

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X EM AMOSTRA DE FÍGADO BOVINO

V.A.Maihara¹, I.M.Sato², D.I.T.Fávaro¹, V.L.Salvador², M.B.A.Vasconcellos¹

1: Laboratório de Análise por Ativação- CRPQ - IPEN-CNEN/SP

2: Centro de Química e Análise Ambiental - IPEN-CNEN/SP

RESUMO

Neste trabalho são apresentados os resultados preliminares das análises efetuadas pelas técnicas AANI e WD-XRF em uma amostra de fígado bovino, preparada para servir como um possível material de referência nacional, para um grupo de laboratórios participantes de um projeto de pesquisa FAPESP. Diversos laboratórios estabeleceram metodologias analíticas específicas para a análise de amostra de fígado bovino. Neste trabalho são apresentados os resultados preliminares deste estudo, onde as concentrações dos elementos constituintes Cl, K, Na, P e S e dos elementos traço Br, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Rb, Se e Zn foram determinadas por AANI e WD-XRF. Verificou-se a concordância dos resultados obtidos por ambas as técnicas analíticas, por meio do teste t de Student. A validação das metodologias foi realizada pela análise do material de referência certificado Bovine Liver (NIST SRM 1577b).

Keywords: trace elements; neutron activation analysis; X-ray fluorescence; foodstuff

I. INTRODUÇÃO

O método de Análise por Ativação com Neútrons Instrumental (AANI) tem sido utilizado em estudos nutricionais há vários anos no IPEN [1-4]. Este método é considerado como um método de referência para a certificação de minerais e elementos traço em matrizes biológicas, como amostras de alimentos e dietas. Mais recentemente, a técnica de Fluorescência de Raios X com dispersão de comprimento de onda (WD-XRF) tem sido utilizada para a determinação de elementos essenciais em alimentos e materiais biológicos[5-6].

Para o desenvolvimento das metodologias analíticas é de fundamental importância a utilização de materiais de referência certificados com características e concentrações dos elementos similares às das amostras de interesse. Porém, o custo dos materiais de referência disponíveis no mercado é elevado, dificultando a aquisição desse material por muitos laboratórios.

Neste trabalho são apresentados os resultados das análises efetuadas por AANI e WD-XRF em uma amostra de fígado bovino, preparada para servir como um material de referência nacional, para um grupo de laboratórios participantes de um projeto de pesquisa FAPESP. Diversos laboratórios estabeleceram metodologias analíticas específicas para a análise desse material. Os resultados destas técnicas serão harmonizados para a análise de conteúdo de minerais e elementos traço. Este exercício

poderá servir como ponto de partida na elaboração de um material de referência certificado nacional.

No presente trabalho são apresentados os resultados das concentrações dos elementos minerais Cl, K, Na, P e S e dos elementos traço Br, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Rb, Se e Zn determinados por AANI e WD-XRF. A validação das metodologias foi realizada pela análise do material de referência certificado Bovine Liver (NIST SRM 1577b).

II. PARTE EXPERIMENTAL

Coleta e Preparação da Amostra de Fígado Bovino Comercial

Cerca de 15 kg de fígado bovino, fornecidos pela indústria metalúrgica de auto-peças MWM, foram homogeneizados em um moinho industrial de facas. Este moinho foi previamente lavado e enxaguado, primeiramente com água deionizada e por último, com água destilada, antes de efetuar a homogeneização da amostra.

Posteriormente à homogeneização, o fígado foi liofilizado em um liofilizador marca Atlas Mark, com capacidade para 500 L na indústria Liotécnica, de alimentos liofilizados. Por fim, o fígado liofilizado foi homogeneizado num multiprocessador doméstico, sendo então colocado em saquinhos de polietileno

desmineralizados e conservados em freezer, antes de serem distribuídos para os laboratórios.

Análise por Ativação com Nêutrons

Cerca de 100 mg da amostra de fígado foram pesadas em sacos de polietileno, previamente limpos, assim como o material de referência Bovine Liver. As amostras, material de referência e padrões sintéticos dos elementos de interesse foram irradiados por 2 minutos e por 8 horas em fluxos de nêutrons térmicos de 10^7 a 10^8 n $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ no reator IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP. As medidas das atividades gama induzidas foram feitas com detector de germânio hiperpuro modelo POP TOP da EG&G ORTEC, com uma resolução de 1,90 keV para o pico de 1332,49 keV do ^{60}Co , acoplado a uma eletrônica associada. As análises dos espectros de raios gama e a quantificação dos elementos determinados foram feitas com os programas VISPECT2 e ESPECTRO, usados para localizar os picos e calcular as concentrações, respectivamente. Foram determinadas as concentrações dos elementos Br, Cl, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Se e Zn.

Fluorescência de Raios-X com Dispersão de Comprimento de Onda

Inicialmente, a amostra foi seca e homogeneizada num almofariz de ágata por 30-50 minutos para eliminação de efeito de tamanho de partículas. Usualmente, as pastilhas prensadas são preparadas utilizando-se de um material aglutinante, com um fator de diluição de 10 a 20 %, com a finalidade de se obter amostras com boa estabilidade temporal e uma boa resistência ao manuseio. Neste trabalho, foi utilizada uma solução aquosa de álcool polivinílico 10% (m/v) como aglutinante. Uma gota (< 0,25 mL) desta solução foi adicionada a 1,000 g da amostra, considerando-se dessa forma o fator de diluição como sendo igual a zero.

Foram realizados 9 preparos de cada uma das amostras de fígado bovino, a saber: NIST 1577b e comercial, aplicando-se o método estabelecido de pastilha prensada de dupla camada.

Para obtenção das intensidades de raios X característicos dos elementos acima citados, foram selecionados parâmetros instrumentais de medida no espectrômetro de fluorescência de raios X com dispersão de comprimento de onda (Rigaku Co, modelo RIX 3000, 1996, tubo de Rh 3,0 kW). Foram selecionados, para cada elemento, a linha de emissão mais adequada, a condição de excitação (kV vs. mA), o cristal analisador, o detector, PHA, a posição 2θ de ângulo de Bragg sobre a linha de emissão, as posições à esquerda e à direita da linha de emissão para contagem da radiação de fundo e o tempo de contagem. A determinação dos elementos foi realizada a partir de curvas de calibração individuais, relacionando as intensidades de raios X de fluorescência com as respectivas concentrações dos elementos. Nessas condições, os seguintes elementos foram determinados: Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, S e Zn.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação das Metodologias

A validação das metodologias AANI e WD-XRF foi feita pela análise do material de referência Bovine Liver (NIST SRM 1577b), nas mesmas condições de análise da amostra de fígado bovino comercial.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na análise do material de referência Bovine Liver (NIST SRM 1577b). A Figura 1 apresenta uma avaliação dos resultados das análises feitas no material de referência para as duas técnicas, utilizando-se o critério do Z-score [7].

O cálculo do valor-z foi efetuado de acordo com BODE[7]. Se $|z| < 3$, significa que o resultado individual da amostra controle (material de referência) deve estar dentro do intervalo de confiança de 99% do valor verdadeiro (ou aceito). Pela figura pode-se observar que a concentração da maioria dos elementos determinados por ambas as técnicas apresentou valor de Z-score no intervalo de $-2 < z < 2$, exceto o elemento Ca determinado por WD-XRF, que apresentou valor de $z > 3$.

TABELA 1: Resultados de Concentração dos Elementos Maiores e Traço Presentes no Material de Referência Bovine Liver (NIST SRM 1577b)

Elemento (concentração)	Métodos analíticos		Valor certificado
	AANI	WD-XRF	
	Média \pm DP	Média \pm DP	
Br ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	9,5 \pm 0,7	nd	(9,7)
Ca ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	nd	135 \pm 1	116 \pm 4
Cl (%)	0,273 \pm 0,012	0,287 \pm 0,002	0,278 \pm 0,006
Co ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,252 \pm 0,027	nd	(0,25)
Cu ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	154 \pm 7	160 \pm 2	160 \pm 8
Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	171 \pm 20	185 \pm 2	184 \pm 15
K (%)	1,012 \pm 0,032	0,974 \pm 0,009	0,994 \pm 0,002
Mg ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	568 \pm 33	618 \pm 10	601 \pm 28
Mn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	11,1 \pm 0,5	11,5 \pm 0,6	10,5 \pm 1,7
Mo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	3,7 \pm 0,5	nd	3,5 \pm 0,3
Na (%)	0,25 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,242 \pm 0,006
P (%)	nd	1,15 \pm 0,01	1,10 \pm 0,03
Rb ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	11,9 \pm 1,1	12,6 \pm 0,2	13,7 \pm 0,1
S (%)	nd	0,798 \pm 0,003	0,785 \pm 0,006
Se ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,66 \pm 0,05	nd	0,73 \pm 0,06
Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	118 \pm 11	124 \pm 2	127 \pm 16

nd: não determinado DP: desvio padrão

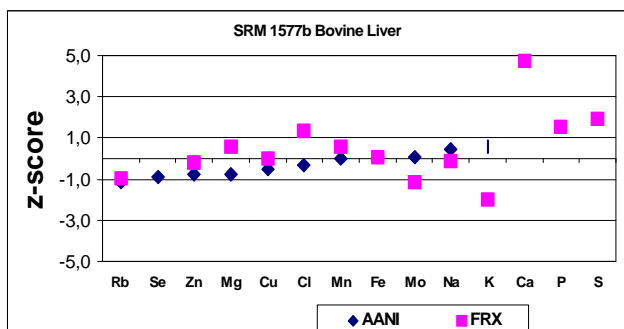


FIGURA 1: Carta de controle (Z-score) para o material de referência Bovine Liver

A Tabela 2 apresenta os resultados das concentrações dos elementos determinados no material Fígado Bovino Comercial pelas duas técnicas. Na Tabela 3 estão os valores de limites de determinação (LQ), calculados segundo o critério da IUPAC[8], na análise da amostra de fígado bovino por AANI e WD-XRF.

TABELA 2: Resultados Obtidos no Material Fígado Bovino Comercial, pelos Métodos de AANI e WD-XRF

Elemento (concentração)	Métodos Analíticos		Conclusão
	AANI	FRX-WD	
	Média ± DP (n)	Média ± DP (n)	Teste t Student
Br ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	4,7 ± 0,5 (12)	nd	
Ca ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	nd	154 ± 2 (9)	
Cl (%)	0,297 ± 0,030 (12)	0,297 ± 0,005 (9)	+
Co ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,30 ± 0,02 (12)	nd	
Cu ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	197 ± 5 (12)	203 ± 4 (9)	+
Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	237 ± 13 (12)	240 ± 2(9)	+
K (%)	1,18 ± 0,09 (12)	1,12 ± 0,09 (9)	+
Mg ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	646 ± 45 (12)	600 ± 21 (9)	-
Mn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	9,4 ± 0,7 (12)	9,0 ± 0,5 (9)	+
Mo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	3,77 ± 0,17 (12)	nd	
Na (%)	0,27 ± 0,02 (12)	0,26 ± 0,01 (9)	+
P (%)	nd	1,17 ± 0,02 (9)	
Rb ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	37 ± 3 (12)	38,0 ± 0,5 (9)	+
S (%)	nd	0,77 ± 0,01 (5)	
Se ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,31 ± 0,01 (12)	nd	
Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	131 ± 5 (12)	136 ± 4 (9)	+

n: número de determinações

nd: elemento não determinado

+ : as médias podem ser consideradas iguais

- : as médias não podem ser consideradas iguais

As médias obtidas para as concentrações dos elementos Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb e Zn pelos dois

métodos, foram comparadas aplicando-se o teste F de variância e o teste t de Student. Verificou-se que para os elementos Cu, K, Na e Zn, os valores de F e t calculados foram menores que os valores de F e t tabelados, o que significa que os resultados não diferiram a um nível de significância de 95%. Para os elementos Cl, Fe, Mg e Rb, os valores de F calculados foram maiores que os valores de F tabelados, então aplicou-se o t para variâncias não estatisticamente iguais, no nível de significância desejado[9]. Neste caso, apenas as médias obtidas para o elemento Mg não puderam ser consideradas estatisticamente iguais. Pode-se verificar para esse elemento, diferentes valores de concentração, com desvio padrão relativamente alto (7% para AANI e 3,5% para WD-XRF).

TABELA 3: Valores dos Limite de Determinação das Técnicas Analíticas, nas Condições de Análise do Material Fígado Bovino

Elementos	Limite de Determinação	
	AANI	FRX-WD
	LQ	LQ
Br ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,134	-
Ca ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	-	5
Cl (%)	0,0090	0,0010
Co ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,02	-
Cu ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	15	1
Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	9	1
K (%)	0,31	-
Mg ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	107	50
Mn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,80	1
Mo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,80	-
Na (%)	0,0099	0,0010
P (%)	-	0,0010
Rb ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,98	1
S (%)	-	0,0010
Se ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,15	-
Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,90	1

$$LQ = 10 \sqrt{BG}$$

Os valores dos limites de determinação para a maioria dos elementos foram da mesma ordem de grandeza, com exceção dos elementos Cl, Cu, Fe e Na, mais sensíveis pela técnica de WD-FRX.

IV. CONCLUSÕES

A técnica de AANI se mostrou uma ferramenta poderosa na análise de amostra de fígado bovino, permitindo a quantificação de cerca de 13 elementos, em diferentes níveis de concentração (de % a ng g^{-1}), numa análise puramente instrumental. A técnica de WD-XRF permitiu, igualmente, a determinação simultânea de 12 elementos. Verificou-se que elementos nutricionalmente importantes como P, S e Ca (em concentrações baixas) não foram determinados por AANI. Da mesma forma, a técnica WD-XRF não permitiu a determinação dos elementos Br, Co, Mo e Se. Os bons resultados obtidos em amostras de fígado bovino sugerem que estas técnicas possam ser usadas na análise de elementos de interesse nutricional nos alimentos em geral.

AGRADECIMENTOS

À empresa MWM pelo suporte técnico e pessoal necessários para a coleta do fígado bovino, à Liotécnica pela liofilização da amostra e à **FAPESP** pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

- [1] Maihara, V.A., Fávoro, D.T., Silva, V.N., Gonzaga, I.B., Silva, V.L. Cunha, I.L., Vasconcellos, M.B.A., Cozzolino, S.M.F. **Analysis of mineral constituents in duplicate portion diets of two university student groups by instrumental neutron activation analysis.** Journal Radioanalytical Nuclear Chemistry, Articles, vol. 249(1), p:21-24, 2001.
- [2] Fávoro, D.I.T., Chicourel, E., Maihara, V.A., Zangrande, K.C., Rodriguez, M.I., Barra, L.G., Vasconcellos, M.B.A., Cozzolino, S.M.F. **Evaluation of some essential and trace elements in diets from 3 nurseries from Juiz de Fora, MG, Brazil, by neutron activation analysis.** Journal Radioanalytical Nuclear Chemistry, vol.249 (1), p:15-19, 2001.
- [3] Maihara; V.A., Vasconcellos; M.B.A., Cordeiro; M.B., Cozzolino, S.M.F. **Estimate of toxic element intake in diets of pre-school children and elderly collected by duplicate portion sampling.** Food Additives and Contaminants, vol.15(7), p:782-788, 1998.
- [4] Fávoro; D.I.T., Hui; M.I.T., Cozzolino; S.M.F., Maihara; V.A., Vasconcellos; M.B.A., Yuyama; L.K., Boaventura; G.T., Tramonte, V.L. **Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis.** J.Trace Elements Med. Biol vol. 11, p:129-136, 1997.
- [5] Anderson, D.L., Cunningham, W.C., Capar, S.G., Baratta, E.J., Mackill, P. **Nuclear methods for food analysis at the U.S. Food and Drug Administration.**

Journal Radioanalytical Nuclear Chemistry, vol. 249(1), p: 29-32, 2001.

[6] Taylor; A., Branch; S., Halls; D. J., Owen; L. M. W., White, M. "Clinical and biological materials, foods and beverages". **J. Anal. Atomic Spectrometry**, vol. 15(4), p:451-487, 2000.

[7] Bode, P. **Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory**, Delft, University of Technology, The Netherlands, 1996.

[8] Currie, L.A. **Detection and quantification limits: origins and historical overview.** Analyt. Chim. Acta: vol. 391, p: 127-134, 1999.

[9] Atalla, L.T. **Interpretação quantitativa de resultados experimentais.** São Paulo, Instituto de Energia Atômica, Maio 1978 (IEA-60).

ABSTRACT

In this paper preliminary results of commercial bovine liver sample analyses obtained by methods - INAA and WD-XRF - are presented. This sample was prepared to be a possible Brazilian candidate of reference material for a group of laboratories participating in a research project sponsored by FAPESP. The concentrations of some elements like Cl, K, Na, P, S and trace elements Br, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Rb, Se and Zn were determined by INAA and WD-XRF. The certified reference material, Bovine Liver (NIST SRM 1577b), was used to evaluate how accurate and precise both analytical techniques are. The results were compared by using the t-Student test.