

PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE FÍGADO BOVINO E ESTUDO DE MICRO HOMOGENEIDADE PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA E AMOSTRAGEM DIRETA DE SÓLIDO

Cassiana Seimi Nomura e Pedro Vitoriano Oliveira*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP

Recebido em 27/1/05; aceito em 3/8/05; publicado na web em 20/1/06

BOVINE LIVER SAMPLE PREPARATION AND MICRO-HOMOGENEITY STUDY FOR Cd AND Pb DETERMINATION BY SOLID SAMPLING ELECTROTHERMAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY. This work describes a systematic study for bovine liver sample preparation for Cd and Pb determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. Samples were prepared using different procedures: (1) drying in a household microwave oven followed by drying in a stove at 60 °C until constant mass, and (2) freeze-drying. Ball and cryogenic mills were used for grinding. Particle size, sample size and micro sample homogeneity were investigated. All prepared samples showed good homogeneity ($H_c < 10$) even for low sample mass, but samples dried in a microwave oven/stove and ground in a ball mill presented the best homogeneity.

Keywords: solid sampling atomic absorption; homogeneity; bovine liver

INTRODUÇÃO

A determinação de elementos em nível de traços em amostras biológicas como fluídos^{1,2}, tecidos³ e órgãos⁴ é importante porque gera informações que auxiliam na resolução de problemas relacionados a estudos nutricionais, toxicológicos e bioquímicos. Em certos casos, a necessidade de informações sobre a ocorrência, distribuição e forma química de elementos nos materiais biológicos tem incentivado o desenvolvimento de procedimentos analíticos visando, além da determinação total, a especificação química⁵.

Uma das técnicas mais recomendadas para determinação de elementos traços em materiais biológicos é a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). As altas seletividade e sensibilidade, simplicidade nas operações e automação promovidas pelo amostrador automático, o que dispensa a atenção constante do analista, são características importantes que merecem destaque. Na maioria dos métodos, a preparação da amostra envolve apenas diluição em um solvente adequado e introdução direta no tubo de grafite.

A possibilidade de amostragem direta de sólidos (SS-ETAAS) ampliou o universo de aplicações da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, possibilitando a análise de pequenas massas de amostra, em intervalos que podem variar de 40 - 1000 μg ^{3,4,6-8}, tornando-a muito conveniente quando a disponibilidade de amostra é limitada, por ex., em casos de biópsia de órgãos e tecidos^{3,4}, em algumas investigações voltadas à ciência forense^{7,8} e em estudos envolvendo a avaliação de homogeneidade de materiais⁹⁻¹². No entanto, a obtenção de resultados precisos e exatos utilizando pequenas massas de amostras não é uma tarefa trivial, uma vez que massas inferiores a 100 mg podem comprometer a representatividade, não somente pelos erros associados às pesagens como também pela falta de homogeneidade de certos materiais para alguns elementos¹³. Em geral, a variação dos resultados tende a piorar com a diminuição da massa amostrada.

Os materiais de referência certificados (MRC) disponíveis atualmente garantem a representatividade para massas de amostras acima de 100 ou 500 mg ⁹, as quais são muito superiores àquelas praticadas em SS-ETAAS. Porém, para alguns métodos de determinação elementar com amostragem direta de sólido, o uso de MRC é necessário para a calibração do equipamento e indispensável para testes de validação, mesmo não sendo recomendados para valores tão baixos de amostragem. Considerando essa limitação dos MRC para pequenas massas, a avaliação de procedimentos de preparação de amostras para determinações elementares em SS-ETAAS torna-se muito importante.

Nesse trabalho foram avaliados diferentes procedimentos de preparação de amostra de fígado bovino para determinação de Cd e Pb por SS-ETAAS. Os principais parâmetros estudados foram secagem, moagem, avaliação do tamanho de partículas, massa de amostra e sua relação com a homogeneidade. A homogeneidade das amostras foi avaliada para cada um dos procedimentos de secagem e moagem utilizados. A maneira de garantir a homogeneidade da amostra foi pelo uso de procedimentos de moagem eficientes.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Todas as determinações foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica modelo ZEEnit® 60 (AnalytikjenaAG, Jena, Alemanha) equipado com corretor de fundo transversal baseado no efeito Zeeman, atomizador recoberto com grafite pirolítico e aquecimento transversal, e plataforma de grafite pirolítico do tipo "boat". A transferência da plataforma da microbalança (Auto Balance AD-4, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) para o interior do tubo de grafite foi feita com um amostrador mecânico de sólidos (SSA-6 Z, AnalytikjenaAG). O espectrômetro foi operado com lâmpadas de cátodo oco de Cd ($\lambda = 228,8 \text{ nm}$, $i = 4,0 \text{ mA}$, resolução espectral = 0,8 nm) e Pb ($\lambda = 217,0 \text{ nm}$, $i = 4,0 \text{ mA}$, resolução espectral = 0,5 nm). Todas as medidas foram baseadas nos valores de absorbância integrada. Argônio 99,998%

*e-mail: pvolivei@iq.usp.br

(v/v) (Air Liquide Brasil, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás protetor e de purga.

A secagem das amostras foi feita em forno de microondas doméstico (Cônsul – 300 W), estufa (Fanen, 300 °C), e liofilizador (E – C Micro Módulo).

As amostras foram moídas em moinho criogênico Spex 6750 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, USA) e moinho de bolas 8000 M Spex CertPrep (Spex, Metuchen, NJ, USA), equipado com frascos e bolas de carbeto de tungstênio.

A medida do tamanho de partícula foi feita em analisador de partículas (Malvern Instruments, Malvern, UK) com unidade automatizada de dispersão de amostra MS-17.

Para as determinações de Cd e Pb em amostras digeridas foi utilizado o amostrador automático (AS 52, AnalytikJenaAG) do espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica. As amostras foram previamente digeridas em forno de microondas com cavidade, modelo Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Áustria).

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada de alta pureza (18 MΩ cm), obtida pelo sistema de ultra-purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Foram utilizados reagentes de grau analítico como o H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e HNO₃ (Synth, Diadema, SP, Brasil), sendo esse último purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição em destiladores de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Soluções analíticas de referência de Cd (II) e Pb (II) em meio de 0,1% v/v de HNO₃ foram preparadas após sucessivas diluições das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹ CdCl₂ e Pb(NO₃)₂ (Titrisol, Merck).

Os modificadores químicos usados foram preparados por diluição de soluções contendo 1000 mg L⁻¹ de Na₂WO₄.2H₂O (Merck), RhCl₆ (Sigma, St. Louis, MO, USA), NH₄H₂PO₄ (Merck), Pd(NO₃)₂ (Merck) e Mg(NO₃)₂ (Merck). Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno descontaminados (Nalge Company, Rochester, NY, USA).

Procedimento

Descontaminação dos materiais

Toda a vidraria e frascos de polipropileno utilizados para preparo e armazenamento das amostras e soluções analíticas de referência foram lavados com detergente, enxaguados com água destilada, preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v durante 24 h e, nova-

mente, enxaguados com água destilada e desionizada. Após a descontaminação, os balões volumétricos e frascos para armazenamento das soluções analíticas de referência foram preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v e somente antes da utilização esses materiais foram enxaguados com água bi-deionizada.

Programa de aquecimento

As determinações de Cd e Pb por ETAAS, após digestão da amostra, e por SS-ETAAS foram feitas seguindo os programas de aquecimento apresentados na Tabela 1. Esses programas foram otimizados (temperaturas e tempos) a partir do estudo de temperaturas de pirólise e atomização, executados na ausência e presença de modificadores químicos.

Para a determinação de Cd e Pb por ETAAS, com amostragem de solução, foram usados os modificadores químicos 5 µg Pd + 3 µg Mg e 25 µg NH₄H₂PO₄, respectivamente. A determinação direta de Cd por SS-ETAAS foi feita utilizando a mistura 250 µg W + 200 µg Rh como modificador químico permanente¹⁴. No caso do Pb, a determinação direta foi possível na ausência de modificador químico.

As calibrações do espectrômetro, tanto para as determinações em soluções aquosas como com amostragem direta do sólido, foram feitas utilizando 10 µL de solução contendo 1 a 8 µg L⁻¹ de Cd e 2,5 a 20 µg L⁻¹ de Pb em 0,1% v/v HNO₃.

Preparo da amostra

Uma peça de fígado bovino (~ 5 kg), adquirido em um açougue da cidade de São Paulo, foi lavada com água Milli-Q e a membrana protetora retirada com lâmina de aço inoxidável. Em seguida, o fígado foi quarterado seguindo procedimento indicado na literatura¹⁵.

Cerca de ¼ desse material foi liofilizado, durante 48 h e outro ¼ seco, inicialmente, em forno de microondas de uso doméstico (30 min, 10% de potência – 30 W) seguido de secagem em estufa à 60 °C até peso constante (aproximadamente 48 h). Tanto o material liofilizado como o seco em microondas/estufa foi moído em moinho de bolas com dois diferentes tempos de moagem (5 e 30 min) e em moinho criogênico com um único tempo de moagem (6 min), seguindo três ciclos do programa de moagem: 5 min de pré-congelamento, 2 min de moagem e 1 min de congelamento.

Uma amostra de fígado bovino certificado (NIST 1577b) foi utilizada para validação dos métodos desenvolvidos e para avaliar a homogeneidade de pequenas massas de amostras.

Anteriormente às determinações, aproximadamente 200 mg de amostra e do MRC foram digeridas em forno de microondas com cavidade, usando mistura oxidante diluída¹⁶ (1 mL HNO₃ + 2 mL H₂O₂ + 3 mL H₂O) e o seguinte programa de aquecimento (tempe-

Tabela 1. Programas de aquecimento para determinação de Cd e Pb em fígado bovino

Etapa	Programa de Aquecimento para SS-ETAAS			
	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)	Vazão de Argônio (L min ⁻¹)
Secagem	130	10	10	1,0
Pirólise	600 ^a , 700 ^b	100	40	1,0
Atomização	1700 ^a , 2000 ^b	1700 ^a , 2000 ^b	4 ^a , 3 ^b	0
Limpeza	2200	1200	3	1,0
Programa de Aquecimento para ETAAS				
Secagem I	100	10	10	1,0
Secagem II	130	10	10	1,0
Pirólise	500 ^a , 600 ^b	100	15	1,0
Atomização	1600 ^a , 1800 ^b	1600 ^a , 1800 ^b	4	0
Limpeza	2200	1200	4	1,0

^a Cd, ^b Pb

ratura/°C; rampa/min; patamar/min): etapa 1: 140, 5, 1; etapa 2: 180, 8, 2; etapa 3: 220, 4, 10.

Estudo da homogeneidade da amostra

O estudo da homogeneidade do material foi feito por meio da determinação de Cd e Pb em diferentes massas das amostras preparadas pelos procedimentos propostos e no material de referência certificado. Devido à dificuldade de pesar repetidas massas de amostras, a precisão e exatidão dos resultados foram avaliadas em diferentes intervalos de massas: 1 (1 a 20 µg), 2 (21 a 30 µg), 3 (31 a 40 µg), 4 (41 a 50 µg), 5 (51 a 60 µg), 6 (61 a 70 µg), 7 (71 a 80 µg), 8 (81 a 90 µg), 9 (91 a 100 µg), 10 (101 a 120 µg), 11 (121 a 200 µg) para o Cd, e 1 (1 a 50 µg), 2 (51 a 100 µg), 3 (101 a 200 µg), 4 (201 a 400 µg), 5 (401 a 600 µg), 6 (601 a 800 µg), 7 (801 a 1000 µg), 8 (1001 a 1200 µg), 9 (1201 a 1400 µg) para o Pb.

Para cada intervalo de massas foram feitas cinco determinações e os resultados foram avaliados quanto à exatidão e precisão. Os valores de concentração indicados nos gráficos (linha cheia) com os respectivos desvios padrão (linha tracejada) foram obtidos após as análises de Cd e Pb por ETAAS, com digestão das amostras.

RESULTADOS

Preparo das amostras

As primeiras etapas envolvidas no pré-tratamento de amostras, visando análise direta de sólidos por técnicas espectroscópicas, consistem na secagem e moagem do material. Em geral, os materiais com alto teor de água, como os tecidos biológicos, necessitam de uma etapa de secagem e moagem antes da determinação dos elementos de interesse. Considerando a análise direta de sólidos por SS-ETAAS, essas etapas tornam-se muito mais críticas devido à necessidade de garantir a homogeneidade, mesmo para massas diminutas de amostra, freqüentemente inferiores a 1000 µg^{17,18}.

Entre os dois procedimentos adotados para secagem, o uso de forno de microondas combinado com estufa parece ser mais susceptível às perdas de elementos por volatilização, apesar de estudos da literatura mostrarem que a volatilização de compostos também pode ocorrer durante a liofilização¹⁹. No entanto, perdas de Cd e Pb não foram observadas em nenhuma das amostras preparadas pelos dois procedimentos adotados de secagem e moagem.

A moagem das amostras foi feita utilizando moinhos de bolas e criogênico. Na moagem com moinho de bolas o processo de cominuição se dá devido ao impacto das bolas com a amostra. Geralmente, o atrito das bolas gera uma ligeira elevação da temperatura, que é maior com o tempo de moagem e que pode causar perdas dos analitos. Lima e colaboradores²⁰ verificaram que o aquecimento gerado, mesmo durante longos tempos de moagem, não é suficiente para causar perdas de alguns elementos com características voláteis.

A moagem criogênica tem sido recomendada para amostras com alto teor de fibras e gorduras. O congelamento rápido gera falhas na estrutura cristalina dos materiais tornando-os mais quebradiços, facilitando a moagem²¹. Por ocorrer na temperatura de liquefação do nitrogênio (-196 °C) o risco de eventuais perdas de compostos por volatilização é inexistente.

O tamanho médio das partículas de fígado seco em forno de microondas combinado com estufa ou liofilizado e moído em moinho de bolas diminuiu com o aumento do tempo de moagem. Para os dois procedimentos de secagem considerados, a distribuição do tamanho de partículas mostrou uma redução em torno de 30% no tamanho médio das partículas, quando o tempo de moagem variou de 5 para 30 min. As amostras de fígado seco em forno de microondas combinado com estufa e moídas no moinho de bolas, durante 5 e 30 min, apresentaram

diâmetros médios de 130 e 90 µm, respectivamente. Por outro lado, a amostra de fígado liofilizada e também moída no moinho de bolas, durante 5 min, apresentou diâmetro médio de 90 µm.

As amostras de fígado moídas no moinho criogênico apresentaram diâmetros médios de partículas em torno de 64 µm, independente do tipo de secagem utilizado.

Determinação de Cd e Pb em fígado por SS-ETAAS e ETAAS

O programa de aquecimento para a determinação de Cd e Pb em SS-ETAAS foi otimizado com amostra de fígado certificado (NIST 1577b). Na ausência de modificador químico, as temperaturas de pirólise de Cd foram de 400 °C em solução aquosa e 600 °C com amostragem direta do sólido. O uso do modificador químico permanente (250 µg W + 200 Rh) foi indispensável porque aumentou a estabilidade térmica do Cd na solução aquosa para 600 °C, enquanto que no sólido permaneceu 600 °C. Esses dados indicam que o modificador permanente não foi efetivo na estabilização térmica das espécies de Cd presentes no fígado bovino. No entanto, a estabilização térmica do Cd em solução aquosa, igualando-se àquela obtida no sólido, permitiu a determinação direta utilizando calibração aquosa. Quando 400 °C foi usada na pirólise, o sinal de fundo gerado pela vaporização da matriz do sólido foi muito elevado, comprometendo o sinal analítico do Cd. Por esse motivo, o modificador químico permanente 250 µg W + 200 µg Rh foi adotado para a determinação direta de Cd nas amostras de fígado. O acréscimo de temperatura (200 °C) foi indispensável para eliminação de parte dos concomitantes, minimizando possíveis interferências espectrais.

A temperatura de pirólise para o Pb, na ausência de modificador químico, foi de 700 °C tanto em solução aquosa como para amostragem direta do sólido. Como observado para o Cd, a ação do modificador químico permanente sobre o Pb na amostra de fígado bovino também não foi perceptível. No entanto, essa temperatura de pirólise foi alta o suficiente para eliminar parte dos concomitantes, evitando interferências espectrais. Nesse caso, a determinação direta de Pb foi feita com calibração aquosa e na ausência de modificador químico.

Os resultados da determinação de Cd e Pb no material de referência certificado de fígado bovino e nas amostras de fígado preparadas pelos diferentes procedimentos de secagem e moagem propostos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. As concentrações de Cd e Pb encontradas pelos métodos SS-ETAAS e ETAAS foram submetidas ao teste-t pareado e os resultados obtidos, quando comparados entre si e com os valores certificados, foram concordantes em um nível de confiança de 95%. Resultados semelhantes, com o mesmo nível de confiança, foram obtidos para as amostras preparadas com os diferentes procedimentos de secagem e moagem (Tabela 3), indicando que não ocorreram perdas dos elementos durante as etapas de secagem e moagem.

As massas características, baseadas nas absorvâncias integradas e calculadas a partir das equações das retas, foram 1,2 pg para Cd e 7,3 pg para Pb. Os limites de detecção foram calculados como sendo

Tabela 2. Resultados das determinações de Cd e Pb (mg kg⁻¹) em fígado bovino certificado por SS-ETAAS e ETAAS

	Material de Referência Certificado - NIST 1577b		
	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	SS-ETAAS (mg kg ⁻¹)	ETAAS (mg kg ⁻¹)
Cd	0,50±0,03	0,50 ± 0,05	0,45 ± 0,08
Pb	0,129 ± 0,003 ^b	0,147±0,009	< L.D.*

*L.D._{Pb} = 0,09 µg g⁻¹

Tabela 3. Determinação de Cd e Pb nas amostras de fígado bovino após secagem em forno de microondas combinado com estufa e moagem em moinho de bolas (I) ou em moinho criogênico (II), e liofilização e moagem em moinho de bolas (III) ou em moinho criogênico (IV)

Pré-tratamento	Cd (mg kg ⁻¹)		Pb (mg kg ⁻¹)	
	SS-ETAAS*	ETAAS	SS-ETAAS**	ETAAS
I	0,074 ± 0,001	0,075 ± 0,002	0,198 ± 0,010	0,194 ± 0,011
II	0,076 ± 0,006	0,070 ± 0,001	0,220 ± 0,028	0,210 ± 0,005
III	0,071 ± 0,002	0,070 ± 0,002	0,240 ± 0,018	0,222 ± 0,001
IV	0,064 ± 0,002	0,074 ± 0,002	0,248 ± 0,006	0,218 ± 0,006

*massa de amostra > 70 µg; **massa de amostra > 800 µg

três vezes os desvios padrão de 20 medidas consecutivas da plataforma sem amostra, sendo que a mesma foi retirada e introduzida no tubo a cada repetição. Os valores obtidos foram 1,0 pg para Cd e 15 pg para Pb. Os intervalos de massas de fígado considerados para a obtenção desses resultados foram de 40 a 120 µg para a determinação de Cd e de 400 a 1400 µg para a determinação de Pb.

Micro homogeneidade do material

Nas determinações com amostragem direta de sólidos por SS-ETAAS é importante considerar a massa mínima representativa, que é a menor massa que pode ser utilizada de modo a obter resultados precisos e exatos. A massa mínima representativa (M) pode ser calculada utilizando a Equação proposta por Pauwels e colaboradores²²: $M = (k_2 \cdot dp / i)^2 \cdot m$, na qual, M = massa mínima representativa, k_2 = fator de distribuição, dp = desvio padrão relativo experimental, i =

incerteza associada ao valor certificado, m = massa de amostra. Outro parâmetro considerado para a escolha da massa mínima foi o fator de homogeneidade (H_e). O fator de homogeneidade, proposto por Kurfürst e colaboradores²³, é uma maneira simples para caracterizar amostras sólidas quanto à homogeneidade. Está relacionado com a massa da amostra (mg) e o coeficiente de variação das medidas (RSD), o qual pode ser calculado segundo a Equação $H_e = (RSD) \cdot m^{1/2}$. Segundo os autores, materiais com $H_e < 10$ são considerados homogêneos. Para cada procedimento de secagem e moagem foi feito um estudo sistemático para encontrar a massa mínima da amostra que respeitasse a precisão, exatidão e o fator de homogeneidade desejado ($H_e < 10$).

Os gráficos de concentração de Cd e Pb em função da massa amostrada, representada em intervalos de massa, estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Em cada um dos casos, os valores das concentrações (linhas cheias) e desvios padrão (linhas pontilhadas) para Cd e Pb foram determinados por ETAAS, utilizando soluções

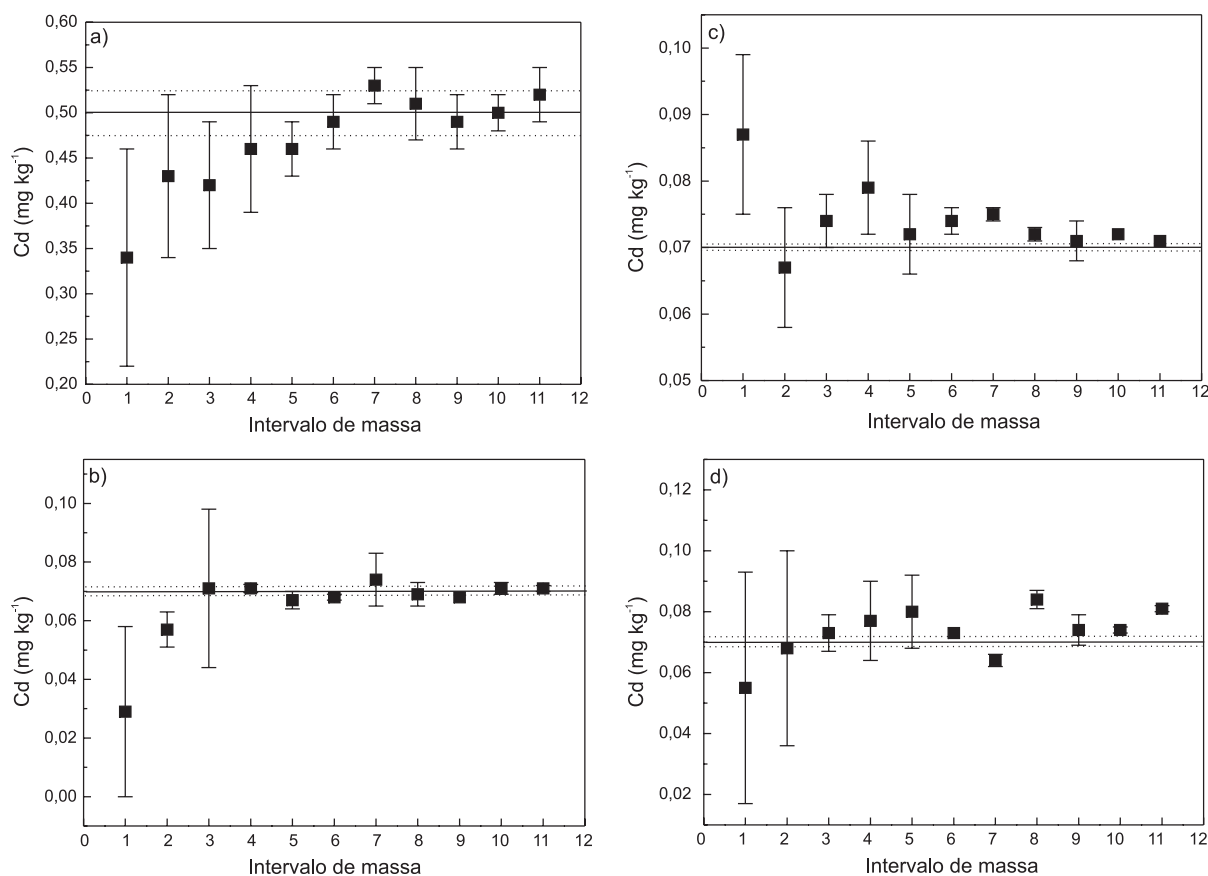


Figura 1. Estudo de homogeneidade para Cd em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bola por 30 min e (d) seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho criogênico por 2 min

aquosas e amostras digeridas em forno de microondas em frasco fechado: MRC (Tabela 2) e as amostras de fígado preparadas por diferentes procedimentos de secagem e moagem (Tabela 3). As determinações com soluções aquosas foram feitas com massas digeridas superiores a 250 mg (massa mínima recomendada para o material de referência certificado de fígado NIST 1577b).

Na avaliação das figuras pode-se verificar que quanto menor a massa, pior a exatidão e a precisão dos resultados (Figuras 1 e 2), comprovando a afirmação previamente feita por Pauwels e colaboradores²².

A determinação de Cd (Figura 1a) na amostra de fígado certificado apresentou $H_e < 10$ mesmo quando massas em torno de 20 μg foram amostradas, indicando boa homogeneidade do material. Calculando-se a massa mínima representativa conforme a Equação de Pauwels¹⁴, o valor encontrado foi de 1,17 mg. No entanto, na Figura 1a pode-se observar que resultados exatos, com valor de RSD < 8%, podem ser obtidos utilizando-se massa mínima (70 μg) muito menor que aquela encontrada teoricamente.

Os valores de H_e encontrados para Pb no fígado certificado foram superiores a 10, mesmo para massas em torno de 1400 μg . Esses resultados indicam que o material não apresenta uma boa homogeneidade para Pb, dificultando microanálises por SS-ETAAS. O certificado de análise desse material, fornecido pelo NIST, indica 250 mg como a massa mínima de amostra que deve ser utilizada para garantir o valor certificado. Para a determinação do Pb, 11% foi o menor valor de RSD obtido para massa de 800 μg .

Os resultados das determinações de Cd nos diferentes intervalos de massas das amostras de fígado, seco em forno de microondas

combinado com estufa e moídas em moinho de bolas (Figura 1b) ou criogênico (Figura 1d) seguiram uma mesma tendência. Em geral, foram observados desvios negativos nas concentrações de Cd para massas de amostra muito pequenas (< 40 μg). Porém, pode-se considerar o fígado seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho de bolas (Figura 1b) mais homogêneo. Nesse caso, os resultados concordaram em um nível de confiança de 95% (teste t-Student), para massas de amostras acima de 40 μg . Para o fígado liofilizado e moído em moinho de bolas (Figura 1c) foram observados elevados desvios padrão em cada intervalo. Esses desvios tornam-se menores e mais próximos do intervalo estabelecido quando massas de amostra superiores a 90 μg são utilizadas. Apesar do fator de homogeneidade encontrado para Cd ter sido inferior a 10, para todos os intervalos de massa considerados, massas muito pequenas geraram resultados imprecisos e inexatos.

Em geral, as massas mínimas de fígado necessárias para determinação de Pb foram maiores que aquelas observadas para o Cd. A menor sensibilidade do Pb em ETAAS, comparado com o Cd, é um dos fatores que deve ser considerado para justificar essas massas maiores. Comparando-se os resultados obtidos para os materiais preparados no laboratório, observa-se que o comportamento das amostras secas em forno de microondas combinado com estufa (Figuras 2b e 2d) também seguiu uma mesma tendência, independente do procedimento de moagem utilizado. Nessas amostras, os desvios padrão foram superiores a 25%, quando massas de amostras inferiores a 400 μg foram utilizadas. Para essas amostras, $H_e < 10$ foram observados para massas superiores a 400 μg (Figura 2b e 2d).

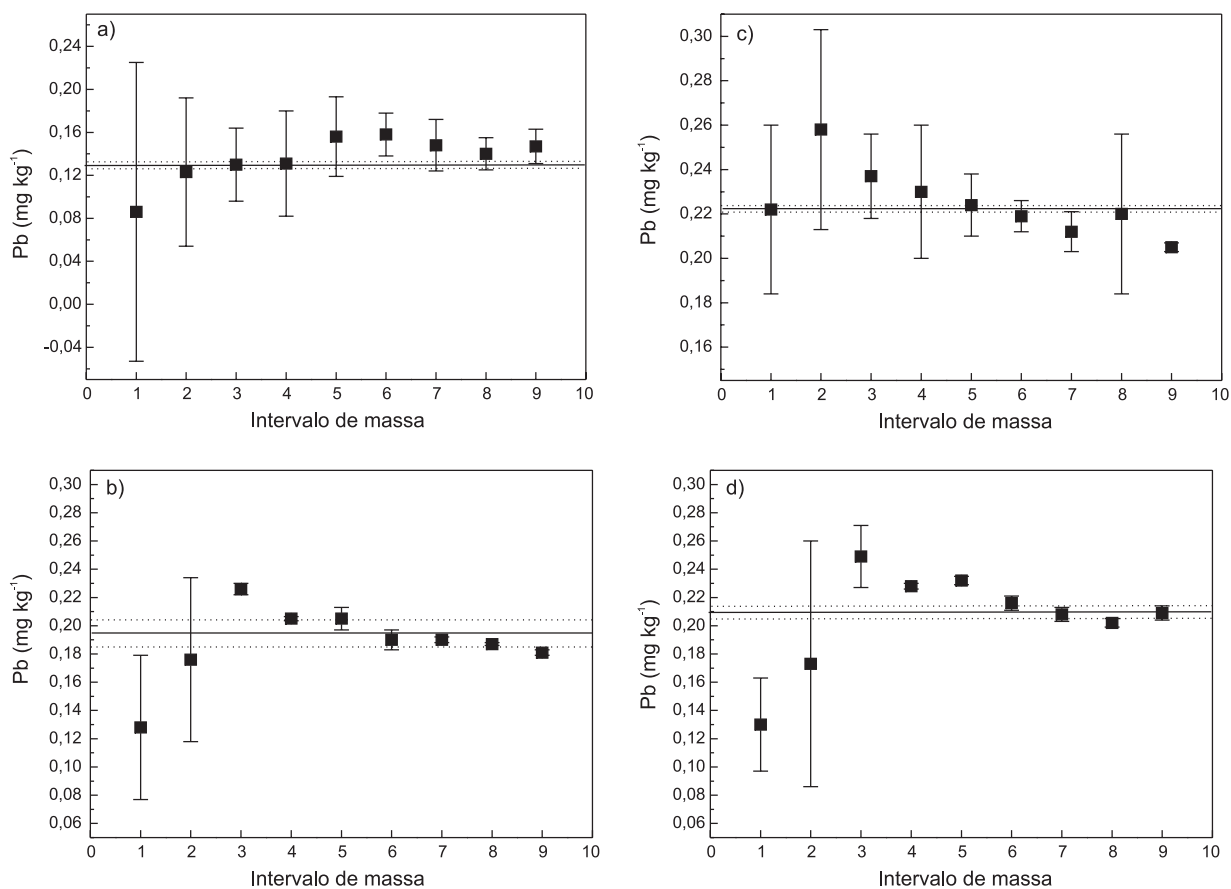


Figura 2. Estudo de homogeneidade para Pb em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bola por 30 min; e (d) seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho criogênico por 2 min

O perfil do gráfico observado para Pb na amostra liofilizada (Figura 2c) foi muito semelhante àquele observado para o MRC (Figura 2a), cujo preparo também utiliza a liofilização para secagem. Nesse caso, resultados dentro do nível de confiança (95%) foram obtidos somente quando massas superiores a 600 µg foram analisadas.

CONCLUSÃO

As amostras de fígado moídas no moinho criogênico apresentaram diâmetros médios de partículas em torno de 64 µm, independente do tipo de secagem utilizado, indicando que o congelamento, seja durante o processo de secagem (liofilização) ou durante o processo de moagem (criogenia), facilita a moagem, proporcionando menores tamanhos de partículas.

As amostras de fígado bovino, preparadas pelos diferentes procedimentos de secagem e moagem, apresentaram boa homogeneidade para Cd e Pb ($H_e < 10$), mesmo para massas inferiores a 1000 µg, como aquelas praticadas nas microanálises por SS-ETAAS. O estudo de micro homogeneidade mostrou que todos os procedimentos utilizados geraram resultados precisos e exatos para Cd e Pb. Porém, com fígado seco em forno de microondas combinado com estufa e moído em moinho de bolas (30 min) foram possíveis amostragens de 40 µg de amostra para determinação de Cd e 400 µg para determinação de Pb.

Embora o material certificado (NIST 1577b) tenha a homogeneidade garantida somente para massas superiores a 250 mg, foi possível verificar que massas de, aproximadamente, 60 µg podem ser utilizadas para determinação do Cd. No entanto, devido às baixas concentrações do Pb no fígado certificado, massas inferiores a 1400 µg não apresentaram resultados satisfatórios em termos de precisão e exatidão.

Os resultados obtidos com os métodos de preparação de amostra utilizados no trabalho indicaram a possibilidade de produzir fígado bovino de referência para determinação de Cd e Pb por SS-ETAAS.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro. Os agradecimentos ainda se estendem ao Prof. F. J. Krug (CENA/USP), ao Prof. J. A.

Nóbrega do (DQ/UFSCar) e à Dra. A. R. A. Nogueira (EMBRAPA/São Carlos) pelo empréstimo dos moinhos criogênico, de bolas e liofilizador. C. S. Nomura agradece à FAPESP e P. V. Oliveira, ao CNPq, pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Correia, P. R. M.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1519.
2. Correia, P. R. M.; Oliveira, P. V.; *At. Spectrosc.* **2004**, *24*, 222.
3. Herber, R. F. M.; Roelofsen, A. M.; Roelfzema, W. H.; Peere-Stegeman, J. H. J. C.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1985**, *322*, 743.
4. Nordahl, K.; Radziuk, B.; Thomassen, Y.; Weberg, R.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1990**, *337*, 310.
5. De La Guardia, M.; Cervera, M. L.; Morales-Rubio, A. I.; *Speciation Studies by Atomic Spectroscopy*, JAI Press Inc.: New York, 1999.
6. Jackson, K. W.; *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, John Wiley & sons: New York, 1999.
7. Hahn, E.; Hahn, K.; Mohn, C.; Stoepler, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1990**, *337*, 306.
8. Lichtenberg, W.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1987**, *328*, 367.
9. Rossbach, M.; Ostapczuk, P.; Emons, H.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, *360*, 380.
10. Pauwels, J.; Kurfürst, U.; Grobecker, K. H.; Quevauviller, P.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, *345*, 478.
11. Bagschik, U.; Quack, D.; Stoepler, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1990**, *338*, 386.
12. Mohl, C.; Grobecker, K. H.; Stoepler, M.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1987**, *328*, 413.
13. Pawels, J.; Kramer, G. N.; De Angelis, L.; Grobecker, K. H.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1990**, *338*, 515.
14. Nomura, C. S.; Correia, P. R. M.; Oliveira, P. V.; Oliveira, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 75.
15. Lückner, E.; König, H.; Gabriel, W.; Rosopulo, A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *342*, 941.
16. Araújo, G. C. L.; Gonzalez, M. H.; Ferreira, A. G.; Nogueira, A. R.; Nóbrega, J. A.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2002**, *57*, 2121.
17. Nakamura, T.; Oka, H.; Morikawa, H.; Sato, J.; *Analyst* **1995**, *120*, 131.
18. Iyengar, G. V.; Kasperek, K.; *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1977**, *39*, 301.
19. Uchino, E.; Jin, K.; Tsuzuki, T.; Inue, K.; *Analyst* **1987**, *112*, 291.
20. Lima, E. C.; Krug, F. J.; Ferreira, A. T.; Barbosa Junior, F.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 269.
21. Koglin, D.; Backhaus, F.; Schaladot, J. D.; *Chemosphere* **1997**, *34*, 2041.
22. Pawels, J.; Hofmann, C.; Vandecasteele, C.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *348*, 418.
23. Kurfürst, U.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1983**, *315*, 304.