UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

BRUNO MENEZES SIQUEIRA

**Acoplamento das técnicas HPLC-ICP OES para
separação e identificação de metaloproteínas
em castanhas de caju**

VERSÃO ORIGINAL

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

22/07/2016

BRUNO MENEZES SIQUEIRA

**Acoplamento das técnicas HPLC-ICP OES para
separação e identificação de metaloproteínas em
castanhas de caju**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração Tecnologia
em Química e Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

São Paulo

2016

Siqueira, Bruno Menezes
S618a Acoplamento das técnicas HPLC-ICP OES para separação e
identificação de metaloproteínas em castanhas de caju / Bruno
Menezes Siqueira. -- São Paulo, 2016.
87p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Oliveira, Pedro Vitoriano de

1. Metaloproteína : Bioquímica 2. Instrumentação: Química
analítica 3. Método de separação : Química I. T. II. Oliveira, Pedro
Vitoriano de, orientador.

574.192454 CDD

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu infinito amor por mim. Por ter me concedido esta oportunidade e ter sido sempre refúgio nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pela orientação, apoio, incentivo, paciência, por ter acreditado nesse projeto, e por nunca ter desistido de continuar.

Aos meus pais, Rubens e Silvana, por todo investimento, amor, incentivo e carinho dedicado a mim em toda minha jornada profissional e pessoal.

A Danielle Martins de Oliveira, minha em breve esposa, por todo incentivo, paciência, amizade, e por nunca ter duvidado de que eu conseguiria.

A Nova Analítica, representada em nome de Luiz Bravo, pela confiança dedicada a minha pessoa, e por disponibilizar os instrumentos necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

A Raquel Rainone pela amizade, apoio e confiança durante todo esse período.

Aos meus colegas de Nova Analítica: Bruno Campovilla, Diego, Emilly, Mariana, Leandro, Valeska. Por todo apoio e incentivo.

Aos amigos do Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria: Alexandre, Gyslaine, Luíza, Daniel, Vivi, Angerson.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Marthin Luter King)

RESUMO

Siqueira, B. M. **Acoplamento das técnicas LC-ICP OES para separação e identificação de metaloproteínas em castanhas**. 2016. 100p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Mestrado Profissional em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O objetivo desse trabalho foi demonstrar a viabilidade do acoplamento entre as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (HPLC - ICP OES) em um equipamento da Thermo Fisher Scientific, visando análise de especiação elementar de espécies com maiores concentrações na amostra. A identificação de espécies moleculares associadas aos elementos Cu, Fe, Mg, e Zn em amostras de castanha de caju foi adotada como modelo para comprovar tal acoplamento. Para que o ICP OES pudesse adquirir sinais de emissão ao longo de um tempo determinado, ou seja, para que o equipamento pudesse coletar um sinal transiente, fundamental para o acoplamento HPLC - ICP OES, foi necessário executar algumas modificações. Para isso, foram feitas alterações na placa eletrônica principal do equipamento, e trocada sua caixa controladora de gases. Os parâmetros instrumentais do ICP OES foram otimizados em uma série de ensaios com o intuito de estabelecer e avaliar desempenho do instrumento e a robustez do método empregado nas análises de castanha de caju. Determinações das concentrações totais de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, e Zn foram feitas em amostras de castanha de caju e nos materiais de referência NIST 1515 e NIST 1547, apresentando uma exatidão do método aceitável, levando-se em consideração o preparo de amostra e a medida no ICP OES. As determinações totais elementares nas amostras de castanha de caju indicaram que os teores de Ca foram de $(0,04 \pm 0,01) \%$; Cu $(26,3 \pm 5,0) \text{ mg kg}^{-1}$; Fe $(47,9 \pm 8,8) \text{ mg kg}^{-1}$; Mg $(0,31 \pm 0,04) \%$; Mn $(25,6 \pm 3,9) \text{ mg kg}^{-1}$; Ni $(24,8 \pm 1,9) \text{ mg kg}^{-1}$; Zn $(66,3 \pm 2,4) \text{ mg kg}^{-1}$. Para identificação de espécies moleculares associadas aos elementos Cu, Fe, Mg, e Zn, foi feita nas amostras de castanha de caju uma extração de metais e proteínas utilizando-se de uma solução extrato de NaOH 1 mol L^{-1} . O extrato ainda foi submetido à uma etapa de *clean-up*, com precipitação das proteínas com acetona e ressuspenção das mesmas com tampão Tris-HCl, pH 7,4. As proteínas e metais ressuspenso em tampão foram analisados no sistema HPLC – ICP OES, em que a separação cromatográfica ocorreu através de uma coluna de exclusão por tamanho (SEC), a detecção molecular através do detector UV-Vis do HPLC, e a detecção elementar através do ICP OES. As espécies moleculares identificadas estão no intervalo de massa molecular compreendido entre 2 e 177 kDa, sendo que Cu, Fe e Zn apresentam associação com essas espécies moleculares. Foram monitorados ainda, no ICP OES, os sinais de intensidade de emissão de P e S. Esses elementos também apresentaram associação com espécies moleculares com peso molecular entre 2 e 177 kDa, sugerindo que essas espécies se tratam de metaloproteínas.

Palavras-chave: HPLC-ICP OES, especiação elementar, metaloproteínas, castanha de caju

ABSTRACT

Siqueira, B. M. **Coupling of LC-ICP OES techniques for separation and identification of metalloproteins in cashew nuts.** 2016. 80. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry (Professional Master). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The aim of this study was to demonstrate the capability of coupling between liquid chromatography techniques of high efficiency with the optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (HPLC - ICP OES) in an equipment of Thermo Fisher Scientific, aiming elemental speciation analysis of species with higher concentrations in the sample. The identification of molecular species associated with elements Cu, Fe, Mg and Zn in cashew nuts samples was adopted as a model to prove such coupling. For ICP OES could get emission signal through a certain time, so that the equipment could collect a transient signal, critical to the HPLC coupling - ICP OES, it was necessary to perform some modifications in the instrument. For this, changes were made to the main electronic board of the equipment and also changed their gas controller box. The instrumental parameters of the ICP OES were optimized in a series of tests in order to establish and evaluate performance of the instrument and the robustness of the method employed in cashew nut analysis. Determination of the total concentration of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni and Zn were made in cashew sample and reference materials NIST 1515 and NIST in 1547, with an accuracy acceptable method, taking into account the sample preparation and measurement by ICP OES. The elemental total determinations in cashew nut samples indicated that Ca were $(0.04 \pm 0.01)\%$; Cu $(26.3 \pm 5.0) \text{ mg kg}^{-1}$; Fe $(47.9 \pm 8.8) \text{ mg kg}^{-1}$; Mg $(0.31 \pm 0.04)\%$; Mn $(25.6 \pm 3.9) \text{ mg kg}^{-1}$; Ni $(24.8 \pm 1.9) \text{ mg kg}^{-1}$; Zn $(66.3 \pm 2.4) \text{ mg kg}^{-1}$. For the identification of molecular species associated with the elements Cu, Fe, Mg, and Zn was performed on samples of cashew nuts an extract of metals and proteins using an extract solution of NaOH 1 mol L^{-1} . The extract was further subjected to one-step of clean-up with protein precipitation with acetone following by a resuspension with Tris-HCl buffer, pH 7.4. Proteins and metals resuspended in buffer, were analyzed in the HPLC - ICP OES system, wherein the chromatographic separation took place by a size exclusion column (SEC), the molecular detection by UV-Vis detector of HPLC, and elemental detection by ICP OES. The molecular species were identified in the molecular weight range between 2 and 177 kDa, and Cu, Fe and Zn are associated with these molecular species. Were also monitored in the ICP OES, P and S emission intensity signals. These elements also associated with molecular species having a molecular weight between 2 and 177 kDa, suggesting that this species are metalloproteins.

Keywords: HPLC-ICP OES, elemental speciation, metalloproteins, cashews nuts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: Espectrometria de absorção atômica, do inglês “Atomic Absorption Spectrometry”

BEC: Concentração equivalente à radiação de fundo, do inglês “background equivalent concentration”

CCD: Dispositivo de injeção de carga, do inglês “charge coupled device”

CE: Eletroforese capilar

CG: Cromatografia gasosa

CID: Dispositivo de injeção de carga, do inglês “charge injection device”

CL: cromatografia a líquido

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

DIN: Nebulizador com injeção direta, do inglês “Direct injection nebulizer”

DIHEN: Nebulizador com injeção direta de alta eficiência, do inglês “Direct injection high efficiency nebulizer”

EAA: Espectrofotometria de absorção atômica

EPA: Agência de proteção ambiental, do inglês Environmental Protection Agency

F AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama, do inglês “Flame Atomic Absorption Spectrometry”

GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês

“Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”

HG AAS: espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês

“Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry”

ICP OES: Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do

inglês “Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry”

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês

“Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry”

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance, do inglês “High performance

liquid chromatography”

LD: Limite de detecção

LOD: Limite de detecção

MALDI-TOF: espectrometria de massas com tempo de voo com ionização por

dessorção a laser assistida por matriz, do inglês “Matrix assisted laser desorption

ionization tof of flight”

NIST: do inglês “National Institute Standard Technology”

PDA: Arranjo de fotodiodos, do inglês “Photodiode Array”

PEEK: Poli éter-éter cetona, do inglês “Polyether ether ketone”

PI: Padrão Interno

RSD: Desvio padrão relativo, do inglês “relative standard deviation”

SEC: Coluna de exclusão por tamanho, do inglês “size exclusion column”

SBR: Razão sinal do analito/radiação de fundo, do inglês “signal-to-background ratio”

TACO: Tabela brasileira de composição dos alimentos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do dispositivo de carga acoplada (CCD) (http://www.mpia.de/AO/index.html ; acessado 12/09/2015).....	33
Figura 2. Operação Básica de um pixel no detector CID (BHASKARAN <i>et al.</i> , Technical Note, Thermo Scientific).....	34
Figura 3. Placa eletrônica principal alterada para aquisição de sinal transiente.....	41
Figura 4. Desenho esquemático da caixa controladora dos gases que foi substituída no ICP, com as indicações das entradas e saídas dos gases.....	41
Figura 5. Diagrama do procedimento experimental de preparo de amostra para extração de proteínas de castanha de caju.....	46
Figura 6. Valores da razão $Mg(II)/Mg(I)$ em função da potência de radiofrequência aplicada.....	53
Figura 7. Valores da razão $Mg(II) / Mg(I)$ em função da rotação da bomba peristáltica, considerando potência de radiofrequência de 1200 W.....	54
Figura 8. Valores da razão $Mg(II) / Mg(I)$ em função da vazão do gás auxiliar, considerando potência de radiofrequência de 1200 W e rotação da bomba peristáltica de 40 rpm.....	54

Figura 9. Valores da razão Mg (II) / Mg (I) em função da vazão do gás do plasma, considerando potência de radiofrequência de 1200 W, rotação da bomba peristáltica de 40 rpm e vazão de gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹.....55

Figura 10. Valores da razão Mg (II)/Mg (I) em função da vazão do gás de nebulização, considerando potência de radiofrequência fixada de 1200 W, rotação da bomba peristáltica de 40 rpm, vazão de gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹, vazão do gás de nebulização de 0,45 L min⁻¹ e vazão do gás do plasma de 14 L min⁻¹.....56

Figura 11. Sobreposição do perfis dos sinais moleculares(---) e elementares (---), para a molécula de Ferritina. (Condições: coluna Superdex 12, volume de injeção 100 µL, fase móvel Tampão Tris-HCl, pH = 7,4).....60

Figura 12. Sobreposição do perfil elementar da molécula de ferritina nos tempos de ciclo de integração do ICP OES de 0,5 s (---), 1 s (---), e 2 s (---).....61

Figura 13. Sobreposição do perfis elementares de Zinco em castanha de caju para as seguintes massas de extratos 0,5 s (---), 2,5 s (---), e 4 s (---). (Condições: coluna Superdex 12, volume de injeção 100 µL, fase móvel Tampão Tris-HCl, pH = 7,4)...62

Figura 14. Curva de calibração para cálculo de massa molecular obtido na coluna Superose 12 10/300 GL (GE).....64

Figura 15. Varredura no detector PDA entre os comprimentos de onda de 200 e 360 nm para injeção do extrato proteico de castanhas de caju.....	65
Figura 16. Perfil molecular do extrato proteico de castanhas de caju nos comprimento de onda de 225 (---) e 265 (---) nm.....	66
Figura 17. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de cobre para extrato proteico de castanhas de caju.....	68
Figura 18. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de cobre para extrato proteico de castanhas de caju.....	69
Figura 19. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de ferro para extrato proteico de castanhas de caju.....	70
Figura 20. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de ferro para extrato proteico de castanhas de caju.....	70
Figura 21. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de magnésio para extrato proteico de castanhas de caju.....	71
Figura 22. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de magnésio para extrato proteico de castanhas de caju.....	72

Figura 23. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de zinco para extrato proteico de castanhas de caju.....73

Figura 24. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de zinco para extrato proteico de castanhas de caju.....73

Figura 25. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de fósforo para extrato proteico de castanhas de caju.....74

Figura 26. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de fósforo para extrato proteico de castanhas de caju.....75

Figura 27. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de enxofre para extrato proteico de castanhas de caju.....75

Figura 28. Perfil molecular em 265 nm (--) e perfil elementar (--) de enxofre para extrato proteico de castanhas de caju.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros adotados para a digestão total da castanha de caju e concentrações ácidas empregadas.....43

Tabela 2. Parâmetros instrumentais adotados para as separações no HPLC (volume de injeção de 100 uL).....47

Tabela 3. Parâmetros instrumentais adotados para as determinações totais e das espécies no ICP OES.....56

Tabela 4. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, e Zn em amostras de castanha de caju e nos materiais de referência SRM 1515 e SRM 1547, assim como os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o método de determinação de tais elementos em castanha de caju.....58

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
1.1. Métodos instrumentais aplicados à análise de especiação e fracionamento elementar.....	25
1.1.1 Métodos de separação para análise de especiação elementar.....	28
1.1.2 Métodos de detecção para especiação elementar.....	29
1.1.3 Considerações sobre o ICP OES utilizado nessa pesquisa.....	31
2. Objetivos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Instrumentação.....	37
3.2. Reagentes e soluções.....	39
3.3. Procedimento experimental.....	40
3.3.1. Acoplamento LC-ICP OES.....	40
3.3.2. Determinação elementar total.....	42
3.3.3. Extração de proteínas de castanha de caju.....	45
3.3.4. Análise de especiação no sistema SEC-UV-ICP OES.....	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

4.1. Modificações no ICP OES para acoplamento com HPLC..... 50

4.2. Otimizações das condições do ICP OES..... 51

4.3. Determinação das concentrações totais dos elementos..... 57

4.4. Acoplamento HPLC-ICP OES..... 59

4.5. Extração de proteínas em castanha de caju.....62

4.6. Calibração da coluna cromatográfica.....63

4.7. Seleção do comprimento de onda para obtenção do perfil molecular.....65

4.8. Perfis moleculares e elementares obtidos dos extratos de castanha de caju.....67

5. CONCLUSÕES 76

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 78

SÚMULA CURRICULAR..... 84

1. Introdução

O conhecimento das concentrações totais de determinados elementos em algumas amostras (e.g. castanha-do-pará, castanha de caju, etc.), em muitos casos, não é o suficiente para fornecer as informações necessárias sobre toxicidade, biodisponibilidade, mobilidade, essencialidade, função bioquímica e impacto ambiental. Nesses casos, além das concentrações totais, para acessar informações sobre as formas química dos elementos nas amostras de interesse, faz-se necessário a fracionamento e/ou a análise de especiação (MATOS, 2011; CARUSO *et al.*, 2000).

O fracionamento é o processo de classificação de um ou mais analitos em uma certa amostra, de acordo com algumas propriedades físicas (massa molecular, solubilidade, etc.) ou químicas (reatividade, estado de oxidação, etc.). Análise de especiação é a atividade analítica de identificação ou determinação da quantidade de uma ou mais espécies químicas individualmente na amostra. Na maioria dos casos em que a análise de especiação for requisitada, o fracionamento está presente como uma etapa preliminar. Tanto a análise de especiação como o fracionamento se dividem em duas etapas principais: a separação e a identificação/determinação das diferentes formas nas quais os elementos estão associados (CORNELIS *et al.*, 2003).

O reconhecimento por parte da comunidade científica de que as propriedades dos elementos são dependentes da forma química com que se encontram nas amostras, tem impulsionado o rápido desenvolvimento da química analítica na área de especiação elementar, tornando-se cada vez mais importantes e frequentes nas pesquisas ambientais, de saúde pública, nutrição, medicina, alimentos e no

desenvolvimento e controle de fármacos, seja para controle de qualidade ou para estudos fundamentais, uma vez que a atividade e/ou ação de princípios ativos, metaloproteínas e formas inorgânicas dos elementos nessas matrizes tem relação direta com processos ambientais e biológicos importantes (MATOS, 2011; CARUSO *et al.*, 2000).

O planejamento para a análise de especiação ou de fracionamento deve atender a alguns requisitos com respeito a coleta da amostra, armazenamento e dos procedimentos para execução da análise. No geral, alguns questionamentos são inevitáveis: Quais espécies se deseja analisar? Como executar a amostragem para que as espécies químicas de interesse, na amostra, permaneçam inalteradas? Como determinar baixas concentrações de espécies, levando em conta que a espécie de interesse é apenas uma fração de uma concentração total? Como fazer a calibração para determinações quantitativas uma vez que alguns compostos de elementos de interesse ainda não foram sintetizados? Como proceder a validação de um método para especiação elementar, considerando que não existem disponíveis materiais de referência para diferentes matrizes com valores de concentrações certificados para muitas espécies? Essas questões terão respostas muito específicas para cada matriz e espécies de interesse, refletindo o grau de complexidade envolvidos nas análises de especiação ou fracionamento. A maioria dos desenvolvimentos de métodos de análises de especiação ou fracionamento elementar devem seguir e responder tais questionamentos.

Um dos aspectos importantes para uma análise de especiação elementar consiste na preservação das espécies durante todo o processo de análise a começar pela coleta. Amostras ambientais, como águas, sedimentos, solos devem ser coletadas com o máximo cuidado para que não ocorram interconversões ou

mudanças nos estados de oxidação das espécies, quando se altera o ambiente natural em que o matriz da amostra se encontrava. No caso de amostras de alimentos, dependendo do material, apesar de ser, em alguns casos, menos crítico do que as amostras ambientais mencionadas, também deve ter muito cuidado para preservação. Na maioria dos casos, é recomendado o congelamento a baixas temperaturas (c.a. -20 °C) sem adição de conservantes para que as espécies sejam preservadas até a análise (MATOS, 2011; CARUSO *et al.*, 2000).

O preparo de amostras para análise de especiação química é mais complexo frente a uma determinação elementar total. Pois, além do tempo, custos e incertezas acumuladas nas etapas, é preciso ter muito cuidado para não comprometer a integridade original dos analitos de interesses presentes na amostra (KRUG, 2010; CORNELIS *et al.*, 2003). Nesse caso, nas análises de especiação recomenda-se que: (i) A amostragem e conservação da amostra devem ocorrer de forma a preservarem a integridade química das espécies elementares de interesse; (ii) Uma outra estratégia diz respeito a análise química propriamente dita, ou seja, usando procedimentos apropriados de extração para obter a(s) espécie(s) em solução ou transformar as espécies quantitativamente em derivados adequados para posterior aplicação de métodos de separação e quantificação (CORNELIS *et al.*, 2003). Na maioria das análises de especiação ou fracionamento, os elementos de interesse estão presentes nas amostras em níveis de traços (e.g. As, Hg, Se, Sn, etc.) e, conseqüentemente, as espécies analisadas estão em concentrações ainda menores, exigindo técnicas analíticas muito sensíveis. Adicionalmente, como em todas as determinações de traços, cuidados devem ser tomados para minimizar erros por contaminações ou perdas. É importante considerar que, por envolver diversas etapas e, na maioria das vezes, por se tratar de baixas concentrações as exatidões

em análise de especiação não alcançam o mesmo grau das determinações totais, são piores. Outro aspecto importante está relacionado ao balanço de massas; pode-se considerar quanto mais eficiente a separação e identificação das espécies quando melhor a concordância entre a somatória das concentrações (ou massas) das espécies individuais com a concentração (ou massa) total.

Durante os processos de extração e, em alguns casos, pré-concentração das espécies de interesse deve-se levar em conta a estabilidade dos analitos e a possibilidade de segregação em grupos específicos, principalmente, em se tratando de macromoléculas, como as metaloproteínas. As extrações de metaloproteínas de uma matriz são fortemente dependentes do pH e força iônica do meio. Dependendo do pH pode-se atingir o ponto isoelétrico (pI), definido como o valor de pH em que as proteínas tem carga global neutra, ou seja, as cargas positivas e negativas são iguais. Nesse caso, podem ocorrer extrações de classes de proteínas o que pode ser útil para a posterior separação e identificação (CARUSO *et al.*, 2000).

Os dois meios extratores de proteínas mais utilizados são as soluções diluídas de NaOH ou HCl. No entanto, as extrações com soluções diluídas de NaOH tem demonstrado maior efetividade nos trabalhos de especiação de metaloproteínas. (WUILLOUD *et al.*, 2004). Arias-Borrego *et al.* (2008) propuseram, antes da extração de proteínas em castanhas com 0,1 mol L⁻¹ NaOH, uma etapa de eliminação de lipídeos, com solução de clorofórmio/metanol (2:1), obtendo eficiência de extração semelhante, porém, com soluções finais de menor complexidade para posteriores análises.

Sempre deve-se ter o máximo de cuidado com todo o material que entra em contato com a amostra. Frascos de armazenamento devem ser verificados como possíveis fontes de contaminação ou perdas por adsorção. Ferramentas de

amostragem de aço inoxidável como espátulas, estiletes, devem ser evitadas em especiação elementar. A limpeza de todo utensílio deve ser cuidadosa, podendo ser feita com 10% (v v⁻¹) de ácido nítrico ou ácido clorídrico, seguido de inúmeras lavagens com água deionizada (KRUG, 2010).

Outro aspecto muito importante que deve ser considerado na análise de especiação ou fracionamento elementar é a escolha do método. Essa escolha é dependente do elemento ao qual se deseja analisar, do objetivo que deseja atingir e, principalmente, da concentração da espécie de interesse na amostra. Existem alguns métodos de análise de especiação com foco em elementos potencialmente tóxicos, como arsênio inorgânico e espécies metiladas de mercúrio (EPA, 2001) ou tributilestano (EPA, 2003), já bem estabelecidos. Normalmente, para esses tipos de análises são requeridas técnicas de alta sensibilidade para determinação dos elementos em níveis de traços. No entanto, uma situação diferente ocorre para análise de especiação de produtos naturais, como plantas, frutas ou castanhas, que muito pouco se sabe a respeito da composição química.

O conhecimento das espécies de muitos elementos (considerados como nutrientes ou potencialmente tóxicos) em plantas, frutas e castanhas, ainda é escasso. Adicionalmente, o aumento da tecnologia para produção de suplementos alimentícios ricos em elementos organicamente ligados, vão requerer, cada vez mais, de métodos analíticos capazes de executar a caracterização desses produtos, garantindo reprodutibilidade do processo de produção, qualidade e a aprovação desse produto para consumo humano e para venda no mercado. Tem-se conhecimento de que a biodisponibilidade de elementos traços (como Zn, Cu, Fe, Mn) é dependente da sua forma química. Na última década, o interesse em usar quelatos metálicos com aminoácidos, peptídeos, ou proteínas aumentou

consideravelmente devido a maior biodisponibilidade em comparação com fontes inorgânicas (CORNELIS *et al.*, 2003).

As castanhas tem sido alvos de constantes estudos devido à sua capacidade de suprir carências de determinados elementos em certas dietas, por exemplo, ferro, zinco, selênio (ALBERTÍ *et al.*, 2007; CARUSO *et al.*, 2000; CARUSO *et al.*, 2002; LOBINSKI *et al.*, 2012). Alguns estudos estão voltados para a identificação de metaloproteínas ou de espécies químicas de selênio com o intuito de conhecer as propriedades e papel nutricional das mesmas (CARUSO *et al.*, 2002, LOBINSKI *et al.*, 2012).

No que diz respeito a especiação química em amostras de interesse ambiental, algumas agências têm incluído métodos de especiação em suas regulamentações, por exemplo, a agência americana “*Environmental Protection Agency*” (EPA) publicou o método 321.8, descrevendo a especiação de bromo por cromatografia iônica e detecção por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (EPA, 2013). Esse tipo de ação, por parte das agências reguladoras, ajuda no desenvolvimento da ciência nessa área, como já tinha sido prenunciado, há mais de uma década (TEMPLETON *et al.* 2000), onde diziam que “o desenvolvimento de métodos de especiação por parte das agências reguladoras é um indício de que a ideia de análise de especiação e de acoplamento entre técnicas diferentes está amadurecendo e, logo, laboratórios estarão adotando tais métodos em rotina”. Vários métodos visando a análise de especiação já foram propostos na literatura, entre esses merecem destaques aqueles relacionados à especiação de arsênio, cromo, mercúrio, selênios entre outros elementos em diversas matrizes (CORNELIS *et al.*, 2003; ALEMAYEHU *et al.*, 2014; LOBINSKI *et al.*, 2012).

Atualmente é consenso que a especiação química elementar contribui para o entendimento de vários processos ambientais, bioquímicos, nutricionais, toxicológicos, etc. Ao mesmo tempo, quanto mais informações são obtidas a respeito de espécies nessas matrizes, maior o interesse em busca de mais informações além daquelas relacionadas com as concentrações totais; em alguns casos, como controle de qualidade, por exemplo, para alimentos e produtos farmacêuticos. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos mais simples, robustos, com instrumentação mais acessível, seja do ponto de vista de custo como também de operação, para implementação em rotina, se torna cada vez mais importante.

1.1. Métodos instrumentais aplicados à análise de especiação e fracionamento elementar

Uma das formas de se conseguir informações sobre as diferentes espécies de um dado elemento presente em uma amostra é executando uma análise de especiação. Em geral, os procedimentos envolvem o acoplamento *on-line* de uma técnica analítica de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (CG) ou eletroforese capilar (CE) com uma técnica de detecção, tais como, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) (KPLIK *et al.*, 2006; CORNELIS *et al.*, 2003), ou *off-line* com a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (CORNELIS *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2010; NAOZUKA *et al.*, 2010).

O acoplamento entre uma técnica cromatográfica com uma detecção elementar pode nos fornecer dois tipos de informações. A primeira é obtida pelo detector do sistema de separação, normalmente, UV-Vis, fluorescência, condutividade, condutividade térmica, etc., que fornece o perfil de separação das espécies eluídas da coluna cromatográfica. Em alguns casos, essas espécies separadas podem estar livres ou associadas a ligantes ou como parte de organometálicos mais estáveis. Portanto, pode-se obter informações do perfil iônico ou molecular da espécie na amostra. A segunda informação é a elementar, a qual pode ser obtida pelo acoplamento da técnica de separação como, por exemplo, ICP OES e ICP-MS, como um segundo detector. Nesse caso é possível combinar as informações obtidas pelas técnicas de separação com as técnicas de detecção elementar. A combinação desses dois tipos de informações revelam potenciais espécies ligantes do metal nos mais diversos tipos de matriz, permitindo identificá-las e quantificá-las. No entanto, para espécies não conhecidas, outros experimentos são necessários, normalmente utilizando técnicas como espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS) ou espectrometria de massas com tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF).

A combinação do HPLC, com um fluxo contínuo, para sistemas de detecção como o ICP OES e ICP-MS, tem se mostrado bastante adequada para análises de especiação (CARUSO, 2003). Esse acoplamento é comumente utilizado devido à similaridade das vazões empregadas na técnica cromatográfica e na detecção elementar (KPLIK *et al.*, 2006). Em comparação com sistemas *off-line*, o acoplamento entre as duas técnicas garantem agilidade de análise, melhor resolução de tempo, redução de contaminação e perda de amostra.

A vantagem de se utilizar as técnicas de ICP OES ou ICP-MS como sistema de detecção elementar para uma técnica de separação é a capacidade de determinação multielementar e da detecção de não metais, tais como, enxofre e fósforo, em alguns casos, importante para a identificação da(s) espécie(s) de interesse. A técnica de ICP-MS oferece um ótimo desempenho como um detector para o HPLC, permitindo o desenvolvimento de uma série de métodos para determinação de organometálicos, os quais detectores convencionais de cromatografia não são capazes de executar. Em geral a principal vantagem da detecção por ICP-MS, frente à detecção por ICP OES é a maior sensibilidade (aproximadamente 3 ordens de magnitude) para metais, e também a capacidade para determinação da razão de isótopos a qual pode ajudar na identificação de espécies desconhecidas (KPLIK, *et al.*, 2006).

Por sua vez, em determinadas aplicações, o uso do ICP OES pode ser uma alternativa frente ao ICP-MS, sobretudo nos casos em que as concentrações envolvidas não estão em níveis de ultratraços. O sistema óptico possui um custo reduzido e uma facilidade maior para entrar na rotina diária dos laboratórios. Além disso, muitos trabalhos indicam que os limites de detecção obtidos com o acoplamento LC-ICP OES são suficientes para determinações de espécies de metais em diversas matrizes. Alguns exemplos de aplicações estão relacionadas com amostras de medicamentos (SCHOPPENTHAU, J.; DUNEMANN, L.; 1994; SPERLING, 2012.), ambientais (KAHAKACHCHI, C. L.; MOORE, D. A.; 2009) e de alimentos (ALBERTÍ *et al.*, 1995; CARUSO *et al.*, 2002).

1.1.1 Métodos de separação para análise de especiação elementar

Apesar de existirem métodos não cromatográficos sendo utilizados para análise de especiação química, na maioria dos casos, os métodos cromatográficos de separação são componentes indispensáveis. Uma grande variedade de técnicas de separação estão sendo utilizadas para análises de especiação, entre elas, a cromatografia a líquido (LC), a CG (CARUSO *et al.*, 2006) e EC são alguns exemplos, sendo que, a cromatografia a líquido é a técnica mais popular em análises de especiação ou fracionamento elementar. Nessa pesquisa, foi utilizada a LC como método de separação e, por isso, serão enfatizadas apenas as suas características e os benefícios para o acoplamento proposto.

Cromatografia a líquido é um termo geral usado para separações cromatográficas que utilizem um líquido como a fase móvel. Atualmente, a maioria das aplicações de LC é executada em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nesse caso, basicamente a diferença é que para HPLC, as colunas possuem partículas de diâmetros menores. Para isso os equipamentos possuem bombas com maior capacidade de bombeamento, e que suportam maiores pressões. As separações com HPLC podem ser classificadas, de maneira geral, de acordo com a fase estacionária em fase reversa, troca iônica e exclusão por tamanho (SNYDER *et al.*, 2010).

A cromatografia a líquido usando coluna de exclusão por tamanho (SEC) vem sendo muito utilizada para separar macromoléculas, como proteínas, polímeros, ou biopolímeros de acordo com suas diferenças de tamanho (CARUSO *et al.*, 2003). Na SEC as separações não são baseadas em interações químicas, mas sim na capacidade do analito de interagir fisicamente com a fase estacionária, que promove

a separação devido as diferenças de tamanho entre as moléculas. Em SEC a fase móvel não desempenha um papel importante com relação a separação, sendo que sua escolha está mais relacionada a solubilidade da amostra, e a importância de se conservar as espécies de interesse durante toda análise (WUILLLOUD *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2004; CARUSO *et al.*, 2004)

1.1.2.Métodos de detecção para especiação elementar

Um dos maiores desafios analíticos para a análise de especiação elementar são as baixas concentrações dos analitos nas diversas amostras, e também os requisitos de identificação das diferentes formas químicas dos elementos. Tradicionalmente, o método de determinação elementar necessita de alta sensibilidade para atender aos requisitos exigidos na análise de especiação. As técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS), a ICP OES e a ICP-MS podem atender a esses requisitos. No entanto, é característica dessas técnicas a destruição total da porção da amostra inserida no compartimento de medida (chama, forno de grafite ou plasma), levando as espécies de interesse a átomos no estado fundamental ou a íons. Por isso, é imprescindível o uso de técnicas de separação combinadas com esses detectores para a análise de especiação. A espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (F AAS) desperta pouco interesse por ser monoelementar e não apresentar boa sensibilidade. Apesar da excelente sensibilidade, comparada a ICP-MS, a GF AAS também não desperta muito interesse devido a sua característica de amostragem discreta, o que impede qualquer tipo de acoplamento *on-line*. Apesar disso, vem sendo proposta para

resolver problemas específicos com boa aceitação (NAOZUKA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A ICP-MS é uma técnica extremamente poderosa e versátil para determinação de elementos ultratraços. Caracterizada por alcançar baixos limites de detecção (LD), uma ampla faixa linear de resposta e capacidade multielementar. Quando acoplada a uma técnica de separação, pode-se ter uma ótima ferramenta para análise de especiação. É, sem dúvida, a mais requisitada para detecção no âmbito das análises de especiação (CARUSO *et al.*, 2003).

A especiação elementar com detecção por ICP OES possui a vantagem do fluxo contínuo do eluente que provém do sistema LC, facilitando assim o acoplamento dessas duas técnicas. Outra vantagem é a capacidade de detecção multielementar, podendo analisar simultaneamente inúmeros metais e metaloides. Apesar de não ter a mesma sensibilidade da ICP-MS, alguns trabalhos da literatura propuseram o acoplamento do ICP OES para análise de especiação com sucesso. É importante considerar que a viabilidade de uso do ICP OES está condicionado às concentrações dos elementos de interesse e das espécies na amostra. Kahakachchi e Moore executaram análises de especiação de contrastes radiológicos à base de gadolínio. Para isso utilizaram o acoplamento LC-ICP OES e chegaram a limites de detecção entre 8 e 35 ng mL⁻¹, para os diferentes complexos de Gd presentes nos contrastes utilizados (KAHAKACHCHI, C. L.; MOORE, D. A., 2009). Mingsong *et al.* fizeram um estudo para separar e identificar diferentes espécies de V e TI em água. Para o vanádio, foram separados e identificados as espécies de V^{IV} e V^V, usando o acoplamento LC-ICP OES com uma coluna aniônica. Os limites de detecção encontrados foram de 0,02 mg L⁻¹ para V^{IV}, e 0,05 mg L⁻¹ para V^V. Esses valores de LD foram melhorados para 2 µg L⁻¹ (em ambas as espécies) quando

utilizado um nebulizador ultrassônico. Para a separação das espécies de tálio (Tl^I e Tl^{III}) foi utilizado o acoplamento LC-ICP OES com uma coluna catiônica, chegando em valores de limite de detecção (LD) de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ para ambas as espécies quando utilizado um nebulizador V-groove. O valor de LD foi diminuído para $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ quando o sistema foi utilizado com o nebulizador ultrassônico (MINGSONG *et al.*, 2002). Charanek *et al.* utilizaram o sistema acoplado LC-ICP OES para fracionamento de espécies organometálicas em sojas convencionais e sojas geneticamente modificada. Utilizando as colunas Fractogel EMD BioSEC (Merck) e Superdex 200 (Amershan, Biosciences) foi possível, por meio da distribuição dos elementos em relação à faixa de tamanho das moléculas, o reconhecimento entre a soja convencional e a soja transgênica (CHARANEK, 2006).

1.1.3.Considerações sobre o ICP OES utilizado nessa pesquisa

Em se tratando de análise de especiação ou fracionamento elementar, o acoplamento entre um sistema de separação e um sistema de detecção elementar é a maneira mais usual de executar tais tarefas. Portanto, a escolha da técnica de detecção elementar é de extrema importância para o sucesso da análise, e passa pela avaliação da capacidade de detecção inerente à técnica e também por qual dispositivo de detecção cada sistema possui. O dispositivo de detecção, em conjunto com o software que o controla, deve atender alguns pontos necessários para execução do acoplamento de uma análise de especiação de maneira *on-line*, com sensibilidade necessária, com resolução cromatográfica e com a menor quantidade possível de interferentes:

- O sistema deve adquirir o sinal de maneira transiente. Ou seja, o dispositivo de detecção, junto ao software, devem adquirir sinal de maneira contínua, em determinado intervalo de tempo, ao longo de todo período da análise, até que todos os analitos já tenham saído da coluna cromatográfica e chegado ao detector.
- O intervalo de tempo de aquisição de dados deve ser o menor possível, pois assim será obtida uma melhor resolução cromatográfica, ou seja, uma melhor definição dos pico no cromatograma.
- O dispositivo de detecção deve ter alta detectabilidade. Em se tratando de uma análise de especiação, as concentrações de cada uma das espécies vão ser menores do que o teor total do analito em questão. Portanto, em especiação sempre se trabalha com menores teores do que o normalmente se trabalha em determinações totais.

Em se tratando de detectores ópticos, existem 3 mais utilizados, o tubo fotomultiplicador, dispositivo de carga acoplada (CCD) e o dispositivo de injeção de carga (CID), sendo os dois últimos os mais recomendados para as análises de especiação.

Considerando os detectores de estado sólido, o CCD e o CID, são os mais comuns de se encontrar em sistemas de ICP OES. O detector CCD é um chip eletrônico, feito de um semicondutor, que possui sensibilidade ao impacto de luz. O chip possui uma divisão e configuração de matriz que é formada de elementos chamados pixels. Quanto menor for a dimensão desses pixels, maior vai ser a resolução do sistema de detecção. Um número de pixels são distribuídos ao longo dessa matriz quadrada. Os pixels são colocados ao longo de canais verticais na

matriz e irão coletar a energia de cada fóton incidente naquela posição específica do pixel. Os canais inicialmente são estacionários, durante o tempo de exposição. Quando o tempo de exposição acaba, as energias armazenadas em cada pixel são transferidas, ao longo do canal vertical, para um canal horizontal chamado de registrador em série, o qual irá transportar toda informação até um amplificador eletrônico, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema do dispositivo de carga acoplada (CCD) (<http://www.mpia.de/AO/index.html>; acessado 12/09/2015).

Depois do dispositivo CCD ser exposto a radiação, eventualmente, os elétrons gerados por essa radiação, na parte mais brilhante da imagem, satura o pixel, fazendo com que os elétrons transbordem para os pixels ao lado, resultando num efeito chamado de “blooming”. A estrutura do CCD permite que os elétrons fluam mais facilmente numa direção do que na outra, o que resulta na formação de estrias verticais, prejudicando a análise nas regiões periféricas desse pixels (BHASKARAN *et al.*, Technical Note, Thermo Scientific).

O detector CID é, estruturalmente, muito parecido com o CCD. A principal diferença entre os dois detectores está na forma que os pixels armazenam e transmitem a informação dos fótons. Um pixel de um CID tradicional possui dois modos de operação: "Storage" e "Sense". O modo básico de funcionamento para um pixel CID está ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Operação Básica de um pixel no detector CID (BHASKARAN *et al.*, Technical Note, Thermo Scientific).

A integração é a coleta de fótons (Passo A). Tipicamente, a carga acumulada é coletada no modo "Storage". No entanto, dependendo da polarização do eletrodo, o modo "Sense" pode também ser utilizado para a coleta da carga. A carga gerada pelo fóton é determinada pela medição da alteração da voltagem induzida pela transferência de carga entre os dois modos de operação (Passos B e C). Este é um processo não-destrutivo da carga gerada por fótons (NDRO). A carga gerada por fótons pode ser liberada pelo colapso dos potenciais tanto no modo "Storage" quanto

no “Sense” (Passo D), injetando a carga no substrato subjacente (BHASKARAN *et al.*, Technical Note, Thermo Scientific).

As vantagens do sistema de detecção CID podem ser resumidas nos itens a seguir:

- Amplo intervalo espectral de resposta (156 nm – 1100 nm)
- Alta tolerância de radiação
- Capacidade de leitura não destrutiva de carga (NDRO)
- Capacidade “anti-blooming” intrínseca ao dispositivo
- Alta detectabilidade na faixa do UV.

A interface em sistemas acoplados entre técnicas de separação e técnicas de detecção elementar é parte fundamental para o sucesso da análise. Cada uma das técnicas acopladas tem suas peculiaridade, entretanto, precisam atender alguns requisitos para que o estudo seja bem sucedido, são eles:

- A resolução temporal dos componentes das amostras deve ser minimamente prejudicada.
- É necessário que a interface seja inerte, livre de metais, e de menor comprimento possível.
- A interface precisa manter a compatibilidade de fluxos entre as duas técnicas acopladas.
- A interface deve transmitir a amostra fracionada quantitativamente a partir do sistema de separação até o plasma.

A técnica que melhor acopla com os detectores elementares do ICP OES e ICP–MS é a cromatografia líquida. Isso se deve, principalmente, a possibilidade de

ajuste do fluxo de saída da coluna cromatográfica com a da taxa de aspiração da amostra do nebulizador pneumático dos ICPs. A interface acaba sendo muito simples, sendo que a tubulação (normalmente de PEEK) que sai da coluna cromatográfica (ou detector molecular) se conecta à entrada do nebulizador. No entanto, para responder simultaneamente ao acionamento do comando de inicialização de corrida do HPLC, o ICP OES necessita de uma placa de comunicação, a qual irá receber a informação do HPLC (via um cabo trigger de comunicação) para iniciar a leitura.

Nos acoplamentos de ICP OES e ICP-MS com HPLC, a maneira como a amostra é nebulizada e introduzida no plasma é de suma importância para o alcance de detectabilidade suficiente para execução de uma análise de especiação. Diversos nebulizadores podem ser utilizados para análises de especiação, estão entre os mais utilizados o nebulizador concêntrico, o nebulizador ultrassônico e o nebulizador de injeção direta (DIN e DIHEN) (MONTASER, 1998).

Um dos problemas que podem acontecer no acoplamento entre técnicas de separação e de detecção elementar é a perda de resolução entre os tempos de retenção de cada analito. Para os casos de ICP OES e ICP-MS, por exemplo, a amostra na maioria das vezes deve ser nebulizada e transferida até o plasma através de uma câmara de nebulização. Esse processo passa a ser um elemento dispersivo, que gera uma perda de resolução temporal. Tal perda, pode ser praticamente anulada com o uso dos nebulizadores DIN e DIHEN, com os quais a amostra é nebulizada diretamente no plasma (CARUSO *et al.*, 2003).

No entanto, grande parte dos problemas analíticos envolvendo especiação elementar utilizam nebulizadores concêntricos associados a câmaras de expansão de pequeno volume, como as ciclônicas, em alguns casos com restrição.

O ajuste entre o fluxo da fase móvel, eluída da coluna cromatográfica, com a taxa de aspiração da amostra para introdução nos ICPs, utilizando nebulizadores concêntricos e câmaras de pequeno volume são os principais requisitos instrumentais para realizar o acoplamento, seja com ICP-MS ou ICP OES, para se ter sucesso na análise de especiação.

2. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi demonstrar a viabilidade do acoplamento entre as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP OES) em um equipamento da Thermo Fisher Scientific, visando análise de especiação elementar de espécies com maiores concentrações na amostra. A identificação de metaloproteínas em amostras de castanha de caju foi utilizada para demonstrar a viabilidade do acoplamento.

3. Materiais e Métodos

3.1 Instrumentação

Para a pesagem das amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica da marca Ohaus Adventurer – Balanças Analíticas de Precisão (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão analítica de até 0,0001g.

Um medidor de pH da Unity, com resolução de 0,01 e precisão de $\pm 0,1$, foi utilizado durante os ajustes de pH das amostras.

Uma mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil), foi usada para promover a homogeneização das misturas preparadas de amostras e soluções extratoras.

Uma centrífuga, modelo Q222TM (Quimis Aparelhos Científicos Ltda.), foi empregada na separação do sobrenadante das misturas preparadas de amostras e soluções extratoras.

Foi utilizado para digestões totais das amostras um digestor de micro-ondas, modelo SpeedWave Four (Beghoff, Eningen, Alemanha) com controle individual de temperatura e pressão nos frascos, gerador de micro-ondas não pulsante com potência de 1450 watts. Foram utilizados 12 frascos, modelo DAP 60, de 60 mL, confeccionados em PTFE-TFM, operando em condições máximas de pressão de 40 bar, temperatura de 260 °C e uma quantidade máxima sugerida de matéria orgânica de 500 mg.

Como método para a determinação elementar foi utilizado o ICP OES com vistas axial e radial, detector simultâneo CID (Charge Injection Device – quarta geração RACID86), modelo iCAP 6300 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Reino Unido). Este ICP OES é constituído por uma óptica chamada DUO, a qual permite leituras de altas concentrações em visão radial e baixas concentrações na visão axial. O intervalo espectral de trabalho é de 166 à 847 nm, gerado pelo sistema de difração Policromador Littrow com rede de difração Echelle (52,91 Linhas /mm). O gerador de rádio frequência (27,12 MHz) de estado sólido permite selecionar potências entre 750 e 1350 W. Foram utilizados ainda uma tocha tipo EMT, um nebulizador concêntrico e uma câmara de nebulização tipo ciclônica.

Como técnica de separação e detecção molecular foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, modelo Accela 600 (Thermo Fisher

Scientific), equipado com uma bomba quaternária de alta resolução, com programador de gradientes, amostrador automático e detector PDA. Uma coluna de exclusão por tamanho (Superose 12 10/300, Amersham Biosciences) foi empregada na separação de metaloproteínas, utilizando uma alça de amostragem com capacidade de 100 μL .

3.2 Reagentes e soluções

Como se trata de um estudo envolvendo a determinação de baixas concentrações de elementos, cuidados especiais foram tomados para evitar contaminações e, conseqüentemente, resultados errôneos. As soluções de referência foram preparadas em capela de fluxo laminar (classe 100), a partir de diluições das soluções estoques empregando reagentes com alto grau de pureza. Toda a vidraria e recipientes para o preparo e armazenagem de soluções foram lavados com detergente, posteriormente imersos durante 24 horas em solução de HNO_3 10% (v v^{-1}).

Todas as soluções foram preparadas com água de elevado grau de pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), obtida em um deionizador com sistemas de ultrapurificação Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA).

Ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados na preparação das soluções analíticas de referência e no preparo das amostras. Ácido nítrico também foi utilizado na descontaminação de vidrarias e recipientes. As soluções analíticas de referência foram preparadas a partir de soluções padrão em estoque (Merck, Darmstadt, Alemanha), contendo 1000 mg/L

de Fe^{III} em meio de 0,1% (v v⁻¹) de HCl e Ca^{II} , Mg^{II} , Mn^{II} , Ni^{II} e Zn^{II} , em meio de 0,1% (v v⁻¹) de HNO_3 .

As extrações da fase lipídica das amostras de castanhas de caju foram executadas com uma mistura contendo clorofórmio e metanol (Merck).

A extração de proteínas foi empregada com soluções de NaOH, preparada a partir da diluição do hidróxido de sódio sólido (Merck).

A fase móvel Tris-HCl, 0,2 mol L⁻¹, pH 7,4 foi preparada a partir de tris-(hidroximetil)-aminometano (Merck), ácido clorídrico (Merck) e água deionizada.

Para calibração da coluna Superose 12 10/300 foi utilizada uma mistura de aprotinina (7 kDa), aldolase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ferritina (300 kDa), ovalbumina (45 kDa), ribonuclease (9 kDa), e blue dextran 2000 (para cálculo do volume morto) da GE Healthcare (Amersham Biosciences, Corp., EUA).

As amostras de castanha de caju foram adquiridas no Mercado Municipal Paulistano, localizado na Rua da Catareira, n° 306, Parque Dom Pedro II, São Paulo, Brasil.

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Acoplamento LC-ICP OES

Para que o ICP OES pudesse adquirir sinais de emissão ao longo de um tempo determinado, ou seja, para que o equipamento pudesse coletar um sinal transiente, foi necessário executar algumas modificações. Para isso foram feitas alterações na placa eletrônica principal do equipamento (Figura 3), foi trocada a

caixa de gases (Figura 4) e toda a tubulação de água interna do equipamento, que antes era de cobre, passou a ser de plástico.

As alterações executada na placa e o motivo da mudança da caixa de gases estará descrita nos resultados. Além da possibilidade de aquisição de dados de maneira transiente, o equipamento passou a ter controle de fluxo do gás do plasma.

Figura 3. Placa eletrônica principal alterada para aquisição de sinal transiente.

Figura 4. Desenho esquemático da caixa controladora dos gases que foi substituída no ICP, com as indicações das entradas e saídas dos gases.

Após as adaptações do detector, caixa de gases e tubulações foram feitos testes para avaliar a resposta do ICP OES. Em seguida, foi feito o acoplamento entre as técnicas de HPLC e ICP OES, conectando-se a tubulação de saída do detector UV do HPLC, no capilar de aspiração de amostra do nebulizador do ICP OES. As tubulações do HPLC são todas de PEEK, eliminando possíveis contaminações durante a transferência das espécies separadas até o ICP OES.

Os softwares do HPLC e ICP OES trabalharam de maneira independente, sendo necessário dar o comando de início de leitura em dois computadores diferentes. Para avaliação da diferença entre o volume de eluição entre o cromatograma com detecção molecular e o cromatograma com detecção elementar, foi feito um ensaio onde uma solução de ferritina foi eluída no sistema acoplado, e em seguida, foi avaliado a diferença de volume de eluição referente à ferritina nos dois cromatogramas.

Foi necessário também ajustar a rotação da bomba peristáltica do ICP OES para que estivesse condizente com o fluxo da bomba do HPLC. Isso foi feito para evitar perda na qualidade da separação cromatográfica e gerar bolhas no interior da coluna cromatográfica. Com auxílio de uma proveta foi medido qual volume de tampão Tris-HCl era aspirado em cada umas das rotações da bomba peristáltica.

3.3.2 Determinação elementar total

Para a determinação elementar total, as castanhas foram preparadas a partir de digestão ácida assistida por micro-ondas. A mistura ácida e o programa de

aquecimento utilizadas na digestão total das amostras estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros adotados para a digestão total da castanha de caju e concentrações ácidas empregadas.

Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)	Potência (%)
140	10	2	80
180	5	5	80
200	5	12	80
50	0	20	0
Mistura ácida: 2mL de HNO ₃ + 1 mL de H ₂ O ₂ + 3mL de H ₂ O			
Massa de castanha pesada: 200 mg			

Após a digestão, as soluções foram diluídas para 15 mL com água deionizada.

Segundo procedimento semelhante foram digeridos dois materiais de referência certificados NIST-1515 (apple leaves) e NIST-1547 (peach leaves) para avaliar a exatidão do método proposto.

Os parâmetros instrumentais do ICP OES foram determinados antes das determinações, a partir de uma série de ensaios de otimizações, com o intuito de estabelecer e avaliar a robustez do método. Foram considerados os seguintes parâmetros: repetibilidade, seletividade, estabilidade e robustez (POUSSEL *et al.*, 1995).

A seletividade foi estimada avaliando a largura da meia altura da base do sinal de emissão da linha iônica de Ba(I), no comprimento de onda de 230,424 nm, utilizando uma solução de 1 mg L⁻¹ de Ba²⁺ diluída em água.

A repetibilidade foi estimada a partir das flutuações (RSD) de 20 medidas consecutivas do sinal de emissão da linha atômica de Mg, em 285,213 nm, usando solução de 1 mg L⁻¹ de Mg²⁺ diluída em água.

A robustez foi determinada avaliando a razão entre os sinais de emissão das linhas iônica e atômica do Mg, Mg(II) (280,270 nm) / Mg(I) (285,213 nm) e multiplicando pelo fator de correção (ϵ), que foi calculado pela razão do sinal de fundo das respectivas linhas de emissão do Mg(II) (280,270 nm) / Mg(I) (285,213 nm) para o branco analítico (HNO₃ 0,5% v v⁻¹), usando solução de 1 mg L⁻¹ de Mg²⁺ diluída em água.

Para avaliação da estabilidade em curto e longo prazos foi observado o RSD do sinal de emissão da linha de Ar(I) 404,442 nm, executando 20 medidas a cada 30 minutos.

Os parâmetros encontrados para a melhor robustez foram os utilizados nos ensaios descritos a seguir. A faixa de avaliação para cada parâmetro foi a seguinte:

- Potência RF aplicada na bobina de indução – de 950 a 1300 W;
- Vazão do gás auxiliar – de 0,5 a 1,5 L min⁻¹;
- Vazão do gás de nebulização – de 0,45 a 0,62 L min⁻¹;
- Vazão do gás de plasma – de 10 a 14 L min⁻¹;
- Rotação da Bomba – de 30 a 50 rpm.

Os limites de detecção para os elementos Cu, Fe, Mg e Zn, nas amostras de castanha de caju, foram calculados segundo da literatura (THOMSEN, 2000), que sugere, para cálculos de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), a inclusão dos sinais de concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e os desvios padrões relativos (RSD) de 10 medições do branco analítico. Segue abaixo as equações utilizadas para o cálculo de LOD:

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad LOD = \frac{3 \times BEC \times R.S.D.}{100}$$

Onde, C_{sr} é a concentração da solução de referência; I_{sr} e I_{branco} são as intensidades dos sinais de emissão relacionadas às soluções de referência e branco analítico, respectivamente.

3.3.3 Extração de proteínas da castanha de caju

O método empregado para extração de proteínas da castanha de caju foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Espectroscopia Aplicada (LEA), IQ-USP (NASCIMENTO, 2011). O método consiste numa série de etapas descritas a seguir:

- a) Trituração das castanhas em um multiprocessador de alimentos por um intervalo de tempo de 5 min;
- b) Pesagem de cerca de 4 g do triturado em tubo de polipropileno de 50 mL;
- c) Extração da fase lipídica com 30 mL de solução contendo metanol /clorofórmio, na proporção de 2:1;
- d) Separação da solução extratora e resíduo foi realizada em um sistema de Millipore com membrana de éster de celulose de 0,45 µm de poro;
- e) Extração de proteínas utilizando 30 mL de solução 1 mol L⁻¹ de NaOH;
- f) Agitação da mistura em um agitador automático por 1 h a uma velocidade de rotação de 350 rpm;

- g) Centrifugação da solução e coleta do sobrenadante;
- h) A solução extratora contendo as proteínas ainda foi submetida a uma etapa de limpeza (clean-up), utilizando acetona como agente precipitante. Precipitação com acetona na proporção 1:4 v v⁻¹ (solução extratora:acetona);
- i) Centrifugação e coleta do precipitado;
- j) O precipitado então foi ressuspensão com Tris-HCl (pH 7,4) e injetado no sistema SEC-UV-ICP OES.

Um esquema do procedimento experimental utilizado está descrito no diagrama apresentado na Figura 5.

Figura 5. Diagrama do procedimento experimental de preparo de amostra para extração de proteínas de castanha de caju.

3.3.4 Análise de especiação no sistema SEC-UV-ICP OES

Para obtenção do perfil molecular do extrato obtido no preparo da amostra, foi executada uma varredura na detecção do sistema HPLC, com amostra, de forma a monitorar o intervalo de comprimento de onda do UV-Vis, entre 200 e 360 nm, ao longo da corrida cromatográfica. Executado esse teste, foram estipulados dois comprimentos de onda (225 nm e 265 nm), no detector UV do HPLC, a fim de dar continuidade aos ensaios. O comprimento de onda de 265 nm esta em conformidade com a literatura (SNYDER *et al.*, 2010).

As condições utilizadas no ICP OES quando acoplado ao HPLC, foram as mesmas utilizadas para as determinações elementares totais, com exceção da rotação da bomba peristáltica, a qual foi ajustada para que a vazão de entrada de amostra no nebulizador estivesse compatível com a vazão da bomba quaternária do HPLC. Já os parâmetro instrumentais para o HPLC nos ensaios de fracionamento no sistema acoplado estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros instrumentais adotados para as separações no HPLC (volume de injeção de 100 uL)

Parâmetro	Valor
Detector	Arranjo de Diodo
Coluna	Superose 12 10/300
Fluxo de Injeção	0,5 L/min
Volume de Injeção	90 µL
Fase Móvel	Tris/HCl pH 7,4

Para estimar o peso molecular de cada uma das frações proteicas encontradas no cromatograma, foi executada a calibração da coluna Superose 12 10/300. Para fazer essa estimativa devemos levar em consideração o volume ocupado pela fase móvel no interior dos poros da fase estacionária (V_i); o volume de fase móvel fora dos poros (V_0); a soma desses dois volume, ou seja, o volume total dentro da coluna (V_T). Moléculas de pesos moleculares maiores, não entram nos poros e são eluídas por V_0 . Moléculas menores e proteínas com tamanho intermediário, serão eluídas em volumes entre V_i e V_0 . O coeficiente que indica o quanto uma molécula penetra nos poros é dado pelo coeficiente de distribuição K_D , que depende da volume de fase móvel (V_R):

$$K_D = \frac{V_R - V_0}{V_i}$$

Como toda fase da fase estacionária deve ser considerada, e existe uma dificuldade de se medir V_i , o coeficiente de distribuição foi expresso como K_{AV} :

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

Considerando uma série de compostos de densidade e formas similares, observa-se uma relação entre K_{AV} e o logaritmo das suas massas moleculares (log. PM).

Sendo assim, foi injetado 100 μ L de uma mistura de aprotinina (7 kDa), aldolase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ferritina (300 kDa), ovalbumina (45 kDa) e ribonuclease (9 kDa). Os pesos moleculares dessas espécies foram estimado

através da construção de uma curva analítica de calibração que relaciona o logaritmo dos pesos moleculares (COLLINS *et al.*, 1997).

Para a avaliação da diferença entre os cromatogramas molecular e elementar, monitorados em função do volume de eluição, foi feito um experimento para sincronizar o tempo de acionamento dos softwares do HPLC e do ICP OES. Para isso foi utilizado uma solução de ferritina (500 mg mL^{-1}) que permitiu a detecção por ambos detectores.

O modo de aquisição de dados do detector do ICP OES também foi avaliado, uma vez que esse parâmetro pode afetar a resolução cromatográfica, e também a capacidade de detecção do ICP OES. Nessa investigação foi analisado no sistema acoplado 500 mg mL^{-1} de ferritina, em 3 diferentes ciclo de integração de sinal: 0,5; 1 e 2 segundos.

Para definição da massa a ser utilizada na extração de proteínas, com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, levou-se em consideração que a concentração das metaloproteínas que poderiam ser extraídas no processo deveriam ser alta o suficiente para que fossem detectáveis no sistema HPLC-ICP OES. Wuilloud *et al.* utilizaram uma massa de 0,1 gramas de castanhas de caju para a extração de proteínas com subsequente análise num sistema acoplado HPLC-ICP-MS (WUILLLOUD, *et al.* 2004). No entanto, como no ICP OES a sensibilidade é menor do que o ICP-MS, e o modo de aquisição de sinais transientes, num determinado ciclo de integração, pode também comprometer a sensibilidade, as massas escolhidas para os ensaios de extração foram 0,5; 2,5 e 4 gramas. O ensaio foi executado observando-se os sinais de zinco.

4. Resultados e Discussão

4.1. Modificações no ICP OES para o acoplamento com HPLC

A primeira etapa executada para que o acoplamento fosse possível foram as alterações nos parâmetros instrumentais do ICP OES. O modelo de equipamento instalado no Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria (GAPE), não possuía a capacidade de adquirir sinais transientes. Então, o intuito das mudanças foi exatamente proporcionar a capacidade de realizar medidas de sinais transientes no instrumento. Essas mudanças permitiriam a geração de um cromatograma elementar com o detector ICP OES. Após as modificações, o ICP OES que antes era do modelo iCAP 6300, passou a ser semelhante ao modelo iCAP 6500.

A primeira mudança para que se executasse o *upgrade* do instrumento foram algumas alterações na placa principal do ICP OES. Tanto um modelo quanto o outro (iCAP 6300 e iCAP 6500), possuem a mesma eletrônica. Porém, a diferença da placa mãe, entre os dois modelos, está no caminho do circuito eletrônico característico de cada um dos equipamentos. A simples mudança no caminho do circuito eletrônico converte um modelo em outro. Esta alteração habilita o software a reconhecer algumas novas funções, entre elas, aquela que possibilita a realização de medidas em modo transiente.

O modelo iCAP 6500 da Thermo Scientific, possui uma caixa de gases mais avançada do que o modelo iCAP 6300. Portanto, para que não ocorresse nenhum problema de comunicação entre hardware e software, foi necessário também a troca da caixa de gases do instrumento. Assim, foi possível o *upgrade* de modelos, permitindo que o iCAP 6300 fizesse aquisição de sinais transientes, necessários

para o acoplamento entre HPLC - ICP OES. A troca da caixa de gases trouxe alguns outros benefícios para o instrumento, tais como:

- O equipamento passou a ter a capacidade de variar o fluxo do gás do plasma. Essa capacidade permitiu que tal parâmetro fosse otimizado nas determinações.
- A rotação da bomba peristáltica, o fluxo de gás do plasma, o fluxo do gás auxiliar, o fluxo do gás de nebulização, e a potência de radiofrequência puderam ser variadas automaticamente pelo software do equipamento. Esse modo automatizado permitiu celeridade na otimização dos procedimentos analíticos.
- Todas as tubulações de gases internas do equipamento, que antes eram cobre, passaram a ser de plástico por conta das conexões com a nova caixa de gases. Cabe ressaltar que a troca da tubulação de gases faz parte do procedimento de manutenção do instrumento.

4.2. Otimização das condições do ICP OES

Após as modificações instrumentais no ICP OES para permitir o acoplamento com o HPLC foram feitas otimizações para avaliar se o equipamento estava operando com o mesmo desempenho de antes. Utilizando um nebulizador concêntrico e uma câmara de nebulização ciclônica foi feito uma série de ensaios para determinar as condições robustas de operação para o ICP OES, seguindo recomendações da literatura (POUSSEL *et al.*, 1995; MERMET *et al.*, 1997).

A sensibilidade foi estimada de acordo com a largura relativa à meia altura do sinal de emissão de Ba (II) no comprimento de onda 230,424 nm. Esse comprimento

de onda foi escolhido por estar numa faixa espectral em que se encontram a maioria das linhas de emissão dos elementos de interesse. O valor encontrado foi de 7 pm que pode ser considerado muito bom para resolução.

A estabilidade do plasma ao longo dos 15 minutos iniciais mostrou resultados com RSD < 0,50%. Ao longo de todo o tempo de medida, desde o tempo zero até 2 horas, o RSD das medidas da intensidade de sinal de Ar no comprimento de onda 404,442 nm manteve-se <1%. Esses valores indicam que o ICP OES utilizado apresentou muito boa estabilidade temporal de curto e longo tempo.

A robustez de um método para o ICP OES é a medida da capacidade que o ICP tem de suportar variações na matriz da amostra sem que os sinais analíticos obtidos se alterem significativamente, causando mudanças nos resultados (MERMET *et al.*, 1997). Essa avaliação de robustez foi executada calculando-se a razão entre as intensidades das linhas de emissão iônica (Mg (II) 280,270 nm) e atômica (Mg (I) 285,213 nm) do elemento magnésio. Quando encontrado valores acima de 10, o ICP OES está operando em condições consideradas notáveis, sendo pouco sensível aos efeitos de matriz. Enquanto uma razão Mg (II)/Mg (I) abaixo de 4, indica que é necessário que o método seja aperfeiçoado.

Para ICP OES com visão axial, a recomendação é que a razão Mg (II)/Mg (I) deva ser multiplicada pelo fator ϵ , que corresponde a razão dos valores de intensidade dos sinais de fundo (S_x) nas duas linhas espectrais monitoradas (STEPAN *et al.*, 2001). De acordo com Stepan esse fator irá corrigir desvios da óptica. Nesse estudo, o valor encontrado foi de 1,10.

Como pode ser observado na Figura 6, a razão Mg (II)/Mg (I) aumentou com a potência da radiofrequência, mantendo-se constante a partir de 1200 W. Com o

intuito de conservação da fonte de radiofrequência e tocha que pode ter maior desgaste para maiores potências, esse parâmetro foi fixado em 1200 W.

Figura 6. Valores da razão Mg (II)/Mg (I) em função da potência de radiofrequência aplicada.

O fluxo de amostra que é introduzido na câmara de nebulização está diretamente ligado à rotação da bomba peristáltica. O fluxo de amostra influencia diretamente a eficiência de nebulização (e.g. tamanho das gotas do aerossol) o que pode interferir na robustez do plasma. No gráfico (Figura 7) podemos observar que a influência desse parâmetro não foi significativa ao longo das diferentes rotações da bomba peristáltica. Nesse sentido, foi escolhido como valor ótimo de rotação 25 rpm (0,3 L/min) para as determinações das concentrações totais. Com o intuito de executar o acoplamento do HPLC com o ICP OES, foi adotado a rotação de 40 rpm, condizente com o fluxo de eluente proveniente da bomba do HPLC, para o estudo de especiação.

Figura 7. Valores da razão Mg (II) / Mg (I) em função da rotação da bomba peristáltica, considerando potência de radiofrequência de 1200 W.

A vazão de gás auxiliar influencia a transferência de energia do plasma para a amostra. Vazões muito altas acabam por prejudicar os processos de atomização e ionização. Por isso, observamos uma tendência de baixa robustez em vazões mais altas (Figura 8). Considerando a maior razão Mg(II) / Mg(I) , o valor escolhido foi de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

Figura 8. Valores da razão Mg (II) / Mg (I) em função da vazão do gás auxiliar, considerando potência de radiofrequência de 1200 W e rotação da bomba peristáltica de 40 rpm.

No ensaio do gás do plasma foi observado um comportamento de maior robustez em vazões em torno de 14 L min^{-1} (Figura 9). Em vazões maiores ou menores que esse valor, a robustez tem a tendência de diminuir, sendo mais significativa para valores mais altos de vazões de Ar.

Figura 9. Valores da razão Mg (II) / Mg (I) em função da vazão do gás do plasma, considerando potência de radiofrequência de 1200 W, rotação da bomba peristáltica de 40 rpm e vazão de gás auxiliar de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

A vazão do gás de nebulização está diretamente relacionada com o tempo de residência da amostra no plasma. A robustez teve um aumento gradativo até valores em torno de $0,45 \text{ L min}^{-1}$ de gás de nebulização, em seguida mostrou ligeira queda (Figura 10). Com base nesses resultados foi escolhida a vazão do gás de nebulização de $0,45 \text{ L min}^{-1}$.

Figura 10. Valores da razão Mg (II) / Mg (I) em função da vazão do gás de nebulização, considerando potência de radiofrequência fixada de 1200 W, rotação da bomba peristáltica de 40 rpm, vazão de gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹, vazão do gás de nebulização de 0,45 L min⁻¹ e vazão do gás do plasma de 14 L min⁻¹.

Todos os melhores parâmetros encontrados após o estudo de otimização estão apresentados na Tabela 3. Esses parâmetros foram os mesmo adotados tanto para as determinações totais como para o acoplamento com o HPLC para detecções de espécies, exceto a rotação da bomba peristáltica que foi 25 rpm e 40 rpm, respectivamente.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais adotados para as determinações totais e das espécies no ICP OES.

Parâmetro	Valor
Potência de radiofrequência (W)	1200
Rotação da bomba (rpm)	40
Vazão do gás de nebulização (L /min)	0,45
Vazão do gás auxiliar (L /min)	0,50
Vazão do gás do plasma (L /min)	10

4.3. Determinações das concentrações totais dos elementos

As determinações das concentrações totais dos elementos Ca, Mg, Fe, Cu, Ni, Mn e Zn nas amostras de castanhas de caju ($n=5$) estão apresentadas na Tabela 4. Também estão apresentados os valores das concentrações obtidas para os materiais de referência certificados NIST-1515 (apple leaves) e NIST-1547 (peach leaves). Os valores encontrados para os materiais de referência estão em um intervalo de confiança de 95%, quando utilizado o teste t pareado (URIANO, 1982). Isso indica que o método apresenta exatidão aceitável, levando-se em consideração o preparo de amostra e a medida no ICP OES.

Foram adicionadas aos dados da Tabela 4 as concentrações dos elementos de interesse esperadas em castanhas de caju, publicadas na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Os resultados obtidos nesse trabalho estão condizentes com os reportados na TACO, indicando que a concentração desses elementos é relativamente constante nesta amostra. Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) do método de determinação dos elementos em castanhas também estão expressos na Tabela 4.

Os dados das concentrações totais dos elementos de interesse na castanha de caju podem ser usados apenas como ponto de partida num estudo sobre o valor nutricional desse alimento. Isso porque nem todo o teor de nutrientes presentes em um alimento é absorvido por nosso organismo. Portanto é necessário o emprego de ensaios *in vitro* ou *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade de um nutriente.

Tabela 4. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, e Zn em amostras de castanha de caju e nos materiais de referência SRM 1515 e SRM 1547, assim como os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o método de determinação de tais elementos em castanha de caju.

Amostra	Ca (% m/m)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Castanha de Caju (ICP OES)	0,036 ± 0,006	26,27 ± 5,00	47,92 ± 8,80	0,3 ± 0,04	25,61 ± 3,95	24,76 ± 1,89	66,31 ± 2,42
SRM 1515 (ICP OES)	1,54 ± 0,05	5,39 ± 0,21	83,62 ± 3,53	0,248 ± 0,006	51,03 ± 0,82	0,84 ± 0,02	11,16 ± 0,47
SRM 1515 (Teores Certificados)	1,526 ± 0,015	5,64 ± 0,24	83 ± 5	0,257 ± 0,008	54 ± 3	0,91 ± 0,12	12,5 ± 0,3
SRM 1547 (ICP OES)	1,57 ± 0,06	3,44 ± 0,11	203,06 ± 6,44	0,41 ± 0,01	94,89 ± 0,97	0,63 ± 0,02	17,11 ± 0,86
SRM 1547 (Teores Certificados)	1,56 ± 0,02	3,7 ± 0,4	218 ± 14	0,432 ± 0,008	98 ± 3	0,69 ± 0,09	17,9 ± 0,4
LD (µg L ⁻¹)	0,003	0,561	1,080	0,011	0,090	0,805	0,645
LQ (µg L ⁻¹)	0,011	1,862	3,615	0,345	0,311	2,670	2,150

4.4. Acoplamento HPLC-ICP OES

O acoplamento entre as técnicas de HPLC e ICP OES foi executado conectando-se a tubulação de saída do detector de arranjo de diodos (PDA) do HPLC com a entrada de amostras do nebulizador do ICP OES. Vale ressaltar que a distância entre a saída do detector do HPLC e o nebulizador do ICP OES deve ser a menor possível, para evitar dispersões e, conseqüentemente, prejuízo na resolução. O uso da bomba peristáltica do ICP OES em 40 rpm teve que ser adotado para compatibilizar com a vazão da bomba do HPLC, mesmo não sendo essa aquela adotada nas otimizações. No entanto, a rotação da bomba peristáltica não influenciou significativamente a robustez do ICP OES (Figura 7). Desse modo, o fluxo de fase móvel entre o HPLC e ICP OES foi compatibilizado em 0,5 L min⁻¹.

Os softwares do HPLC e ICP OES utilizados nessa pesquisa trabalhavam de maneira independente, sendo necessário, portanto, acionar o comando de início de leitura em dois computadores diferentes. Os dados obtidos eram exportados de cada software separadamente, sendo necessário um tratamento posterior. No iTeva, software utilizado no ICP OES, pode-se obter o dado bruto do detector, sendo necessário ainda calcular a função derivada desses dados para que os resultados finais fossem apresentados na forma de um cromatograma convencional (sinal vs tempo). Para esse procedimento foi utilizado o software Origin Pro 8.0.

Com o intuito de sincronizar o tempo de acionamento dos softwares do HPLC e do ICP OES, solução de ferritina (500 mg L⁻¹) foi injetada na coluna cromatográfica do sistema acoplado. Os cromatogramas obtidos com esse experimento estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Sobreposição do perfis dos sinais moleculares(---) e elementares (---), para a molécula de Ferritina. (Condições: coluna Superdex 12, volume de injeção 100 μ L, fase móvel Tampão Tris-HCl, pH = 7,4)

Pode-se observar que praticamente não houve diferença significativa de volume de eluição entre os dois perfis cromatográficos. A diferença exata foi de 0,1 mL, tomando como base os picos de intensidades mais elevadas (~ 10 mL). Esse resultado indicou que a inicialização da leitura do dois instrumentos estava ocorrendo com diferenças mínimas, e que o volume morto, referente à tubulação da interface entre os dois equipamentos, estava dentro de um valor aceitável. Sendo assim não foi necessário realizar nenhum tipo de tratamento matemático para a interpretação dos dois cromatogramas (molecular e elemental).

O modo de aquisição de dados do detector do ICP OES também foi avaliado, uma vez que esse parâmetro pode afetar a resolução cromatográfica, e também a capacidade de detecção do ICP OES. O modo de aquisição está relacionado com o número de ciclos de integração de sinal durante o tempo de leitura. Em geral, quanto

menor o número de ciclos de integração para um determinado volume de eluição, melhor a resolução, porém, menor a capacidade de detecção, pois implica em menor acúmulo de sinal de emissão em cada volume. Por isso foi necessário estabelecer uma relação de compromisso entre resolução e capacidade de detecção. Dessa forma, para avaliação dessa relação, a ferritina foi analisada no sistema acoplado, em 3 diferentes ciclos de integração de sinal: 0,5; 1 e 2 segundos. Na Figura 12 estão representados os cromatogramas obtidos em cada um dos ciclos de integração.

Figura 12. Sobreposição do perfil elementar da molécula de ferritina nos tempos de ciclo de integração do ICP OES de 0,5 s (---), 1 s (---), e 2 s (---).

A diferença dos cromatogramas em os diferentes ciclos de integração de sinais foi irrelevante. Para o ciclo de integração de 2 segundos, houve pequena melhora na capacidade de detecção do ICP OES, porém com pequeno deslocamento da linha de base, o que poderia comprometer a resolução cromatográfica. Para o intervalo de tempo de 0,5 segundo, houve perda na

capacidade de detecção, e não foi possível observar melhora na resolução. A partir desse estudo foi escolhido o ciclo de integração de 1 segundo, garantindo o compromisso entre resolução e capacidade de detecção.

4.5. Extração de proteínas em castanha de caju

Para definição da massa a ser utilizada na extração de proteínas, com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, foi executado um ensaio em que avaliou-se a intensidade de emissão do Zn referente aos extratos proteicos obtidos a partir de 3 diferentes massas de amostra: 0,5; 2,5 e 4 gramas. Os cromatogramas obtidos para os ensaios de extrações de proteínas para as diferentes massas de amostra (0,5; 2,5 e 4 gramas) estão descritos na Figura 13.

Figura 13. Sobreposição dos perfis elementares de Zinco em castanha de caju para as seguintes massas de extratos 0,5 g (---), 2,5 g (---), e 4 g (---). (Condições: coluna Superdex 12, volume de injeção 100 μL , fase móvel Tampão Tris-HCl, pH = 7,4)

Nota-se que com a solução extratora proveniente da extração com 0,5 grama de amostra, não foi possível observar sinais de emissão significativos para o zinco. Para a massa de 2,5 gramas de amostra foi possível observar sinais cromatográficos de emissão bem definidos e, finalmente, para a massa de 4 gramas o sinal de emissão foi o mais intenso. Desta forma, massa de 4 gramas foi escolhida para dar continuidade aos estudos. Massas superiores a 4 gramas não produziram resultados satisfatórios, pois formaram-se soluções de alta viscosidade prejudicando qualquer separação cromatográfica. Além disso, essas soluções de extratos muito concentrados ficavam com grande quantidade de partículas em suspensão, exigindo procedimentos de centrifugação ou filtração que poderiam levar a perdas da espécies de interesse.

4.6. Calibração da coluna cromatográfica

A coluna utilizada foi a Superose 12 10/300 GL (GE), que foi calibrada utilizando-se um kit recomendado pelo fabricante da coluna. As proteínas utilizadas para calibração foram: Aprotinina 7 kDa, Aldolase 36 kDa, Anidrase Carbônica 29 kDa, Ferritina 450 kDa, Ovalbumina 45 kDa e Ribonuclease 9 kDa. Os valores de K_{av} possuem relação logarítmica com as massas molares dos compostos ($\log MM$). Sendo assim, foi possível montar a curva de calibração para avaliar a MM de uma dada proteína. A fórmula utilizada para determinação do massa molecular está apresentada a seguir, sendo: v_e =volume de eluição da proteína, v_o =volume morto (9 ml) e v_c =volume geométrico da coluna (24 ml).

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_T - V_o}$$

A equação da reta e os dados da curva de calibração, apresentados na Figura 14, foram os seguinte: $K_{av} = 0,8275 - 0,27832 \times \log MM$. O intervalo de massa molecular de operação da coluna é de 1 – 300 kDa, sendo compatível com os padrões utilizados para calibração.

Figura 14. Curva de calibração para cálculo de massa molecular obtido na coluna Superose 12 10/300 GL (GE).

A partir desta equação de reta foi possível estimar as massas moleculares das proteínas eluídas ao longo da coluna de exclusão por tamanho utilizada.

4.7. Seleção do comprimento de onda para obtenção do perfil molecular

Para escolha do comprimento de onda que seria utilizado para obtenção do perfil molecular da separação dos extratos proteicos, foi feita uma varredura utilizando o detector PDA do UV-Vis do HPLC. Foi feita a injeção no HPLC do extrato proteico das castanhas de caju e executada a varredura no detector entre os comprimentos de onda de 200 e 360 nm. Foram encontrados duas frações de proteínas que absorvem em dois comprimentos de onda diferentes. A fração proteica de massa molecular no intervalo compreendido entre 6 – 177 kDa absorveu em 225 nm, enquanto a fração proteica de peso molecular em torno de 2 kDa, absorveu na região de 265 nm. Esses resultados estão representados nas Figuras 15 e 16.

Figura 15. Varredura no detector PDA entre os comprimentos de onda de 200 e 360 nm para injeção do extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 16. Perfil molecular do extrato proteico de castanhas de caju nos comprimentos de onda de 225 (---) e 265 (---) nm.

Os perfis moleculares obtidos nos dois comprimentos de onda mostram que eles são complementares, ou seja, em 225 nm é observada maior absorbância na região entre 6 e 177 kDa, já em 265 nm é observada maior absorbância na região de 2 kDa. Porém é possível observar absorbância num intervalo de 2 a 177 kDa nos dois comprimentos de onda. Sendo assim, com base no cromatograma da Figura 16, onde é possível observar diferentes informações obtidas nas diferentes condições de medida, os dois comprimentos de onda foram selecionados para os estudos posteriores.

4.8. Perfis moleculares e elementares obtidos dos extratos de castanha de caju

A amostra de castanha de caju foi submetida à extração lipídica com mistura metanol/clorofórmio na proporção de 1:2, extração de proteínas com solução 1,0 mol/L de NaOH e em seguida uma etapa de clean-up com precipitação das proteínas com acetona na proporção 1:4 v/v (solução extratora:acetona). A extração lipídica foi necessária para evitar problemas na extração das proteínas e na separação, pois esses compostos são insolúveis no tampão utilizado e poderiam comprometer o preparo da amostra e a injeção na coluna cromatográfica. A extração com NaOH 1,0 mol L⁻¹ não é seletiva para proteínas, podendo extrair proteínas de pesos moleculares diversos e outros compostos. Na tentativa de selecionar somente as proteínas que foram extraídas adotou-se uma etapa de *clean-up*, que consistiu na adição de acetona ao meio extrator com intenção de diminuir a solubilidade das proteínas e separá-las por centrifugação. Logo após, as proteínas precipitadas foram redissolvidas em tampão Tris-HCl, pH=7,4 e então 100 µL injetados no sistema HPLC-ICP OES. Os cromatogramas com perfis moleculares, em dois comprimentos de onda, obtidos no HPLC e perfis elementares obtidos no ICP OES para os elementos Cu, Fe, Mg, Zn, P e S estão apresentados nas Figuras 17 a 22, respectivamente.

Os elementos escolhidos para monitoramento elementar foram Cu, Fe, Mg e Zn. De acordo com Arruda *et. al* (Arruda, et. al.; 2006) Cu, Fe e Zn possuem fortes interações com proteínas, enquanto o Mg possui interação moderada. Os elementos P e S foram analisados pois são reconhecidamente elementos constituintes de grupos proteicos. Desta forma a apresenta em altas concentrações desses elementos

nas frações separadas poderiam ser utilizados como um indício da presença de proteínas que poderiam ser correlacionadas com o perfil elementar.

Avaliando os resultados apresentados nas Figuras 17 a 22, nota-se que a correlação entre os perfis cromatográficos moleculares e elementares se deu em regiões com massa moleculares abaixo de 60 kDa ($V_e = 14$ mL).

O Cu (Figura 17 e 18) apresentou sinal de emissão de baixa intensidade em duas regiões do cromatograma, sendo coincidente com os perfis moleculares de massas moleculares de 2 e 24 kDa. Entre os elementos investigados na separação, cabe ressaltar que o Cu foi o elemento de menor concentração total na amostra de castanha de caju, mesmo assim foi possível a detecção no ICP OES.

Figura 17. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de cobre para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 18. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elemental (--) de cobre para extrato proteico de castanhas de caju.

O elemento ferro (Figuras 19 e 20) foi detectado, com alta intensidade de sinal de emissão, em região de massa molecular em torno de 20 kDa. No entanto é possível identificar também um sinal de baixa intensidade de Fe na região de massa molecular em torno de 2 kDa, melhor evidenciado no comprimento de onda de 265 nm.

Figura 19. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elemental (--) de ferro para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 20. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elemental (--) de ferro para extrato proteico de castanhas de caju.

Para o magnésio (Figuras 21 e 22), o comportamento foi diferente, pois não há correlação do perfil elementar com o perfil molecular, corroborando informações da literatura (ARRUDA *et. al.*, 2006).

Figura 21. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de magnésio para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 22. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de magnésio para extrato proteico de castanhas de caju.

O cromatograma do Zn (Figuras 23 e 24) mostrou correlação com compostos de massas moleculares entre 2 e 24 kDa, sendo que os sinais de emissão de maior intensidade estão no intervalo entre 9 e 24 kDa. Tal como Fe, o Zn também apresentou sinal de emissão de baixa intensidade coincidente com o intervalo de massa molecular em torno de 2 kDa.

Figura 23. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de zinco para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 24. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de zinco para extrato proteico de castanhas de caju.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 25 e 26 retratam os perfis moleculares e elementares de P e os apresentados nas Figuras 27 e 28 os perfis de S. Sabe-se que P é um elemento presente em altas concentrações em proteínas e o perfil elementar apresentado nas Figuras 25 e 26, coincide com o intervalo de massa molecular observado no cromatograma. Com relação ao S, que também é um elemento que está presente em proteínas, porém em menor concentração que P, pode-se observar o aparecimento de sinal de emissão de dois picos na região de peso molecular mais intenso. A detecção desses dois elementos (P e S) em regiões de pesos moleculares de proteínas, pode ser um indício de que de fato as substâncias que foram separadas são proteínas. Resultados semelhantes foram obtidos com coluna Superdex 10 30 para separação e identificação de metaloproteínas em castanha de caju (WUILLLOUD *et al.*, 2004).

Figura 25. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de fósforo para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 26. Perfil molecular em 265 nm(--) e perfil elementar (--) de fósforo para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 27. Perfil molecular em 225 nm(--) e perfil elementar (--) de enxofre para extrato proteico de castanhas de caju.

Figura 28. Perfil molecular em 265 nm (—) e perfil elementar (---) de enxofre para extrato proteico de castanhas de caju.

5. Conclusão

O estudo da avaliação dos parâmetros de mérito do ICP OES foram essenciais que as melhores condições de operação do ICP OES fossem utilizadas. Foi possível observar que o ICP OES iCAP 6300 (com *upgrade* realizado) possui condições consideradas notáveis e opera em condições robustas, ou seja, suporta variações na matriz da amostra sem que os sinais analíticos obtidos se alterem significativamente.

O método de digestão e determinação total de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn em castanhas de caju foi executado alcançando exatidões satisfatórias de acordo com os valores de concentração encontrados para os materiais de referência certificados SRM 1515 e SRM 1547. Além disso, foram calculados os limites de

detecção (LD) e de quantificação (LQ), os quais são suficiente para determinar os elementos em concentrações na faixa de traços.

O *upgrade* executado no ICP OES teve êxito, de forma que o equipamento passou a adquirir o sinal de forma transiente, possibilitando assim a execução do acoplamento e obtenção dos perfis cromatográficos elementares da castanha de caju. As alterações no ICP OES também possibilitaram a capacidade de variar o fluxo do gás do plasma, e assim otimizar esse parâmetro da melhor maneira possível. A rotação da bomba peristáltica, o fluxo de gás do plasma, o fluxo do gás auxiliar, o fluxo do gás de nebulização, e a potência de radiofrequência puderam ser variadas automaticamente pelo software do equipamento, permitindo celeridade na otimização dos procedimentos analíticos.

O acoplamento HPLC-ICP OES foi executado com êxito para a aplicação proposta, sendo que o detector CID do iCAP 6300 (Thermo Scientific), demonstrou alta sensibilidade, mesmo quando utilizado em um modo de aquisição de dados transiente. Ocorreram correlações entre o perfil molecular e o perfil elementar do extrato proteico da castanha de caju. As espécies extraídas ficaram compreendidas numa faixa de peso molecular entre 2 e 177 kDa. Os perfis correlacionados dos metais com o perfil molecular e os perfis de P e S indicam a presença de metaloproteínas nas frações obtidas com a injeção do extrato no sistema HPLC-ICP OES

6. Referências Bibliográficas

ANA ARIAS-BORREGO, TAMARA GARCIA-BARRERA AND JOSÉ L. GOMEZ-ARIZA; **Speciation of manganese binding to biomolecules in pine nuts (Pinus pinea) by two-dimensional liquid chromatography coupled to ultraviolet and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors followed by identification by electrospray ionization mass spectrometry.** Rapid Commun Mass Spectrom:3053-60. 2008.

ALBERTÍ, J.; RUBIO, R.; RAURET, G.; **Arsenic speciation in marine biological materials by LC-UV-HG-ICP OES.** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry; Volume 351, Issue 4-5, pp 415-419, Spain, 1995.

ANDREWES P.; CULLEN W.R.; FELDMANN J.; KOCH I.; POLISHCHUK, E.; REIMER, K. J.; **The production of methylated organoantimony compounds by Scopulariopsis brevicaulis.** Appl Organometal Chem 12:827-842. 1998.

BERMEJO, P.; PEÑA, E.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; FRAGA, J. M.; COCHO, J.A. **Speciation of iron in breast milk and infant formulas whey by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry.** Volume 50, Issue 6, 10 January 2000, Pages 1211–1222.

BHASKARAN, S.; CHAPMAN, T; PILON, M.; VANGORDEN, S.; **Performance Based CID Imaging – Past, Present and Future.** Technical note; Thermo Scientific.

CHARANEK, K. H.; **Determinação de alguns nutrientes e contaminantes e avaliação da distribuição de alguns elementos em amostras de soja**

transgênica e convencional, através do acoplamentos HPLC-ICP OES. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & P. S. BONATO. **Introdução a métodos cromatográficos.** São Paulo: Editora Unicamp, 1997.

<http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/pdfs/8323.pdf>. Acessado 10/01/2016. EPA, 2003.

http://www.epa.gov/sites/production/files/201508/documents/method_1630_1998.pdf. Acessado 10/01/2016. EPA, 1998.

MATOS, W. O. **Desenvolvimento de procedimentos de digestão e especiação para amostras biológicas.** São Carlo, UFSCAR, 2011.

CARUSO, J.A; SUTTON, K.L; ACKLEY, K.L. **Elemental speciation – New approaches for trace elements analysis.** 1ºEd. Wilson & Wilson's, Amsterdam, 2000.

CORNELIS, RITA; CARUSO, J.A; CREWS, H; HEUMANN KLAUS; **Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology.** England, 2003.

KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar.** 1ª Ed. Piracicaba: [s.n.], 2010.

WUILLOUD, R. G; KANNAMKUMARATH, S. S; CARUSO, J. A.; **Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS;** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 379, Issue 3, pp 495-503; 2004.

EPA 2001 e 2003 http://www.epa.gov/microbes/documents/m_321_8.pdf (acesso 09/06/13).

TEMPLETON, D.M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R.; **Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches**, IUPAC, 2000.

KPLIK, R.; BORKOVÁ, M.; BICANOVA, B.; POLÁK, J.; MESTEK, O.; KOMINKOVA, J.; **Speciation analysis of elements in cereal flours by liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry**. Food Chemistry, 99, 158-167, 2006.

SCHOPPENTHAU, J.; DUNEMANN, L.; **Hyphenated HPLC/ICP-MS and HPLC/ICP-OES techniques for the characterization of metal and non-metal species**. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry; August III, pp 794-799; 1994. Germany.

KAHAKACHCHI, C.L.; MOORE, D.A.; **Speciation of gadolinium in gadolinium-based magnetic resonance imaging agents by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. J. Anal. At. Spectrom; 2009; USA.

ZOOROB GK, MCKIERNAN JW, CARUSO JA: **ICP-MS for elemental speciation studies**. Mikrochim Acta 128: 145-168, 1998.

MAZZUCOTELLI, A., AND RIVARO, P.; **Determination of trace amounts of metallorganics in marine ecosystem by high-performance liquid chromatography followed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection.** Microchem. J., 51 (1–2): 231–237; 1995.

WANG, J.; TOMLINSON, M. J.; CARUSO, J. A.; **Extraction of trace elements in coal fly ash and subsequent speciation by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry.** Plenary lecture.; J. Anal. At. Spectrom., 10, 601-607; 1995.

INOUE, Y.; SAKAI, T.; KUMAGAI, H.; **Simultaneous determination of chromium(III) and chromium(VI) by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry.** Journal of Chromatography A.; Volume 706, Issues 1–2, 7 July 1995.

SLOTH, J. J.; LARSEN, E. H.; JULSHAMN, K.; **Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS.** J. Anal. At. Spectrom, 18, 452-459. 2003.

WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S. S.; CARUSO, J. A.; **Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS.** Anal Bioanal Chem, 379 : 495-503.2004.

LOPEZ-AVILA, V.; SHARPE, O.; ROBINSON, W.; **Determination of Ceruloplasmin in Human Serum by SEC-ICPMS.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 386, Number 1, Sept, pp 180-187. 2006.

SHAH, M.; MEIJA, J.; CABOVSKA, B.; CARUSO, J.A.; **Determination of Phosphoric Acid Triesters in Human Plasma Using Solid-Phase Microextraction and GC-ICP MS.** Journal of Chromatography A, 1103, 329-336, 2006.

ROSAL, C.; MOMPLAISIR, G.; HEITHMAR, E.; **Roxarsone and transformation products in chicken manure: Determination by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry.** Electrophoresis, 26, 1606-1614, 2005.

ZHANG, X.; CORNELIS, R.; DE KIMPE, J.; MESS, L.; **Speciation of toxicologically important arsenic species in human serum by liquid chromatography–hydride generation atomic absorption spectrometry.** J. Anal. At. Spectrom., 1996,11, 1075-1079

MINGSONG, HU.; **Metal speciation of vanadium and thallium by IC-ICP-OES.** 2002. South Africa.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGUESS, K.; **The conception of background equivalent concentrations in spectroscopy.**, 15 : 33, 2000.

POUSSEL, E.; MERMET, J. M. **ICP Emission Spectrometers: 1995 Analytical Figures of Merit.** Applied Spectroscopy, v. 49, n. 10, 12A-18A, 1995.

POUSSEL, E.; MERMET, J. M.; SAMUEL, O. **Simple experiments for the control, the evaluation and the diagnosis of Inductively coupled plasma sequential systems.** Spectrochimica Acta, v. 48B, n. 6/7, 742-755, 1993.

KHOUZAM, R. B.; SZPUNAR, J.; HOLEMAN, M.; LOBINSKI, R.; **Trace element speciation in food: State of the art of analytical techniques and methods.** Pure Appl. Chem., 84/2 (2012) 169–179.

MEERMANN B.; SPERLING M.; **Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications.** Anal Bioanal Chem. 2012 Jun;403

MONIKA, S.; MEIJA, J.; CABOVSKA, B.; CARUSO, J.; **Determination of Phosphoric Acid Triesters in Human Plasma Using Solid-Phase Microextraction and GC-ICP-MS.** *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 329-336.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; **Introduction to modern liquid chromatography.** – 3rd ed. / John W. Dolan. 2010.

SUZUKI, K. T.; LOBINSKI, R.; ENCINAR, J. R.; ISHIWATA, K.; OGRA, Y.; **Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula***

edodes. Analytical and Bioanalytical Chemistry. July 2004, Volume 379, Issue 5, pp 861-866.

Technical Overview. Agilent Technologies. **CCD and CID solid-state detectors**. 2012.

Naozuka, J.; Marana, S.R.; Oliveira, P. V.; **Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds**. Journal of Food Composition and Analysis, Volume 23, issue 1, February 2010, Pages 78-85

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Bruno Menezes Siqueira

Local e data de nascimento: São Paulo, 12 de Maio de 1989.

EDUCAÇÃO

Colégio São Vicente, São Paulo – SP, 2006

Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP, 2011

Graduação – Bacharelado em Química

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Training in the Service Operations of Thermo Scientific Indiko Analyzer.

Período: 11 à 14/12/12

Local: Vantaa, Finlândia

- Training in the Service Operations of Berghof Microwave Digestor

Período: 17 à 19/12/12

Local: Eningen, Alemanha

OCUPAÇÃO

Químico de Aplicação na empresa Nova Analítica Importação e Exportação Ltda.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

- Separação, identificação e quantificação de frações de Cu, Zn, Fe e Mg em castanha de caju por HPLC-ICP OES. Apresentação Oral. 4º Encontro Brasileiro Sobre Especiação Química. Curitiba. 2014.
- Separation and identification of Ca, Mg, Fe and Zn species in cashew nuts by HPLC-ICP OES. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Mérida. Mexico. 2014.
- Reatividade do composto fenólico 2-(2'-hidroxifenil benzoxazol) frente ao radical ABTS^{•+} e sua complexação com íons cobre(II). 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011(chamado para apresentação oral).
- “Determinação da Capacidade Antioxidante do Flavonóide 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona extraído de *Baccharis retusa*”. XVIII Congresso PIBIC de iniciação científica. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP. 2010

- “Reatividade da bile bovina frente a radicais ABTS $\cdot^-$ ”. XVIII Congresso PIBIC de iniciação científica. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP. 2010
- “Propriedades Espectroscópicas do Íon Mo^{2-} ”. VII Workshop em Física Molecular e Espectroscopia. Joinville, Santa Catarina. 2009.