 ± 13	25,5 ± 1,9	137 ± 18	514 ± 16	nd
Mãe 25	182 ± 11	255 ± 17	nd	171 ± 9	34,2 ± 3,4	1577 ± 21	529 ± 15	nd
Mãe 26	465 ± 14	248 ± 8	nd	262 ± 8	25,7 ± 2,3	722 ± 12	414 ± 17	73,2 ± 6,4
Mãe 27	4101 ± 59	173 ± 12	nd	202 ± 5	19,6 ± 1,0	273 ± 9	546 ± 15	nd
Mãe 28	2982 ± 29	nd	nd	378 ± 14	25,0 ± 3,4	526 ± 19	643 ± 17	128 ± 11
Mãe 29	2705 ± 31	nd	nd	263 ± 12	17,7 ± 1,2	343 ± 11	650 ± 13	419 ± 13
Mãe 30	5379 ± 43	nd	nd	331 ± 15	23,3 ± 2,1	366 ± 17	707 ± 19	191 ± 14
Mãe 31	995 ± 22	nd	nd	256 ± 13	19,8 ± 0,9	141 ± 9	429 ± 11	358 ± 15

nd = não detectado

Capítulo 6

Comparação entre ICP-MS e ICP OES

6 – COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS ICP-MS E ICP OES

Para comparar o desempenho analítico das técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes em leite materno, analisamos 3 amostras de leite materno colostro e 3 amostras de leite materno maduro, pelas duas técnicas analíticas. As tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 apresentam os valores das concentrações obtidas para os analitos estudados, comparando as duas técnicas analíticas ICP-MS e ICP OES, nas amostras de leite materno colostro. Já as tabelas 6.4, 6.5 e 6.6 apresentam os valores das concentrações obtidas para os analitos estudados, comparando as duas técnicas analíticas ICP-MS e ICP OES, nas amostras de leite materno maduro.

Como podemos observar para as amostras de leite materno colostro, as técnicas foram estatisticamente semelhantes, a um nível de 95% de confiança, exceto para alguns analitos como Cu e Al na tabela 6.2, lembrando que, para o metal Cu, esta diferença não chega a 10%. Para as amostras de leite materno maduro, as técnicas também foram estatisticamente semelhantes, a um nível de 95% de confiança, exceto para alguns analitos como Co na tabela 6.5 e Mn na tabela 6.6.

Tabela 6.1. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra A - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%,2} = 4,303$).

Amostra A - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Analito	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	t de Student
Ba	13,0 ± 0,8	0,032	13,6 ± 0,3	0,335	1,137
V	74,8 ± 1,7	0,015	76,4 ± 1,2	3,180	1,327
Cr	38,9 ± 0,4	0,090	38,2 ± 0,2	3,240	2,698
Ni	3,63 ± 0,32	0,135	4,14 ± 0,43	3,600	1,605
Mn	3,27 ± 0,62	0,020	2,99 ± 0,23	0,362	0,711
Pb	1,04 ± 0,29	0,155	< LQ	5,810	-
Cu	242 ± 3	0,057	262 ± 7	2,970	4,111
Co	0,796 ± 0,277	0,026	< LQ	1,430	-
Cd	0,182 ± 0,071	0,042	nd	2,060	-
Fe	857 ± 9	0,716	898 ± 14	1,860	4,164
Zn	1595 ± 30	0,165	1636 ± 25	2,860	1,796
Al	38,4 ± 1,7	0,160	36,5 ± 2,4	1,410	1,089

Tabela 6.2. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra B - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).

Amostra B - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Analito	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	t de Student
Ba	13,0 ± 0,3	0,032	13,4 ± 0,2	0,335	1,367
V	52,5 ± 1,9	0,015	50,2 ± 2,0	3,180	1,417
Cr	10,4 ± 0,8	0,090	14,1 ± 1,4	3,240	3,764
Ni	4,27 ± 0,37	0,135	4,12 ± 0,24	3,600	0,576
Mn	9,31 ± 1,08	0,020	9,67 ± 0,52	0,362	0,523
Pb	1,02 ± 0,08	0,155	nd	5,810	-
Cu	443 ± 7	0,057	475 ± 6	2,970	5,713
Co	0,259 ± 0,093	0,026	nd	1,430	-
Cd	0,140 ± 0,064	0,042	nd	2,060	-
Fe	963 ± 8	0,716	993 ± 9	1,860	3,967
Zn	2848 ± 33	0,165	2766 ± 31	2,860	3,139
Al	31,4 ± 0,9	0,160	42,4 ± 2,4	1,410	7,286

Tabela 6.3. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra C - leite materno colostro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).

Amostra C - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Analito	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	t de Student
Ba	9,62 ± 0,42	0,032	10,0 ± 0,3	0,335	1,258
V	35,7 ± 0,6	0,015	34,9 ± 0,5	3,180	1,568
Cr	20,4 ± 0,5	0,090	21,0 ± 0,6	3,240	1,264
Ni	10,8 ± 0,3	0,135	11,1 ± 0,4	3,600	0,873
Mn	8,54 ± 0,45	0,020	9,82 ± 0,37	0,362	3,762
Pb	2,32 ± 0,72	0,155	< LQ	5,810	-
Cu	375 ± 4	0,057	387 ± 6	2,970	2,471
Co	0,686 ± 0,096	0,026	< LQ	1,430	-
Cd	0,217 ± 0,012	0,042	nd	2,060	-
Fe	934 ± 10	0,716	951 ± 9	1,860	2,039
Zn	3293 ± 35	0,165	3275 ± 22	2,860	0,738
Al	54,4 ± 1,4	0,160	56,0 ± 1,2	1,410	1,449

Tabela 6.4. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra D - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).

Amostra D - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Analito	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	t de Student
Ba	7,47 ± 0,84	0,032	8,03 ± 0,21	0,335	1,109
V	42,4 ± 1,2	0,015	44,1 ± 2,0	3,180	1,199
Cr	24,8 ± 0,8	0,090	22,1 ± 1,3	3,240	2,984
Ni	33,2 ± 1,3	0,135	31,9 ± 1,5	3,600	1,080
Mn	6,14 ± 0,52	0,020	5,32 ± 0,47	0,362	1,991
Pb	2,21 ± 0,32	0,155	< LQ	5,810	-
Cu	335 ± 23	0,057	298 ± 26	2,970	1,806
Co	0,129 ± 0,062	0,026	nd	1,430	-
Cd	0,334 ± 0,075	0,042	nd	2,060	-
Fe	1075 ± 38	0,716	987 ± 32	1,860	3,022
Zn	1758 ± 33	0,165	1819 ± 25	2,860	2,497
Al	15,1 ± 1,7	0,160	nd	1,410	-

Tabela 6.5. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra E - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).

Amostra E - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Analito	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	t de Student
Ba	6,72 ± 1,03	0,032	7,47 ± 0,37	0,335	1,176
V	27,7 ± 0,6	0,015	28,6 ± 0,7	3,180	1,609
Cr	12,4 ± 0,8	0,090	13,9 ± 1,2	3,240	1,780
Ni	28,3 ± 0,7	0,135	29,1 ± 1,0	3,600	1,131
Mn	7,64 ± 0,32	0,020	9,27 ± 0,78	0,362	3,321
Pb	4,12 ± 0,29	0,155	< LQ	5,810	-
Cu	526 ± 12	0,057	551 ± 15	2,970	2,743
Co	0,578 ± 0,086	0,026	< LQ	1,430	-
Cd	0,246 ± 0,022	0,042	nd	2,060	-
Fe	1115 ± 26	0,716	1152 ± 15	1,860	2,074
Zn	2239 ± 31	0,165	2275 ± 34	2,860	1,363
Al	27,4 ± 1,2	0,160	31,2 ± 2,6	1,410	2,221

Tabela 6.6. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes na amostra F - leite materno maduro. (nd = não detectado e $t_{95\%, 2} = 4,303$).

Analito	Amostra F - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				<i>t</i> de Student
	ICP-MS	LQ (ICP-MS)	ICP OES	LQ (ICP OES)	
Ba	9,14 ± 0,34	0,032	9,82 ± 0,47	0,335	1,993
V	34,6 ± 1,5	0,015	36,4 ± 0,3	3,180	1,983
Cr	17,3 ± 0,7	0,090	19,2 ± 0,6	3,240	3,301
Ni	17,7 ± 0,8	0,135	15,9 ± 0,7	3,600	2,644
Mn	9,48 ± 0,32	0,020	13,0 ± 0,7	0,362	8,030
Pb	5,87 ± 0,55	0,155	6,78 ± 0,44	5,810	2,239
Cu	526 ± 12	0,057	488 ± 10	2,970	3,998
Co	0,654 ± 0,105	0,026	< LQ	1,430	-
Cd	0,326 ± 0,062	0,042	nd	2,060	-
Fe	948 ± 32	0,716	1011 ± 27	1,860	2,588
Zn	1943 ± 35	0,165	1886 ± 30	2,860	2,084
Al	44,5 ± 1,2	0,160	42,1 ± 1,7	1,410	1,957

A tabela 6.7 apresenta os valores das concentrações dos elementos analisados pelas duas técnicas. A concentração de Mn não foi determinada por ICP OES, por apresentar baixa concentração desse metal no material certificado, sendo impossibilitada a digestão de uma quantidade satisfatória de amostra desse material. Os valores obtidos para as concentrações de Cu, Fe e Zn foram concordantes entre as duas técnicas. Assim, tanto para as amostras reais quanto para o material certificado, as duas técnicas foram estatisticamente semelhantes, a um nível de 95% de confiança, para todos os analitos estudados, podendo então, ser utilizado qualquer uma das técnicas, para a análise de elementos presentes em leite materno colostro e maduro.

Tabela 6.7. Comparação entre as técnicas ICP-MS e ICP OES, na quantificação de elementos presentes no material certificado NIST 1846 Infant Formula.

Analito	Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado - ICP-MS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado - ICP OES ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>t</i> de Student
Cu	10,2 ± 0,1	9,24 ± 1,28	10,7 ± 1,3	1,403
Zn	122,1 ± 1,1	122,8 ± 2,8	117,6 ± 2,8	2,204
Fe	127,9 ± 0,8	126,8 ± 3,2	120,4 ± 3,4	2,373

$t_{95\%, 2} = 4,303$

Dependendo do objetivo, em relação à análise de constituintes inorgânicos presentes em leite materno, as duas técnicas empregadas, ICP-MS e ICP OES, podem ser consideradas complementares, em razão do limite de detecção de cada técnica, lembrando que a ICP-MS é uma técnica mais sensível que a ICP OES, por alcançar baixos limites de detecção que variam de 0,1 a 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ em soluções aquosas. Mas, como desvantagem em relação a ICP OES, a ICP-MS pode apresentar interferências isobáricas e poliatômicas, que podem ocorrer quando uma espécie iônica no plasma tem a mesma razão massa-carga (m/z) que um íon do analito. Entretanto, essas interferências podem ser corrigidas utilizando vários métodos, como a utilização de um branco, utilização de um isótopo diferente do analito, correções matemáticas, ajuste experimental das condições do plasma, dessolvatação, introdução de gás alternativo, entre outros.

CONCLUSÃO

A verificação do método de regressão linear utilizado para fazer a calibração do método de medição, é uma importante etapa do processo analítico. Neste estudo, para os elementos ^{138}Ba e ^{78}Se , analisados por ICP-MS, os dois métodos comparados, MMQO e MMQPA, foram estatisticamente diferentes entre si, sendo assim, para o ^{138}Ba , a calibração deve ser realizada utilizando o MMQPA e para o ^{78}Se , a calibração deve ser realizada utilizando o MMQO. Como para os demais elementos, os métodos de regressão linear empregados não foram estatisticamente diferentes, a escolha de realizar a calibração utilizando o MMQO ou o MMQPA, não afetou significativamente os resultados finais, na amostra estudada. Com isso, preferimos utilizar o MMQO para realizar a calibração, para os demais analitos, visto que, é um método mais simples e que pode ser realizado por vários programas disponíveis no mercado, inclusive com o próprio programa do equipamento. Para os metais Cu, Cd, Zn, Al, Ca, Mg, Na, K e Fe, analisados por ICP OES, os métodos foram estatisticamente diferentes, sendo assim, para estes elementos, a calibração deve ser realizada utilizando o MMQPA e somente para o Al e V, a calibração deve ser realizada utilizando o MMQO, obrigatoriamente.

A avaliação do ajuste escolhido, utilizando os resíduos padronizados e o χ_{red}^2 , foi adequada e necessária, tendo todos os valores de cada ponto utilizado na calibração dos metais analisados pelas duas técnicas analíticas, apresentaram valores em torno de 1. A utilização das curvas do limite de confiança do ajuste, juntamente com a reta de calibração, e das curvas do limite de previsão do ajuste, foi necessária para termos uma melhor estimativa de possíveis valores espúrios (*outlier*), ou seja, medidas que não pertencem a mesma população de dados.

A avaliação de qual melhor método a ser utilizado para expressar os limites de detecção e de quantificação dos métodos analíticos, demonstrou a grande dificuldade quando da escolha destes métodos, por não ter nenhuma padronização a ser utilizada. Neste trabalho, foi escolhido o método E para determinar o LD e o LQ de cada analito, analisados tanto por ICP OES quanto por ICP-MS, por razões de consistência lógica, por levar em consideração o comportamento do analito junto com seus interferentes, e por apresentar valores mais próximos da menor concentração utilizada, com a exceção de poucos analitos.

A precisão das análises realizadas por ICP-MS, expressa como desvio padrão relativo foi melhor ou igual a 3,4% enquanto que por ICP OES foi melhor ou igual a 3,3%. Para

checar a exatidão dos métodos, estudos envolvendo adição e recuperação de analito também foram utilizados. As recuperações para as análises por ICP-MS, foram na faixa de 80,8 - 110,9% e por ICP OES, estiveram na faixa de 83,1 - 117,3%. Os valores obtidos tanto para o ICP-MS quanto para o ICP OES, comparados com os valores recomendados, no material de referência certificado, apresentaram concordância entre si, para um nível de confiança de 95%. Assim, podemos concluir que o método proposto é adequado para quantificação dos elementos analisados por ICP-MS e por ICP OES, presentes em leite materno.

A quantificação de elementos essenciais e tóxicos em leite materno por ICP-MS e ICP OES oferece várias vantagens como simplicidade no preparo da amostra, curto tempo (< 2 h) e pequeno volume de amostra necessário (1 mL) em relação à quantidade requerida em outras técnicas. A diluição aplicada neste estudo, 1 mL de leite materno para 50 mL de solução, é adequada para determinação dos elementos estudados. Verificamos também que não existe diferença significativa entre os dois métodos, assim sendo, é possível de maneira satisfatória, a determinação de constituintes inorgânicos presentes em amostras de leite materno tanto por ICP-MS como por ICP OES. Nesse sentido, concluímos que as metodologias desenvolvidas são viáveis para implementação no controle de qualidade de leites maternos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOLINO, O.; ACETO, M.; BRUZZONITI, M. C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C. **Speciation of copper and manganese in milk by solid-phase extraction inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry.** *Anal. Chim. Acta*, 375, 299–306, 1998.
2. AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S. **Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers.** *Nutrition*, 16, 1069–1073, 2000.
3. ALEIXO, P. C.; SANTOS, D. J.; MULLER, R. C. S.; NÓBREGA, J. A. **Direct determination of selenium in coconut water and coconut milk using graphite furnace atomic absorption spectrometry.** *Quim. Nova*, 23, 3, 310 – 312, 2000.
4. ALKANANI, T.; FRIEL, J. K.; JACKSON, S. E.; LONGERICH, H. P. **Comparison between digestion procedures for the multielemental analysis of milk by inductively-coupled plasma-mass spectrometry.** *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1965 – 1970, 1994.
5. AMARASIRIWARADENA, D.; KOTREBAI, M.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. **Multielement analysis of human milk by inductively coupled plasma mass and atomic emission spectrometry after high pressure, high temperature digestion.** *Can. J. Anal. Sci. Spectr.*, 42, 69 – 78, 1997.
6. AMARO-LÓPEZ M.A.; MORENO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ SEGARRA, P.J.; ZURERA COSANO, G. *Alimentaria April*, 71-78, 1996.
7. AMERICAN CONFERENCE of Governmental Industrial Hygienists. **Limites de exposição ocupacional para substâncias químicas e agentes físicos**, 2005. 223 p.
8. AOAC Peer Verified Methods Program - **Manual on policies and procedures.** AOAC International, Arlington VA 22201-3301, USA, 1993.
9. ARRUDA, M.A.Z.; SANTELLI, R.E. **Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte.** *Química Nova*, 20(6):638, 1997.
10. AZOUZI, H.E.; CERVERA, M.L.; GUARDIA, M. **Multielemental analysis of mussel samples by atomic absorption spectrometry after room temperature sonification.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 13:533, 1998.

11. BAUMANN, H., **Rapid and sensitive determination of iodine in fresh milk and milk powder by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)**. *Fresenius's J. Anal. Chem.*, 338, 809 – 812, 1990.
12. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A practical guide**. Wiley, 1998.
13. BENEMARIYA, H.; ROBBERECHT, H.; DEELSTRA, H. *Sci. Total Environ.* 164, 161-174, 1995.
14. BENNER, I. B.; ZISCHKA, M.; MAICHIN, B.; KNAPP, G. **Ca and Na interference effects in an axially viewed ICP using low and high aerosol loadings**. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, 11, 1257 – 1264, 1998.
15. BERMEJO-BARRERA, P.; CALVO, C.P.; BERMEJO-MARTINEZ, F. **Comparative-study of chemical modifiers for the determination of molybdenum in milk by electrothermal atomization atomic-absorption spectrometry**. *Analyst*, 115, 549 – 551, 1990.
16. BERMEJO-BARRERA, P.; PITA-CALVO, C. **Determination of molybdenum in infant formula and human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry with barium difluoride as matrix modifier**. *Anal. Chim. Acta*, 231, 321 – 324, 1990.
17. BOCCA, B.; ALIMONTI, A.; CONI, E.; DI PASQUALE, M.; GIGLIO, L.; BOCCA, A. P.; CAROLI, S. **Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. *Talanta*, 53, 295 – 303, 2000.
18. BORGES NETO, W. **Aplicação de métodos de reconhecimento de padrões para a classificação de óleos vegetais**. Goiânia: UFV, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiás.
19. BORGES NETO, W. **Parâmetro de qualidade de lubrificantes e óleos de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. Campinas: UNICAMP, 2005. 120p. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo.
20. BORGGGAARD, O.K.; CHRISTENSEN, H.; LSOE, C. **Determination of copper in milk by graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry**. *Milchwissen.*, 39, 725 – 727, 1984.
21. [BOSS](#), C.B.; FREDEEN, K.J. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**. (2nd Edition ed.), Perkin-Elmer Corp., USA, 1999.

22. BRATTER, V.E.N.; RECKNAGEL, S.; GAWLIK, D. **Speciation of Se, Fe e Zn in human-milk whey – the use of instrumental neutron-activation analysis (INAA) to corroborate element profiles measured with inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry (ICP-AES).** *Fresenius's J. Anal. Chem.*, 353, 137 – 142, 1995.
23. BRENNER, I.B.; ZANDER, A.; COLE, M.; WISEMAN, A. **Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasmas for multi-element analysis: Effect of sodium and calcium.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, 897 – 906, 1997.
24. BRENNER, I.B.A.; ZANDER, A.T. **Axially and radially viewed inductively coupled plasmas – a critical review.** *Spectrochim. Acta B*, 55, 1195 – 1240, 2000.
25. BRERETON, R.G. **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry.** *Analyst.*, 125, 2125, 2000.
26. BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. **Quimiometria.** *Quím. Nova*, 8, 84 – 99, 1995.
27. CAROLI, S.; ALIMONTI, A.; DELLE FEMMINE, P.; PETRUCCI, F.; SENOFONTE, O.; VIOLANTE, N. **Role of inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry in the assessment of reference values for trace-elements in biological matrices.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 859 – 864, 1992.
28. CARRION, N.; ITRIAGO, A.; MURILLO, M.; ELJURI, E.; FERNANDEZ, A. **Determination of calcium, potassium, magnesium, iron, copper and zinc in maternal milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 205-207, 1994.
29. CASEY, C.E.; NEVILLE, M.C.; HAMBIDGE, K.M. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 773-785, 1989.
30. CHOW, P.Y.T.; CHUA, T.H.; TANG, K.F.; OW, B.Y. **Dilute acid digestion procedure for the determination of Lead, Copper and Mercury in traditional chinese medicines by atomic absorption spectrometry.** *Analyst*, 120:1221, 1995.
31. CONI, E.; BOCCA, A.; COPPOLELLI, P.; CAROLI, S.; CAVALLUCCI, C.; MARINUCCI, M. T. **Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products.** *Food Chem.*, 57, 253 – 260, 1996.
32. CONI, E.; CAROLI, S.; IANNI, D.; BOCCA, A. **A metodological approach to the assessment of trace-elements in milk and dairy-products.** *Food Chem.*, 50, 203 – 210, 1994.
33. CONI, E.; STACCHINI, A.; CAROLI, S. **Analytical approach to obtaining reference values for minor and trace-elements in human.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 5, 581 – 586, 1990.

34. DE BEER, J.O.; DE BEER, T.R.; GOEYENS, L. **Assessment of quality performance parameters for straight line calibration curves related to the spread of the abscissa values around their mean.** *Anal. Chim. Acta*, 2006.
35. DE BIÈVRE; CITAC, Orlando, Flórida, 1999.
36. DE BOER, J.L.M.; MAESSEN, F.J.M.J. **A comparative examination of sample treatment procedures for ICP-AES analysis of biological tissue.** *Spectrom. Acta*, 38 B (5/6): 739, 1983.
37. DEAN, J.R.; EBDON, L.; MASSEY, R. **Selection of mode for the measurement of lead isotope ratios by inductively coupled plasma mass spectrometry and its application to milk powder analysis.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2, 369 – 374, 1987.
38. DURRANT, S.F. **Multielemental analysis of environmental matrices by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Analyst*, 117, 1585 – 1592, 1992.
39. DURRANT, S.F.; WARD, N.I. **Laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the multielemental analysis of biological-materials – a feasibility study.** *Food Chem.*, 49, 317 – 323, 1994.
40. EKLUND, G.; OSKARSSON, A. **Exposure of cadmium from infant formulas and weaning foods.** *Food Add. Cont.*, 16, 509 – 519, 1999.
41. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Guidance for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program.** 1998.
42. ERICKSON, B. **Standardizing the world with microwaves.** *Anal. Chem. News & Features*, 1:467 A, 1998.
43. EURACHEM, **The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** *Eurachem Guide*, LGC (Teddington), 1998.
44. EURACHEM/CITAC, **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.** *EURACHEM/CITAC Guide*, 2000.
45. FEELEY, R.M.; EITENMILLER, R.R.; BENTON, J.B.; BARNHART, H. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 443-448, 1983.
46. FRANCO, G., **Tabela de Composição Química dos Alimentos.** 9ª edição, *Atheneu*, São Paulo, 2004.
47. FRANSSON, G.B.; LÖNNERDAL, B. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 185-189, 1984.

48. FURUSAWA, H. A., **Razão isotópica de enxofre em material atmosférico por ICP-MS de alta resolução**, São Paulo: USP, 1999. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo.
49. GARCIA, E.E.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. **Matrix effects on the determination of dysprosium, europium and ytterbium used as animal faecal markers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially and radially-viewed configurations**. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 825 – 930, 2001.
50. GASPARICS, T.; MARTINEZ, R.M.G.; CAROLI, S.; ZARAY, G. **Determination of trace elements in Antarctic krill samples by inductively coupled atomic emission and graphite furnace atomic absorption spectrometry**. *Microchemical J.*, 67, 1 – 3, 279, 2000.
51. GÉLINAS, Y.; IYENGAR G.V.; BARNES, R.M. **Total iodine in nutritional and biological reference materials using neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry**. *Fresenius`s J. Anal. Chem.*, 362, 483 – 488, 1998.
52. GUNSHIN, H.; YOSHIKAWA, M.; DOUDOU, T.; KATO, N. *Agric. Biol. Chem.* 49, 21-26, 1985.
53. HAMILTON, W.C. **Statistics in Physical Science: Estimation, Hypothesis Testing and Least Squares**, The Ronald Press Company, New York, 1964.
54. HILL, S.J. **Inductively Coupled Plasma Spectrometry and Its Applications**, Ed. Sheffield Academic Press, Sheffield, 1999.
55. HINES, W.W.; MONTGOMERY, D.C. **Probability and Statistics in Engineering and Management Science**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1990.
56. HOENIG, M.; KERSABIEC, A. **Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status**. *Spectrom. Acta*, 51B:1297, 1996.
57. HUA, K.M.; KAY, M.; INDYK, H.E. **Nutritional element analysis in infant formulas by direct dispersion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry**. *Food Chem.*, 68, 463 – 470, 2000.
58. IKEM, A.; NWANKWOALA, A.; ODUEYUNGBO, S.; NYAVOR, K. **Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP OES**. *Food Chem.*, 77, 439 – 447, 2002.
59. INMETRO DOQ-CGCRE-008 - março de 2003 – **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, Revisão 01, 35p., 2003.

60. INMETRO, ABNT, SBM, **Guia para a Expressão da Incerteza de medição - GUM**, Segunda Edição Brasileira do “*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*”, Edição Revisada, 1998.
61. INMETRO, CNI, SENAI, **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia – VIM**, Portaria INMETRO nº 029/1995, 3ª edição, 2000.
62. ISO 11843-1:1997. **Capability of detection - Part 1** Terms and definitions.
63. IUPAC, Compendium of Chemical Technology, 1985.
64. JENSEN, R.G. **Handbook of Milk Composition**. Ed. Academic Press, San Diego, California, 1995.
65. KANE, J.S. **Leach data vs total: which is relevant for SRMs?** *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352:209, 1995.
66. KARADJOVA, I.; GIROUSI, S.; STRATIS, I. **Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate.** *Mikrochim. Acta*, 134, 185 – 191, 2000.
67. KHAMMAS, Z. A., MARSHALL, J., LITTLEJOHN, D., OTTAWAY, J. M. E STEPHEN, S. C., **Determination of copper in milk powder by electrothermal atomic-absorption and atomic emission-spectrometry**, *Mikrochim. Acta*, 333 – 355, 1985.
68. KNAPP, G. **Decomposition of organic materials: fundamentals. II Workshop sobre métodos de decomposição de amostras**, CENA, USP, 1998.
69. KNAPP, G.; MAICHIN, B.; BAUMGARTNER, U. **Interferences in ICP OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion.** *At. Spectrosc.*, 16, 220 – 220, 1998.
70. KRACHLER, M.; IRGOLIC, K.J. *J. Trace Elements Med. Biol.* 13, 157, 1999.
71. KREBS, N.; HAMBIDGE, M.; JACOBS, M.A.; MYLER, S. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4, 227-229, 1985.
72. KRUG, F.J. **Pré-tratamento de amostras. II Workshop sobre métodos de decomposição de amostras**, CENA, USP, 1998.
73. KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M.; AMARASIRIWARADENA, C.J. **Decomposition of biological samples for inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry using an open focused microwave digestion system.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 118, 1175 – 1181, 1993.
74. KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M.; AMARASIRIWARADENA, C.J.; FONER, J.; MARTINES, L. **Comparison of sample decomposition procedures for the**

- determination of zinc in milk by inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 851 – 858, 1992.
75. KRUSHEVSKA, A.; KOTREBAL, M.; LASZTITY, A.; BARNES, R.M.; AMARASIRIWARADENA, D. **Application of tertiary amines for arsenic and selenium signal enhancement and polyatomic interference reduction in ICP-MS analysis of biological samples.** *Fresenius's J. Anal. Chem.*, 355, 793 – 800, 1996.
76. LAMOUNIER, J.A.; DANELLUZI, J.C.; VANNUCCHI, H. *J. Trp. Pediat.* 35, 31-34, 1989.
77. LI, F.S.; ROSSIPAL, E.; IRGOLIC, K.J. **Determination of selenium in human milk by hydride cold-trapping atomic absorption spectrometry and calculation of daily selenium intake,** *J. of Agric. and Food Chemistry*, 47 (8), 3265 – 3268, 1999.
78. LI, J.; YOSHINAGA, J.; SUZUKI, T.; ABE, A.; MORITA, M. **Mineral and trace-element content of human transitory milk identified with inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry.** *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 36, 65 – 74, 1990.
79. LYON, T.D.B.; FELL, G.S.; HUTTON, R.C.; EATON, A.N. *J. Anal. At. Spectrom.* 3, 265, 1988.
80. MARTINO, F.A.R.; SÁNCHEZ, M.L.F.; SANZ-MEDEL, A. **The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks.** *Anal. Chim. Acta*, 442, 191 - 200, 2001.
81. MASSON, P.; ORIGNAC, D.; VIVES, A.; PRUNET, T. **Matrix effects during trace elements analysis in plant samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with axial view configuration and ultrasonic nebulizer.** *Analysis*, 27, 813 – 820, 1999.
82. MCKINSTRY, P.J.; INDYK, H.E.; KIM, N.D. **The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).** *Food Chem.*, 65, 245 – 252, 1999.
83. MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 424p, 2000.
84. MERMET, J.M. **Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostic.** *Anal. Chim. Acta*, 250, 85, 1991.
85. MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry.** United Kingdom: Prentice Hall, 2000.

86. MINGORANCE, M.D.; LACHICA, M. **Direct determination of some trace-elements in milk by electrothermal atomic-absorption spectrometry.** *Anal. Letters*, 18, 1519 – 1530, 1985.
87. MINGORANCE, M.D.; PEREZ-VAZQUEZ, M.L.; LACHICA, M. **Microwave Digestion Methods For The Atomic Spectrometry Determination of Some Elements in Biological Samples.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 853 – 858, 1993.
88. MINISTÉRIO DO TRABALHO (Portaria nº 8). NR-7 – **Programa de controle médico de saúde ocupacional.** 86-97, 1996.
89. MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Wiley-VCH, USA, p. 35, 1998.
90. MORENO-TORRES, R.; NAVARRO, M.; RUIZ-LOPEZ, M.D.; ARTACHO, R.; LOPEZ, C. **A mineralization procedure for determining magnesium in milk.** *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 33, 397 – 400, 2000.
91. MUÑIZ, C.; SARIEGO, J.M.; GAYÓN, J.I.M.; ALONSO, A.G.; SANZ-MEDEL, J. *Anal. At. Spectrom.* 13, 283, 1998.
92. MURCIA, M.A.; VERA, A.; MARTINEZ-TOMÉ, M.; MUNOZ, A.; HENÁNDEZ-CORDOBA, M.; ORTIZ-GONZALEZ., R. **Fast determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn contents in milk and nondairy imitation milk using ICP-AES without mineralization stage.** *Lebensm. – Wiss. U. – Technol.*, 32, 175 – 179, 1999.
93. NAOZUKA, J.; SILVA, M.M.; OLIVEIRA, P.V.; OLIVEIRA, R. **Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES,** *J. Anal. At. Spectrom.*, 18, 917 – 921, 2003.
94. NAVARRO, M.S. **A implementação de rotina e seu refinamento, para a determinação de elementos terras raras em materiais geológicos por ICP OES e ICP-MS. Aplicação do caso dos granitóides de Piedade – Ibiúna (SP) e Cunhaporanga (PR),** Tese de Mestrado, IGUSP, 2004.
95. NAVEIRO, O.M.; GONZÁLEZ, R.D.; BARRERA, A.B.; COCHO, J.A.; FRAGA, J.M.; BARRERA, P.B. **Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1141 – 1151, 2005.
96. NEAS, E.; COLLINS, M. **Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice.** *The American Chemical Society*, 1988.
97. NEVILLE, M.C.; KELLER, R.; SEACAT, J.; CASEY, C.E.; ALLEN, J.C.; ARCHER, P. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 635-646, 1984.

98. NÓBREGA, J.A.; GELINAS, Y., KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M. **Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, 1243 – 1246, 1997.
99. OTTO, M. **Chemometrics – Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**, Weinheim: Wiley, 1999.
100. PLESSI, M.; BERTELLI, D.; MONZANI, A. **Determination of aluminum and zinc in infant formulas and infant foods.** *J. Food Comp. Anal.*, 10, 36 – 42, 1997.
101. POTTS, P.J. **A Handbook of Silicate Rock Analysis**. Blackie Academic & Professional, 1987.
102. RADLINGER, G.; HEUMANN, K.G. **Iodine determination in food samples using inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry.** *Food Chem.*, 70, 2221 – 2224, 1998.
103. RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análise estatística no SAEG**. Viçosa: UFV, 301p. 2001.
104. RIBEIRO, A.S.; MORETTO, A.L.; ARRUDA, M.A.Z.; CADORE, S. **Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide.** *Microchim., Acta*, 141, 149 – 155, 2003.
105. ROBBERECHT H.; BENEMARIYA, H.; DEELSTRA, H. *Biol. Trace Elem. Res.* 49, 151-159, 1995.
106. RODRIGUEZ, E.M.R.; ALAEJOS, M.S.; ROMERO, C.D. **Mineral concentrations in cow's milk from the Canary Island.** *J. Food Comp. Anal.*, 14, 419 – 430, 2001.
107. RYAN, A. **Direct analysis of milk powder on the Liberty Series II ICP AES with the axially-viewed plasma.** *ICP – 21 (Varian)*, 1 – 7, 1997.
108. SANTOS, D.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NEVES, E.F.A.; CAVALHEIRO, D.T.G.; NÓBREGA, J.A. **Analysis of inorganic constituents in milk and simulation of CFA-C reagent.** *Eclét. Quím.*, 27, 61 – 76, 2002.
109. SCHRAMEL, P.; HASSE, S. **Iodine determination in biological-materials by ICP-MS,** *Mikrochim. Acta*, 116, 205 – 209, 1994.
110. SEASHOLTZ, M.B. **Making money with chemometrics.** *Chem. Intell Lab. Syst.*, 45, 55 – 63, 1999.
111. SIIMES, M.A.; VUORI, E.; KUITUNEN, P. *Acta Paediatr. Scand.* 68, 29-31, 1979.
112. SILVA, F.V.; KAMOGAWA, M.Y.; FERREIRA, M.M.C.; NÓBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A. **Discriminação geográfica de águas minerais do Estado de São Paulo através da análise exploratória.** *Eclét. Quím.*, 27, 2002.

113. SILVA, F.V.; LOPES, G.S.; NÓBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A. **Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk.** *Spectrochim. Acta B*, 56, 1909 – 1916, 2001.
114. SILVA, F.V.; TREVISAN, C.L.; SILVA, C.S.; NOGUEIRA, A.R.; NÓBREGA, J.A. **Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations.** *Spectrochim. Acta Part B*, 57, 1905, 2002.
115. SILVA, J.C.J.; **Determinação direta de constituintes inorgânicos em leite por ICP OES: comparação crítica do desempenho analítico em configuração de tocha axial e radial, usando uma mistura de aminas terciárias (CFA-C) como solvente.** Campinas: UNICAMP, 2004. 136p. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo.
116. SILVA, J.C.J.; SANTOS, D.M.; BACCAN, N.; CADORE, S.; NÓBREGA, J.A. **Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axial configuration: interfaces with end-on gas and shear gas.** *Microchem. J.*, 77, 185, 2004.
117. SILVA, P.R.; DOREA, J.G.; BOAVENTURA, G.R. *Biol. Trace Elem. Res.*, 59, 57-62, 1997.
118. SILVESTRE, M.D.; LAGARDA, M.J.; FARRÉ, R.; MARTINEZ-COSTA, C.; BRINES, J. **Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion.** *Food Chemistry*, v. 68, 2000.
119. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, Bookman, 2002.
120. SOUZA, G.B.; CARRILHO, E.N.V.M.; OLIVEIRA, C.V.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. **Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry.** *Spectrochim. Acta B*, 57, 2195 – 2202, 2002.
121. STURUP, S.; BÜCHERT, A. **Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Fresenius's J. Anal. Chem.*, 354, 323 – 326, 1996.
122. TAME, A.; HOOBIN, D. **Direct analysis of milk powder by axially-viewed simultaneous ICP-AES.** *ICP – 26 (Varian)* 1 – 4, 1999.
123. THOMPSON, J.J. **Determination of ultratrace levels of lead in infant formula by isotope-dilution inductively-coupled plasma-mass spectrometry.** *J. A. O. A. C. Int.*, 76, 6, 1378 – 1384, 1993.

124. THOMPSON, M.; WOOD, R. **International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories**, *J. AOAC International*, 76, 4, 926 – 940, 1993.
125. TODOLI, J.L.; MERMET, J.M.; CANALS, A.; HERNANDIS, V. **Acid effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with different nebulizers operated at very low sample consumption rates**. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, 55, 1998.
126. TURAN, S., SAYGI, S.; KILIC, O. **Determination of heavy metal contents in human colostrum samples by electrothermal atomic absorption spectrophotometry**. *J. Trop. Pediatrics*, 47, 81 – 85, 2001.
127. UCHIDA, T.; ISOYAMA, H.; YAMADA, K.; OGUCHI, K.; NAKAGAWA, G. **Determination of twelve elements in botanical samples with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after leaching with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetracetic acid**. *Anal. Chim. Acta*, 256:277, 1992.
128. ULRICH, J.C. **Determinação de impurezas em compostos de urânio por meio da técnica Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Fonte de Plasma Indutivo (HR-ICP-MS)**, Dissertação de Mestrado, IPEN, São Paulo, 2001.
129. VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L.; BUYDENS, L.M.C.; DE JONG, S.; LEWI, P.J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1998.
130. VEIGA, M.A.M.S. **Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usando dietil-ditiofosfato como agente quelante**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
131. VINAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. **Determination of copper, cobalt, nickel, and manganese in baby food slurries using electrothermal atomic absorption spectrometry**. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 5789 – 5794, 2000.
132. VINAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. **Determination of aluminium and chromium in slurried baby food samples by electrothermal atomic absorption spectrometry**. *J. of AOAC International*, 84 (4), 1187 – 1193, 2001.
133. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3rd edition, Wiley-VCH, 1999.
134. WHO, Report of a Joint World Health Organization/International Atomic Energy Agency Collaborative Study, **Minor and Trace elements in breast milk**, Geneva, 1989.

135. WOLD, S.; SJÖSTROM, M. **Chemometrics, present and future success.** *Chem. Intell Lab. Syst.*, 44, 3 - 14, 1998.
136. ZHOU, C.Y.; WONG, M.K.; KOH, L.L.; WEE, Y.C. **Microwave digestion of biological samples with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetracetic acid for element determination.** *Talanta*, 43:1061, 1996.

Utilização do MMQPA, para ajuste de Curvas de Calibração de metais presentes em amostras de leite materno, analisadas por ICP-MS.

Rosilene S. Nascimento¹ (PG)*, Waldomiro B. Neto¹ (PG), Welington F. de Magalhães¹ (PQ), José Bento B. Silva¹ (PQ).

¹Departamento de Química – UFMG – Av. Antônio Carlos – 6627 – Pampulha – Belo Horizonte – MG – 31270-901
30160-030

*e-mail: rosilenequimica@yahoo.com.br

Palavras Chave: MMQO, MMQP, limites de confiança e de previsão, incertezas.

Introdução

O método de regressão mais comumente utilizado em calibração instrumental é o Método dos Mínimos Quadrados – MMQ. Existem dois tipos básicos de MMQ, que são o MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinário – e o MMQP – Método dos Mínimos Quadrados Ponderado. Cada um dos dois tipos de MMQ pode ser dividido em dois casos:

- MMQO com variância comum $\sigma^2(y_i) = \sigma^2$ conhecida
- MMQO com variância comum $\sigma^2(y_i) = \sigma^2$ desconhecida e estimada a partir do desvio padrão do ajuste ou residual s^2 .
- MMQP com variâncias $\sigma^2(y_i)$ conhecidas, que chamamos de MMQP Absoluto – MMQPA.
- MMQP com variâncias $\sigma^2(y_i)$ desconhecidas, mas com relação entre elas conhecidas, que chamamos de MMQP Relativo – MMQPR.

Resultados e Discussão

Foi determinado Ba, Ag, As, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, V, Se, Cr, Fe e Zn em leite em pó certificado, por ICP-MS (ELAN 9000, Perkin Elmer), utilizando CFA-C como reagente. Através do comportamento das variâncias das respostas instrumentais (Fig.1), observamos um comportamento heterocedástico (variâncias diferentes), e, por isso, utilizamos o MMQPA para realizar a regressão linear. O uso do MMQO, quando da presença de heterocedasticidade, causa erro sistemático proporcional a concentração do analito e erro na estimação de sua incerteza, levando à perda de rastreabilidade do resultado da medição¹.

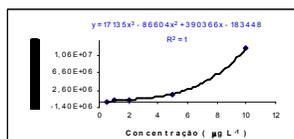


Figura 1. Incerteza da resposta instrumental para o metal ⁵¹V.

No MMQPA, utilizamos o cálculo matricial para encontrar o vetor B dos parâmetros ajustados para a curva de calibração²:

$$B = J^T V^{-1} J \quad P = B^{-1} J^T V^{-1} Y$$

onde V_y^{-1} é a matriz das variâncias e covariâncias das respostas instrumentais, J é a matriz de planejamento e

Y é a matriz das respostas instrumentais. Para avaliar a qualidade do ajuste da regressão, feita pelo MMQPA, utilizamos resíduos padronizados ou reduzidos d_i/s_i e o valor de chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2), sendo que, ambos devem ter, em módulo, valores em torno de 1, para um bom ajuste, como mostra a (Fig.2).

Para mostrar como varia a confiabilidade na curva de calibração e a precisão do resultado na concentração do analito, construímos curvas de limite de confiança do ajuste, CLCA, e curvas de limite de previsão, CLP, respectivamente tracejado e pontilhado na (Fig. 3).

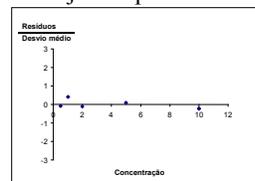


Figura 2. Avaliação da qualidade do ajuste, da regressão feita pelo MMQPA, para o metal ⁵¹V.

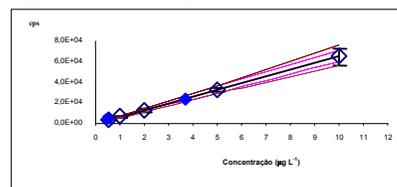


Figura 3. Curva de Calibração utilizando MMQPA, juntamente com as curvas de limite de confiança e curvas de limite de previsão do ajuste.

Conclusões

Concluimos que, o MMQPA mostrou-se adequado para o ajuste da regressão, sendo que, para a maioria dos metais estudados, o χ_{red}^2 e os resíduos padronizados estiveram em torno de 1; assim, se utilizássemos o MMQO, estaríamos embutindo um erro sistemático no processo de calibração.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e Bolsa.

¹Magalhães, W. F., *Apostila do Curso de Metrologia Química I e II*.

²Hamilton, W. C., "Statistics in Physical Science: Estimation, Hypothesis Testing and Least Squares", The Ronald Press Company, NY, 1964.



H - Otros	Construção de Curvas de Limites de Confiança e de Previsão, na calibração de metais em leite materno, por ICP-MS.
Nascimento, R.S.(1); Borges Neto, W.(1); Froes, R.E.S.(1); Magalhães, W.F.(1); Silva, J.B.B(1). 1- Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) MG. robertafroes@hotmail.com Resumen Este trabalho apresenta a aplicação de curvas de limites de confiança e de previsão, na calibração de metais (Ba, Ag, As, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, V, Se, Cr, Fe e Zn) em leite materno, utilizando ICP-MS. O objetivo deste trabalho foi a construção de curvas de limites de confiança, para indicar a região onde devemos encontrar os valores da variável dependente usados na calibração, para um dado nível da confiança; e a construção de curvas de limites de previsão, para indicar a região onde devemos encontrar os valores da variável dependente, para um dado nível da confiança, no caso de refazermos uma nova medição da resposta instrumental, para amostras reais, juntamente com a curva de calibração. Para os ensaios, utilizou-se amostra de leite em pó certificado, NIST SRM 1846 e como reagente, CFA-C. Através do comportamento das variâncias das respostas instrumentais, observamos um comportamento heterocedástico (variâncias diferentes), e, por isso, utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ponderado Absoluto, para a regressão linear. Utilizando material certificado, avaliamos a exatidão do método proposto, utilizando o teste t-pareado, onde os resultados obtidos foram estatisticamente iguais aos valores certificados, garantindo assim, a rastreabilidade dos resultados analíticos. A construção das curvas de limites de confiança e de previsão demonstrou-se adequada para avaliar a confiabilidade na curva de calibração e a precisão do resultado na concentração do analito.	
Referencias *“Traceability in Chemical Measurement – A Guide to Achieving Comparable Results in Chemical Measurement”, EURACHEM/CITAC Guide, Voting Draft, March 2003. *Hamilton, W. C., “Statistics in Physical Science: Estimation, Hypothesis Testing and Least Squares”, The Ronald Press Company, NY, 1964. *Nóbrega, J. A.; Gélinas, Y.; Krushevska, A.; Barnes, R. M. J. Anal. At. Spectrom., 1997, v.12, 1243-1246.	

DETERMINAÇÃO DE FERRO EM LEITE MATERNO, COM ALTA SENSIBILIDADE, UTILIZANDO GF AAS E OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

*Rosilene S. Nascimento¹ (PG), Henrique J. F. Fabrino¹ (PG), Waldomiro B. Neto¹ (PQ), Denise B. C. Mendes² (PQ), José B. B. da Silva¹ (PQ).

rosilenequimica@yahoo.com.br

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

² Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte - MG.

Introdução

O leite materno constitui-se na única fonte de nutrientes durante os primeiros meses de vida da criança e conseqüentemente, sua composição elementar é de fundamental importância para o crescimento infantil. O ferro no leite materno é ativo numa variedade de metaloenzimas envolvidas em reações de redox com oxigênio tais como superóxido dismutase e citocromo oxidase. Sua extensão no leite humano é de 0,2 a 0,8 mg L⁻¹. Não foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo a determinação de Fe em leite materno por GFAAS.

Experimental

Inicialmente testou-se modificadores químicos e o não uso de modificador. Foram selecionados os dois melhores (Ru e Zr permanentes) sendo que, o não uso de modificador resultou em: baixa sensibilidade, incompleta degradação da matriz e baixo tempo de vida útil do tubo. Na otimização foram construídos planejamentos fatorial 2³ e composto central (CCD). Para as análises, as amostras de leite materno foram apenas diluídas 1:1 com água deionizada Milli-Q, sem a necessidade de digestão prévia da amostra. A calibração foi realizada utilizando ajuste de matriz (10 a 100 µg L⁻¹). Para avaliar a exatidão do método proposto, foram realizados estudos de recuperação utilizando material de referência certificado de leite em pó, NIST SRM 1846 Infant Formula. Foram analisadas cinco amostras de leite materno de cinco mães.

Resultados e Discussão

Após realizar o CCD, as condições ótimas foram: Ru permanente com plataforma, temperatura de pirólise de 1270 °C e temperatura de atomização de 2610 °C (figura 1). O tempo de secagem da matriz também foi

otimizado para evitar borbulhamento a altas temperaturas e perda do analito, que foi de 2 minutos. A massa característica foi de 0,88 ± 0,44 pg sendo que a massa característica recomendada é de 5,0 pg, demonstrando a alta sensibilidade do método proposto.

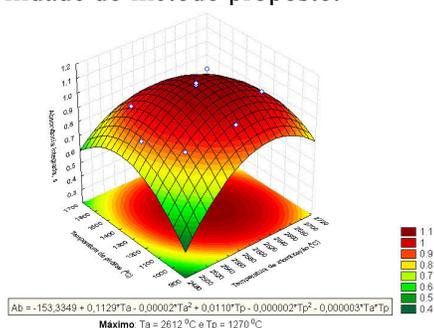


Figura 1. Superfície de resposta do Planejamento Composto Central para Fe em leite materno.

O LD e o LQ para determinação de Fe em leite materno foram de 2,26 µg L⁻¹ e 7,53 µg L⁻¹. Determinando-se, com o método proposto, amostra certificada no NIST 1846 (Infant formula), o resultado foi concordante com o certificado (a 95% de probabilidade). Foram analisadas 5 amostras de leite materno e as concentrações de Fe obtidas foram de 0,170 a 0,187 mg L⁻¹.

Conclusões

O uso de GF AAS usando modificação permanente e aliado a otimização multivariada foram essenciais para alta sensibilidade do método. A recuperação, limites de detecção e quantificação e exatidão mostraram-se adequados.

Agradecimentos

Ao CNPq, a FAPEMIG e a Maternidade Odete Valadares.

Data: Fri, 1 Feb 2008 16:10:27 -0200
Assunto:En:[Spam] Acknowledge receipt of Manuscript
De: "bentojb" <bentojb@terra.com.br>
Para: "tagowbn" <tagowbn@gmail.com>, "rosilenequimica"
<rosilenequimica@yahoo.com.br>
Cc: 🌐 "silvajcj" <silvajcj@yahoo.com.br>

De: annelieselust@aol.com
Para: bentojb@terra.com.br
Cópia:
Data: Fri, 01 Feb 2008 11:54:41 -0500
Assunto: [Spam] Acknowledge receipt of Manuscript

Dear Jose,

Thank you for submitting your latest work for publication in Atomic Spectroscopy. I will send it out for review immediately and contact you when I am in receipt of the reviews.

With kindest regards,
Anneliese

-----Original Message-----

From: bentojb <bentojb@terra.com.br>
To: AnnelieseLust@aol.com
Cc: tagowbn <tagowbn@ufmg.br>; rosilenequimica <rosilenequimica@yahoo.com.br>
Sent: Fri, 1 Feb 2008 9:33 am
Subject: Manuscript submission

Dear Annelise,

Enclose I am submitting a new manuscript intituled "Determination of trace elements in Brazilian human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry

and microwave-assisted digestion" made in coperation with the Odete Valadares

Maternity to the atomic spectroscopy to try to publish as a new article,

with best regards,

Prof. José Bento - Chemical Department - Federal University of Minas Gerais,

Brazil.

Determination of trace elements in Brazilian human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry and microwave-assisted digestion

Rosilene S. Nascimento^a, Denise B. C. Mendes^c, Judith Maria Gomes Matos^b, Júlio C. J. Silva^b, Virgínia S. T. Ciminelli^b, Waldomiro B. Neto^a, José Bento B. Silva^{a*}.

^a**Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil**

^b**Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil**

^c**Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte, MG, Brazil**

***corresponding author: Prof. Dr. José Bento Borba da Silva –**

phone: +55 31 3499 5708, fax: + 55 31 3499 5700, e-mail: bentojb@terra.com.br

ABSTRACT

A fast procedure to determine ²⁷Al, ⁵³Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁷Fe, ⁶⁰Ni, ⁶⁵Cu, ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁷⁸Se, ⁸²Se, ¹¹²Cd, ¹¹⁴Cd, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁸Pb, ¹³⁸Ba, ⁵¹V, ⁵⁹Co and ⁷⁵As in Brazilian human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is proposed. Mature and colostrum human milk samples were mineralized using closed-pressurized and high-performance microwave digestion oven. Aqueous calibration was performed with an r^2 higher than 0.999 for all isotopes investigated. A reference material, Infant Formula (NIST SRM 1846) was analyzed to test the accuracy of the proposed methodology. In addition, recovery assays were carried out to check the interference effects. Recovery rates ranged between 80.8 and 110.9%. The precision of the method expressed as a relative standard deviation (R.S.D.) was better than 3.4% for all analytes investigated. Precision and accuracy of the method show that it is useful for the intended purpose.