UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino
utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado
(ICP-MS) com introdução direta da amostra**

Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino
utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado
(ICP-MS) com introdução direta da amostra**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para
a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Aguiar, Giovanna de Fatima Moreno

Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) com introdução direta da amostra.

88 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

1. Minerais 2. Bovinos 3. Sêmen 4. ICP-MS 5. DRC

FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) com introdução direta da amostra

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

"Ponha a mão no peito e sinta as batidas do seu coração. Esse é o relógio da sua vida... Um dia ele parará... Portanto, não dá para perder um único precioso segundo. Vá atrás do seu sonho com energia e paixão, ou então recue e veja-o escorrer pelo ralo....

A verdade é que nós todos nascemos com potencial para a grandeza, abençoados com oportunidades para alcançar novas e estonteantes alturas. Mas, tristemente, muitos são preguiçosos demais, preocupados demais com que os outros possam pensar com medo demais de mudanças, para abrir suas asas e usar todos os seus talentos...

Tenha sempre em mente que, faça o que você fizer, os enganos são parte da vida... Não fique ruminando se está ou não fazendo a coisa certa...

Como todo mundo, você terá alguns dias melhores do que outros... Mas aconteça, o que acontecer, não desista...

É incrivelmente cansativo passar dias fazendo coisas que não nos agradam ou sequer nos interessam... Quando estiver fazendo o que ama, você se levantará de manhã cheio de animação para enfrentar o começo de cada dia e estará tomado de uma alegria sincera altamente contagiante... você inspirará outros a irem atrás de seus sonhos...

Sabe de uma coisa? Mesmo que você cometa enganos e esteja errado sobre quase tudo, ainda assim sua vida será uma aventura fantástica...

E sabe de outra coisa? Se você ouvir seu coração e usar a cabeça, nunca estará errado."

O Sentido da vida - Bradley Trevor Greive
Tradução de Luis Fernando Verissimo

É com imensa satisfação que dedico este trabalho a pessoas muito especiais que estarão sempre presentes na minha vida...

A Deus, por me amar além do que eu posso compreender. E me conduzir pelo caminho certo, me dando forças para prosseguir. Obrigada por me conceder saúde, sabedoria e determinação.

"Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o SENHOR, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!" (Josué 1:9)

Aos meus pais, Carlos e Fatima. Nenhuma palavra é o bastante para agradecer toda a vida dedicada a mim e a meu irmão. Com seus exemplos de pessoas íntegras e amorosas, vocês me deram as bases emocionais, morais e intelectuais para a formação da pessoa que sou hoje. Obrigada por ser meu alicerce, minha base, minha motivação. Amo vocês.

Ao meu irmão Vinicius, pela convivência, pelo apoio e pelas orações. Muito obrigada.

Ao meu namorado Rodrigo, obrigada por fazer parte do meu cotidiano a tanto tempo, me amparando, ouvindo e incentivando.

Aos meus amigos, em especial, ao Bruno Lemos e ao Jairo Lisboa, pela amizade e pela valiosa ajuda, principalmente nos finais de semana.

"Não sei... Não sei se a vida é curta ou longa demais pra nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira e pura... enquanto durar..."

Não sei - Cora Coralina

Agradeço às pessoas imprescindíveis para a realização desta dissertação...
Muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Fernando Barbosa Júnior, pela atenção, apoio, confiança e por todo o conhecimento transmitido.

À Vanessa Souza, técnica do laboratório, pela ajuda, paciência e dedicação.

Ao Prof. Pedro Orival Luccas pela preciosa colaboração para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo apoio e dedicação aos alunos.

Ao meu tio Carlos Henrique pelo incentivo e ajuda.

À Ourofino Saúde Animal, em especial ao Dolivar Coraucci pelo apoio e ao Fabio Marson e Evandro Souza pela colaboração para obtenção das amostras.

À todos, que de alguma forma, participaram e colaboraram.

"Tenha sempre presente que a pele se enrugua, o cabelo embranquece, os dias convertem-se em anos... Mas o que é importante não muda: a tua força e convicção não tem idade... Não deixes que enferruje o ferro que existe em ti... Quando não conseguires correr atrás dos anos, trota. Quando não conseguires trotar, caminha. Quando não conseguires caminhar, use uma bengala. Mas nunca te detenhas!"

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

AGUIAR, G. F. M. **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) com introdução direta da amostra.** 2010. 88f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os minerais são de extrema importância no metabolismo geral e no desempenho produtivo e reprodutivo dos bovinos. Atualmente, no Brasil, existem poucos estudos sobre o diagnóstico de deficiências minerais em bovinos, através de análise de macroelementos e elementos traço em fluidos biológicos. A maior parte das informações disponíveis limitam-se ao diagnóstico clínico de deficiências isoladas e à análise de elementos nas pastagens e no solo, que podem sugerir deficiências sub clínicas de alguns minerais, mas apresentam várias limitações e interferências. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de análise simples, com introdução direta da amostra, utilizando a técnica de *q*-ICP-MS e DRC-ICP-MS, para determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, I, Mo, As, Se, Ni, Co, Ba, Cs, Mn e Pb em sêmen bovino. Para realização das análises, foi utilizada calibração em meio aquoso e as amostras foram diluídas na proporção 1:50 em solução contendo 0,01% v/v Triton[®] X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico. Também foram avaliadas a calibração por ajuste de matriz e a análise das amostras após digestão por microondas, para confirmação dos resultados obtidos por introdução direta e calibração em meio aquoso. O DRC foi essencial para determinação de níquel. O gás de reação utilizado foi H₂ e os parâmetros RP_q e vazão do gás foram estudados para otimização do método. Os limites de detecção para determinação de ⁴⁴Ca, ⁶³Cu, ⁵⁷Fe, ²⁴Mg, ⁶⁴Zn, ¹²⁷I, ⁹⁸Mo, ⁷⁵As, ⁸²Se, ⁵⁹Co, ¹³⁸Ba, ¹³³Cs, ⁵⁵Mn e ²⁰⁸Pb foram: 0,262; 0,003; 0,168; 0,004; 0,004; 0,026; 0,007; 0,007; 0,033; 0,002; 0,005; 0,002; 0,003; 0,002 µg L⁻¹ respectivamente, e para determinação de ⁶⁰Ni por DRC-ICP-MS o LD foi 0,020 µg L⁻¹. O método desenvolvido foi aplicado para determinação de 15 elementos em amostras de sêmen de bovinos de diferentes raças usadas em programas de reprodução e inseminação artificial.

Palavras chave: minerais, bovinos, sêmen, ICP-MS, cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS)

ABSTRACT

AGUIAR, G. F. M. **Determination of essential and toxicant elements in bovine semen using coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with direct introduction of the sample.** 2010. 88f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The minerals are of extreme importance in the general metabolism and in the productive and reproductive performance of the bovines. Nowadays, in Brazil, few studies exist on the diagnosis of mineral deficiencies in bovine, through macroelements analysis and trace elements in biological fluids. Most of the available information is limited to the clinical diagnosis of isolated deficiencies and the analysis of elements in the pastures and in the soil, that can suggest sub clinical deficiencies of some minerals, but present several limitations and interferences. The objective of this work was to develop a method of simple analysis, with direct introduction of the sample, using the technique of *q*-ICP-MS and DRC-ICP-MS, for determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, I, Mo, As, Se, Ni, Co, Ba, Cs, Mn and Pb in bovine semen. Aqueous medium calibration was used in the analysis and the samples were diluted in the proportion 1:50 in solution containing 0,01% v/v Triton® X-100 and 0,5% v/v of nitric acid. They were also evaluated the matrix matching and the analysis of samples after digestion for microwave, for confirmation of the results obtained by direct introduction and calibration in aqueous medium. DRC went essential for nickel determination. The reaction gas used it was H₂ and the parameters RPq and gas flow rate were studied for optimization of the method. The detection limits for determination of ⁴⁴Ca, ⁶³Cu, ⁵⁷Fe, ²⁴Mg, ⁶⁴Zn, ¹²⁷I, ⁹⁸Mo, ⁷⁵As, ⁸²Se, ⁵⁹Co, ¹³⁸Ba, ¹³³Cs, ⁵⁵Mn and ²⁰⁸Pb were: 0,262; 0,003; 0,168; 0,004; 0,004; 0,026; 0,007; 0,007; 0,033; 0,002; 0,005; 0,002; 0,003; 0,002 µg L⁻¹ respectively, and for determination of ⁶⁰Ni for DRC-ICP-MS the LOD was 0,020 µg L⁻¹. The developed method was applied for determination of 15 elements in bovine semen samples of different breed used in reproduction programs and artificial insemination.

Keywords: minerals, bovines, semen, ICP-MS, dynamic reaction cell (DRC-ICP-MS)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de um espermatozóide – cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda	25
Figura 2. Esquema do sistema de análise por ICP-MS	28
Figura 3. Sequência de eventos que ocorrem com a amostra após sua introdução e até a chegada no plasma	28
Figura 4. Esquema de um DRC-ICP-MS mostrando a localização do DRC (entre as lentes iônicas e o quadrupolo)	37
Figura 5. a) curvas de pirólise para Se e Mn; b) curva de pirólise para Cu; c) curvas de atomização para Se e Mn e d) curva de atomização para Cu, todas elaboradas em sêmen diluída 1:10.	60
Figura 6. À esquerda estão apresentadas as concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H ₂ e à direita estão apresentados a razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq para a determinação de ⁷⁵ As, ⁵⁹ Co, ¹²⁷ I e ⁶⁰ Ni em sêmen.	63
Figura 7. À esquerda estão apresentadas as concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H ₂ e à direita estão apresentados a razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq para a determinação de ⁸² Se em sêmen.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interferências espectrais em ICP-MS de isótopos dos elementos em estudo e suas respectivas abundâncias	33
Tabela 2 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de sêmen analisadas por ICP-MS	46
Tabela 3 - Parâmetros operacionais do ICP-MS (Elan DRC II, Perkin Elmer)	48
Tabela 4 - Parâmetros operacionais do DRC- ICP-MS (Elan DRC II, Perkin Elmer)	49
Tabela 5 - Parâmetros otimizados para determinação de Se, Cu, e Mn nas amostras de sêmen, por GF AAS	50
Tabela 6 - Parâmetros otimizados para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras de sêmen, por FAAS	50
Tabela 7 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a introdução direta da amostra de sêmen, diluída 1:50, utilizando calibração em meio aquoso.	56
Tabela 8 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a introdução direta da amostra de sêmen, diluída 1:50, utilizando calibração por ajuste de matriz.	57
Tabela 9 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a análise das amostras de sêmen após digestão em microondas.	58
Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e coeficiente de correlação linear (r) determinados por ICP-MS (modo padrão) e calibração em meio aquoso	59
Tabela 11 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a análise das amostras de sêmen por GF AAS (Cu, Mn e Se) e FAAS (Ca, Fe, Mg e Zn).	61
Tabela 12 - Análise das amostras de sêmen por DRC-ICP-MS e q-ICP-MS, diluição 1:50, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	64
Tabela 13 - Avaliação dos valores de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) no modo q-ICP-MS e no modo DRC-ICP-MS, utilizando calibração em meio aquoso.	65
Tabela 14 - Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	67
Tabela 15 - Determinação de I, Mo, As, Se e Co nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	69
Tabela 16 - Determinação de Cs, Mn, Pb, Ba e Ni nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	71
Tabela 17 - Resultados da determinação de metais em amostras de sêmen bovino no presente estudo e em diversos estudos encontrados na literatura.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
°C	graus Celsius
CC	Cela de Colisão
CV	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Cela de Reação Dinâmica
FAAS	Espectrômetro de absorção atômica com chama
GF AAS	Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite
GSH-Px	Glutathione peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
ICP-OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/z	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
PIB	Produto Interno Bruto
ppm	Partes por milhão
PTH	Paratormônio
r	Coeficiente de correlação linear de <i>Pearson</i>
r ²	Coeficiente de determinação
RF	Radiofrequência
RNA	Ácido ribonucleico
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Essencialidade dos elementos químicos	1
1.2 Funções metabólicas, efeitos sobre a reprodução e patologias associadas à deficiência de macro e microelementos em bovinos	2
1.3 Deficiências minerais em bovinos no Brasil	9
1.4 Minerais e a qualidade do sêmen	12
1.5 Toxicidade dos Metais para a reprodução	18
1.6 Aparelho Reprodutor Bovino	23
1.7 Sêmen	24
1.8 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	26
1.9 Determinação de metais em sêmen	39
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Instrumentação e Acessórios	43
3.2 Reagentes, soluções e limpeza de material	43
3.3 Preparo dos diluentes e das curvas de calibração	44
3.3.1 Calibração por ajuste de matriz	45
3.4 Amostras de sêmen	45
3.4.1 Coleta das amostras de sêmen	45
3.4.2 Preparo do “pool” de sêmen e do sêmen “base”	46
3.4.3 Preparo das amostras sêmen para introdução direta	46
3.4.4 Preparo das amostras para digestão	46
3.4.5 Preparo das amostras de sêmen para análise por espectrometria de absorção atômica	47
3.5 Condições instrumentais de operação do ICP-MS	47
3.6 Otimização da Cella de Reação Dinâmica por ajuste de matriz com sêmen base	48
3.7 Condições instrumentais do espectrofotômetro de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) e por chama (FAAS)	49
3.8 Padrões internos	50
3.9 Validação Analítica.....	51
3.9.1 Seletividade	52
3.9.2 Linearidade e faixa de aplicação.....	52
3.9.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	53
3.9.4 Precisão	53
3.9.5 Exatidão	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Escolha do fator de diluição e diluente.....	55
4.2 Determinação de metais em sêmen por ICP-MS, com introdução direta da amostra.....	55
4.3 Determinação de metais em sêmen por ICP-MS, após digestão das amostras em microondas ...	57
4.4 Curvas de pirólise e atomização para determinação de Cu, Mn e Se por GF AAS	59
4.5 Determinação de Cu, Mn e Se por GF AAS e Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS.....	60
4.6 Otimização da cela de reação dinâmica para determinação de As, Co, I, Ni e Se por DRC-ICP-MS.....	62
4.6.1 Determinação de As, Co, I, Ni e Se em amostras de sêmen utilizando DRC-ICP-MS.....	64
4.7 Avaliação da utilização de padrão interno.....	66
4.8 Análise de sêmen de bovinos utilizados em programas de inseminação artificial	66
4.9 Concentração de metais em sêmen bovino	73
5 CONCLUSÕES	75
6 REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Essencialidade dos elementos químicos

Os elementos químicos inorgânicos encontram-se na proporção de 2 a 5% do peso total dos animais e têm funções essenciais tanto na estrutura dos tecidos e biomoléculas, como no metabolismo animal, atuando como cofatores enzimáticos, antioxidantes, ativadores da ação hormonal, no transporte de oxigênio, regulação da pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico (GONZÁLES, 2000).

Um mineral pode ser considerado essencial quando sua ausência na dieta ocasiona redução no desempenho e/ou saúde dos animais. Existe uma condição ótima de concentração para cada elemento no organismo, a fim de manter sua integridade estrutural e funcional, de maneira que a saúde, crescimento e reprodução se mantenham inalterados, e assim, as funções biológicas sejam mantidas pelos mecanismos homeostáticos. A consequência inicial da deficiência de um nutriente na dieta é tornar esse balanço mais difícil de ser mantido (MORAES, 2001a).

Embora os nutrientes minerais estejam presentes no organismo dos animais em menores proporções que, por exemplo, proteínas e lipídeos, eles são responsáveis por funções vitais e deficiências em um ou mais destes elementos podem resultar em desordens nutricionais sérias, ocasionando no animal um desempenho produtivo e reprodutivo aquém de seu potencial (LEONEL et al., 2006).

Os elementos denominados essenciais são necessários para a manutenção das funções fisiológicas do organismo, e podem ser classificados de acordo com sua concentração em fluidos e tecidos animais, em: **macrominerais** – presentes em maior concentração no organismo, cujos requerimentos são geralmente expressos em porcentagem – cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na), cloro (Cl), potássio (K) e enxofre (S) e **microminerais** ou oligoelementos (elementos traço) – presentes em menor concentração, cujos requerimentos são geralmente expressos em partes por milhão (ppm) – cobre (Cu), zinco (Zn), iodo (I), selênio (Se), ferro (Fe), cobalto (Co), manganês (Mn), molibdênio (Mo), flúor (F), cromo (Cr), estrôncio (Sr), vanádio (V), níquel (Ni) e silício (Si) (GONZÁLES, 2000; PARSONS; BARBOSA, 2007; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 1998).

Muitos elementos não essenciais e tóxicos são encontrados no meio ambiente e podem ser detectados em fluidos biológicos, tais como: berílio (Be), bário (Ba), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), alumínio (Al), arsênio (As), célio (Cs), chumbo (Pb) e tálio (Tl) (GONZÁLES, 2000). Entretanto, mesmo os elementos essenciais, podem apresentar efeitos tóxicos se estiverem presentes em altas concentrações, e estes também provocam problemas relacionados à saúde quando suas concentrações estão abaixo do normal (PATRIARCA et al., 1998; SAVORY; WILLS, 1992). A toxicidade de um elemento depende da concentração, duração e frequência de exposição, bem como forma química do elemento presente (GONZÁLES, 2000).

1.2 Funções metabólicas, efeitos sobre a reprodução e patologias associadas à deficiência de macro e microelementos em bovinos

A produtividade determina em parte as concentrações dos minerais exigidos pelo metabolismo animal. Nesta última década, ficou evidente não só a necessidade de suplementar minerais, como também a de suplementar proteína e carboidratos. Melhores práticas de manejo resultam em maiores taxas de natalidade e de crescimento dos bezerros, exigindo mais atenção quanto à nutrição mineral, para manutenção do equilíbrio metabólico, evitando-se assim a ocorrência de deficiências importantes (ANDRIEU, 2008; MORAES, 2001b).

Desequilíbrios minerais geralmente estão relacionados com a quebra de homeostasia do organismo ocasionada pelo aumento da demanda orgânica nos desafios metabólicos da produção, tais como: ganho de peso, reprodução, lactação, gestação e estresse e/ou diminuição da disponibilidade destes elementos na alimentação (VALLE, 2002).

O desempenho reprodutivo de rebanhos bovinos pode ser influenciado por vários fatores, porém fatores nutricionais, tais como, o desequilíbrio mineral, são cruciais em termos de efeito direto sobre a reprodução. Mesmo que de forma indireta, todos os minerais têm alguma relação com as funções reprodutivas em bovinos, por este motivo, é importante manter o balanço mineral para garantir êxito neste processo (BARBER; PARKER; MCDANIEL, 2005; BARBOSA; SOUZA, 2001;

BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008; BLACHE; MALONEY; REVELL, 2008; SANTOS, 1999; SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Alguns aspectos relacionados às funções metabólicas, efeitos sobre a reprodução e patologias associadas à deficiência destes elementos em bovinos, são apresentados a seguir:

Cálcio

O cálcio é essencial para a mineralização óssea, regulação metabólica, coagulação sanguínea, contração muscular, permeabilidade de membrana, secreção de alguns hormônios, ativação e estabilização enzimática e transmissão de impulsos nervosos. Concentração plasmática de referência de 7,4 – 13,0 mg/dL (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SPEARS, 1999).

O sistema endócrino envolvendo vitamina D₃, paratormônio (PTH) e calcitocina, é responsável pela manutenção da concentração sanguínea de cálcio. A absorção de cálcio no intestino diminui com a idade, logo animais mais velhos são mais suscetíveis a hipocalcemia, outros fatores que afetam a absorção são: a relação cálcio/ potássio nos alimentos (a relação ótima é 2:1); a quantidade de proteína na dieta, sendo que a deficiência protéica reduz a absorção; ingestão excessiva de magnésio (ocorre competição pelas células intestinais) e suplementação excessiva de vitamina D₃, que aumenta a absorção de Ca podendo causar calcificação de tecidos moles. A hipocalcemia é frequente em vacas leiteiras de alta produção e em vacas em período de lactação, e pode causar a febre do leite ou paresia do parto (doença metabólica caracterizada por fraqueza muscular, contrações involuntárias, tremores e colapso circulatório, podendo levar a morte). Deficiência deste elemento também pode causar osteoporose e retenção de placenta (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001; SANTOS, 1999).

Cobalto

É componente da vitamina B₁₂ (cianocobalamina), que é precursora da coenzima B₁₂, importante cofator enzimático que participa das reações do metabolismo do ácido propiônico, esta rota metabólica é a fonte mais importante de glicose via gliconeogênese em ruminantes, o cobalto participa também da formação

dos eritrócitos, atuando na síntese de protoporfirina. Concentração plasmática de referência de 0,5 – 0,7 mg/dL (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001; SPEARS, 1999).

A sintomatologia de deficiência de cobalto reúne uma série de sinais definidos como “marasmo enzoótico” também chamado de mal do colete ou chorona. Os animais com esta deficiência apresentam anemia, hipoglicemia, queda na produção de leite, perda de apetite, pele e pelagem ásperas, letargia, infertilidade e cetose, bezerros nascem fracos e morrem em poucos dias (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001).

Cobre

O cobre é componente de várias enzimas com ação antioxidante (lisil oxidase, tirosinase, citocromo oxidase, superóxido dismutase), favorece absorção intestinal de ferro, participa da mineralização dos ossos, formação e integridade do sistema nervoso, manutenção da estrutura do miocárdio e é componente chave do sistema imunológico. Concentração plasmática de referência de 100,0 – 200,0 mg/dL (BARBOSA; SOUZA, 2001; GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SPEARS, 1999).

A taxa de absorção de cobre é influenciada pela necessidade do organismo, forma química do elemento e presença de outros minerais. O molibdênio forma um complexo insolúvel com o cobre no rúmex, impedindo sua absorção, enxofre inorgânico, cálcio e aminoácidos sulfurados, em excesso, também podem prejudicar a absorção deste mineral. A deficiência de Cu pode causar anemia hipocrômica, pois ele é necessário para síntese de hemoglobina, transtornos no metabolismo oxidativo, gerando perda de condição corporal, crescimento retardado e diarreia, com relação à osteogênese, pode provocar depressão do metabolismo dos osteoblastos com crescimento defeituoso dos ossos. Por estar envolvido na síntese de melanina e tecido conjuntivo, sua carência também provoca transtornos na pele, como, aspereza, alopecia e perda de pigmentação do pelo. Casos graves de deficiência podem levar a degeneração do miocárdio e morte súbita. Vacas que apresentam deficiência deste elemento têm fertilidade e taxas de concepção reduzidas e maior incidência de retenção de placenta (BARBOSA; SOUZA, 2001;

GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001; ROSA, 1993; SANTOS, 1999; SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Em relação à reprodução, um dos principais sinais de deficiência de cobre em ruminantes é a diminuição da fertilidade do rebanho, devido ao aumento da morte embrionária precoce, alteração no ciclo estral de fêmeas e redução da atividade ovariana em fêmeas jovens. Esses eventos ocorrem devido à mudança na síntese hormonal de esteróides nos ovários, já se verificou uma forte interação entre o estrógeno e o metabolismo de cobre (BARBOSA; SOUZA, 2001; SANTOS, 1999; SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Ferro

É componente essencial de várias enzimas que atuam no transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina, mioglobina), transporte de elétrons e outras funções vitais (catalase, triptofano 5-monoxigenase, citocromo P450, fenilalanina 4-monoxigenase e ferro-sulfoenzimas). Concentração plasmática de referência de 57,0 – 233,0 mg/dL. Deficiência de ferro pode ocasionar anemia hipocrômica e perda de peso. Bezerros alimentados exclusivamente com leite e mantidos em confinamento podem apresentar deficiência deste elemento (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001; SPEARS, 1999).

Iodo

É componente de hormônios tireoidianos: tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que regulam o metabolismo energético (termorregulação, crescimento e reprodução). Concentração plasmática de referência de 5,0 – 20,0 mg/dL (GONZÁLES, 2000; SPEARS, 1999). Sua deficiência causa diminuição da atividade tireoidiana e, em casos mais graves, o bócio, que é a hiperplasia da tireóide (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; STRACHAN, 2010).

Em casos de deficiências sub clínicas, o desempenho reprodutivo pode ser comprometido, causando sinais menos expressivos de cio, infertilidade, aumento na taxa de mortalidade embrionária, abortos, nascimento de bezerros fracos ou natimortos, aumento na incidência de retenção de placenta, redução na taxa de

concepção e atraso no desenvolvimento fetal. Em touros pode ocorrer diminuição da libido e uma produção de sêmen de qualidade baixa (BARBOSA; SOUZA, 2001; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SANTOS, 1999). No Brasil existem poucos dados de pesquisa sobre a deficiência de iodo ou sobre os resultados de sua suplementação aos rebanhos, entretanto, são bastante conhecidos os históricos de natimortos ou neonatos fracos, sem pelos, edemaciados e com o "pescoço grosso" (bócio) em rebanhos bovinos, devido à falta deste elemento (ROSA, 1993).

Magnésio

É cofator de mais de 300 enzimas, componente dos ossos, atua na atividade neuro-muscular e é essencial para formação do ácido nucléico. Concentração plasmática de referência de 1,8 – 3,0 mg/dL (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SPEARS, 1999).

Não existe controle homeostático de magnésio, portanto sua concentração sanguínea reflete o nível da dieta. A hipomagnesemia pode causar tetania hipomagnesêmica (perturbação metabólica que afeta, sobretudo, vacas em lactação, é caracterizada por redução do apetite, salivação profusa e convulsões), hiperexcitabilidade, retenção de placenta, anormalidades na digestão ruminal, diminuição na produção de leite e sérias consequência para os ruminantes, podendo levar à morte, porém a hipermagnesemia não causa grandes transtornos (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 1998).

Manganês

O manganês é componente de várias enzimas (piruvato carboxilase, arginase e superóxido dismutase mitocondrial – que integram o sistema de defesa do organismo contra os radicais livres), ativador enzimático (hidrolases, quinases, transferases e descarboxilases), e é essencial no desenvolvimento da matriz orgânica dos ossos. Concentração plasmática geralmente é cerca de 1,0 mg/L, porém não tem um valor de referência estabelecido. (GONZÁLES, 2000; SPEARS, 1999).

Por ser essencial no desenvolvimento da matriz orgânica dos ossos, sua deficiência faz com que o sulfato de condroitina, da cartilagem epifisária,

diminua drasticamente. A deficiência de manganês também pode causar redução do crescimento e problemas de infertilidade. Em bezerros esta deficiência é caracterizada por inflamações e deformações nas articulações, baixo peso corporal e aumento da mortalidade (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SANTOS, 1999).

Este elemento também influencia a fertilidade de rebanhos de leite e de corte. Sua função é incrementar a mitose das células ovarianas e das células luteínicas ovarianas que formam o corpo lúteo, isto tem reflexo direto na concentração de progesterona e estrógeno no sangue. Deficiência de Mn pode causar degeneração das células da granulosa, levando a formação de cistos ovarianos e abortos por deficiência de progesterona. Os animais com esta deficiência têm desempenho reprodutivo inferior, anormalidades no ciclo estral, cio silencioso, baixas taxas de concepção, aumento no número de abortos e maturidade sexual retardada (BARBER; PARKER; MCDANIEL, 2005; BARBOSA; SOUZA, 2001; SANTOS, 1999).

Molibdênio

O Mo é componente de algumas enzimas envolvidas com reações de hidroxilação (xantina oxidase, sulfito oxidase e aldeído oxidase). Não possui uma concentração plasmática de referência estabelecida (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SPEARS, 1999; STRACHAN, 2010).

Este elemento pode ser adicionado a fertilizantes, e apresenta toxicidade aos animais em casos de exposição excessiva, alguns estudos demonstraram que altas concentrações de Mo estão relacionadas à diminuição da síntese de testosterona. Porém, sua deficiência pode causar várias desordens reprodutivas, como, diminuição da libido, esterilidade, redução da espermatogênese e diminuição da taxa de concepção (MEEKER et al., 2010; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Selênio

É componente essencial de mais de 30 enzimas, tais como, glutathiona peroxidase e iodotironina deiodase tipo I, exerce múltiplas ações relacionadas à capacidade de produção do animal, fertilidade e prevenção de doenças. Apresenta

função protetora como antioxidante da membrana plasmática, atua na síntese de hormônios tireoidianos e influencia a capacidade de defesa dos leucócitos. Não possui uma concentração de referência estabelecida, porém concentrações plasmáticas abaixo de 0,05 mg/mL já indicam deficiência deste elemento (BARBOSA; SOUZA, 2001; GONZÁLES, 2000; HEFNAWY; PÉREZ, 2010; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SANTOS, 1999; SPEARS, 1999).

Sua deficiência causa acúmulo de peróxidos nas membranas celulares causando necrose, com posterior fibrose e calcificação, principalmente nos músculos esquelético e cardíaco. A distrofia muscular causada pela deficiência de selênio é chamada de “doença do músculo branco” (GONZÁLES, 2000; HEFNAWY; PÉREZ, 2010; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 1998).

Em touros, o selênio se concentra nos testículos e epidídimo, e exerce função antioxidante e estrutural através da selenoproteína glutathione peroxidase (GSH-Px). Deficiência deste elemento reduz a síntese de selenoproteína, comprometendo a gametogênese do macho e causando alterações nos espermatozóides. Em fêmeas o Se atua na formação de ovócitos e na maturação dos folículos que promovem a ovulação, pela ação da enzima glutathione peroxidase, que protege a membrana do ovócito da peroxidação causada por radicais livres. Este elemento possui também ação direta no metabolismo hormonal de progesterona. Sua deficiência pode causar cistos ovarianos, redução da motilidade uterina, mastite e retenção de placenta e ocasionar o nascimento de bezerros prematuros fracos ou mortos (BARBER; PARKER; MCDANIEL, 2005; BARBOSA; SOUZA, 2001; GUO et al., 2009; ROSA, 1993; SANTOS, 1999; SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Zinco

É componente de mais de 70 enzimas (álcool desidrogenase, DNA polimerase, RNA polimerase, piruvato desidrogenase, superóxido dismutase, etc), atua na expressão gênica e estabilidade de membranas, participa da produção de alguns hormônios (insulina, testosterona, cortisol), e está relacionado com a integridade do sistema imunológico. Concentração plasmática de referência é de

75,0 – 83,0 mg/dL (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; SPEARS, 1999).

Sua absorção pode ser afetada pela interação de outros elementos como cálcio, cobre e ferro, e é favorecida pela presença de magnésio, fosfatos e vitamina D. O excesso de ácido fítico (presente nas forrageiras), também afeta a absorção deste elemento, pois forma um complexo insolúvel com o zinco, podendo levar à deficiência deste mineral. A deficiência de Zn está relacionada a baixo crescimento, retardo na cicatrização, infertilidade, diminuição de resposta imunológica, paraqueratose (distúrbio da queratinização, ocasiona engrossamento e rachaduras na pele), alopecia, despigmentação do pelo, falha de crescimento de cascos e chifres, inflamação nas articulações e queda na produção de leite (GONZÁLES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001).

Deficiências deste elemento também estão associadas a anormalidades reprodutivas que afetam principalmente os touros, pois o zinco tem papel fundamental na formação da genitália externa e interna, na espermatogênese e na multiplicação celular dos testículos, principalmente das células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, Zn é encontrado em altas concentrações no sêmen (BARBER; PARKER; MCDANIEL, 2005; BARBOSA; SOUZA, 2001; KUMAR et al., 2006; SANTOS, 1999; SMITH; AKINBAMIJO, 2000). Nas fêmeas, todas as fases do processo reprodutivo, desde o cio até o parto e a lactação são afetadas pela deficiência de Zn, gerando uma diminuição na taxa de fertilidade (ROSA, 1993).

1.3 Deficiências minerais em bovinos no Brasil

Deficiências minerais em bovinos são descritas em quase todas as regiões do mundo. No Brasil, nas duas últimas décadas houve um grande incremento na criação de bovinos em pasto nas regiões Centro-Oeste e Norte, nestas regiões as deficiências minerais se destacaram como principal obstáculo para a criação dos rebanhos (MORAES, 2001c).

Em estudos realizados sobre distúrbios no metabolismo mineral em bovinos, sobretudo deficiências minerais, no período de 1943 a 1998, destaca-se como a mais importante no Brasil a deficiência de fósforo, seguida pela de sódio. A

deficiência de cálcio, embora menos frequente, tem grande importância nos bovinos de leite. Entre os microelementos, as deficiências de cobre e cobalto foram as mais frequentes, porém deficiências de zinco, manganês, iodo e selênio também têm sido verificadas (MORAES; TOKARNIA; DOBEREINER, 1999; TOKARNIA; DOBEREINER, 1976; TOKARNIA et al., 1999).

Por outro lado, valores elevados de ferro foram observados em amostras de vários estados, sobretudo nas que apresentaram baixos teores de cobre. Estas alterações podem estar relacionadas a duas patologias: a doença vulgarmente chamada de “ronca” em que as concentrações de Fe estão elevadas em decorrência da sua não utilização devido à carência de Cu e a “doença do peito inchado” caracterizada por insuficiência cardíaca crônica (TOKARNIA et al., 1999). Os graus de deficiência variam bastante, desde estados carênciais leves ou sub clínicos que afetam principalmente a produtividade e fertilidade até estados graves com sintomatologia específica (TOKARNIA et al., 1999).

Os animais possuem mecanismos homeostáticos que podem manter as concentrações de minerais dentro de limites fisiológicos, apesar da disponibilidade na dieta. O grau de controle homeostático varia de um elemento para outro, mas a exposição continua à ambientes ou dietas com alto ou baixo teor de minerais induz a um desequilíbrio neste sistema e o animal pode desenvolver alterações bioquímicas e fisiológicas, causando desordens estruturais que variam de acordo com o elemento e suas funções, grau e duração da dieta tóxica ou deficiente, e idade e sexo do animal envolvido. São propostas quatro fases do estado de deficiência de minerais:

I - Fase de "depleção inicial" - caracterizada pela alteração somente no metabolismo do próprio elemento em resposta a uma ingestão reduzida. Nenhum distúrbio é detectável. A concentração do elemento em seus locais de ação não é afetada.

II - Fase de "compensação metabólica" - é caracterizada pela alteração de certas funções bioquímicas específicas, tais como a atividade de enzimas dependentes do elemento, devido a uma diminuição na concentração do mineral no seu local de ação. Outros sistemas, independentes do elemento deficiente, podem realizar uma compensação metabólica. As consequência diretas para a saúde são insignificantes quando os vários sistemas compensatórios estão em vigor.

III - Fase de "descompensação metabólica" - é caracterizada pelo aparecimento de alterações em funções importantes para a saúde, tais como a metabólica, a imunológica e a reprodutiva. Os sinais e sintomas não são clínicos.

IV - Fase clínica - é caracterizada pelo aparecimento da doença e crescente agravamento da deficiência, até a morte. Para muitos microelementos, a fase clínica pode ser revertida por meio de suplementos nutricionais, mas alguns não respondem à suplementação, pois o processo clínico é irreversível (MORAES, 2001c; UNDERWOOD; MERTZ, 1987).

Deficiências de um ou mais elementos químicos na dieta são suspeitas quando o desempenho produtivo e/ou reprodutivo do rebanho mostra-se aquém do esperado. Mas, para se realizar um diagnóstico adequado, é necessário destacar outras possíveis causas que contribuem para os mesmos problemas e até que ponto elas estão presentes, como doenças crônicas, parasitismos internos e externos, intoxicação por plantas, etc (ROSA, 1994).

O diagnóstico inicial pode ser feito utilizando o conhecimento de quando o problema ocorreu, idade e categoria dos bovinos afetados, sintomatologia apresentada, tipos de solo e pastagem, clima, época do ano, manejo do rebanho, disponibilidade de alimentos, ocorrência de problemas semelhantes no rebanho local, entre outros. O diagnóstico definitivo de uma ou mais deficiências no rebanho e até que ponto elas interferem na saúde ou desempenho não são tarefas fáceis. A avaliação das deficiências minerais de um rebanho deve contemplar as seguintes fases: levantamento de históricos, estudo dos solos (formação geológica, pH, análise mineral), análise das fontes de água, determinação da concentração dos minerais em forrageiras representativas da dieta do animal, determinação de minerais em amostras de tecidos e fluidos animais (sangue, fígado, ossos, urina, sêmen), estudo da sintomatologia clínica exibida e observação da resposta dos animais à suplementação de minerais diagnosticados como deficientes na dieta (ROSA, 1994).

O estudo dos solos pode fornecer indicações de possíveis deficiências, à medida que o pH aumenta, a disponibilidade e uso de ferro, manganês, zinco, cobre e cobalto, pelas plantas decresce, enquanto as concentrações de fósforo, cálcio, magnésio, molibdênio e selênio se elevam (MCDOWELL; CONRAD, 1977). Análises de forrageiras apresentam limitações pela dificuldade de colher amostras

representativas da dieta, possibilidade de contaminação por solo e desconhecimento da quantidade consumida pelo animal (MORAES, 2001c).

A análise das concentrações dos minerais nos tecidos pode, de certa forma fornecer indicações do meio ambiente como um todo e indicar o(s) elemento(s) deficiente(s) na dieta. Todavia, é desejável a confirmação do diagnóstico de deficiência mineral, pela suplementação adequada do mineral considerado deficiente na dieta, com finalidade de observar a resposta animal em saúde ou desempenho (MORAES, 2001c).

Muitos trabalhos ressaltam que o procedimento considerado mais seguro no diagnóstico de deficiências e desequilíbrios minerais é o exame do rebanho, através da análise de fluidos biológicos, tais como, sangue, saliva, sêmen e urina (TOKARNIA et al., 1999; TOKARNIA; DOBEREINER; MORAES, 1988; VALLE, 2002). Análises de pastagens ou de solo constituem apenas um complemento, devendo-se considerar a quantidade do mineral que é assimilável pelo animal, a possibilidade de contaminação e a representatividade das amostras coletadas e também as variações que ocorrem nos teores dos elementos na diferentes épocas do ano (TOKARNIA et al., 1999; TOKARNIA; DOBEREINER; MORAES, 1988).

1.4 Minerais e a qualidade do sêmen

Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira, responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), o Brasil lidera o ranking das vendas externas de carne bovina, dono do maior rebanho bovino comercial do mundo, que já ultrapassa 200 milhões de cabeças. Porém, o bom desempenho do setor, não pode ser atribuído apenas à vocação agropecuária brasileira, sendo que o nosso país é um dos poucos do mundo onde é possível criar animais em áreas temperadas e tropicais e a pecuária se estende dos campos do Sul ao Pantanal de Mato Grosso. O desenvolvimento científico-tecnológico, a modernização da pecuária e adoção de programas de sanidade animal, obtidos por intermédio de pesquisas, contribuíram igualmente para transformar o país numa das mais respeitáveis plataformas mundiais do

agronegócio. O prestígio atingido pela pecuária brasileira acelerou a busca por novas tecnologias relativas à melhoria das pastagens, nutrição, genética, reprodução e controle sanitário, auxiliando no aumento da velocidade do melhoramento genético dos rebanhos (IBGE, 2009; BRASIL, 2009).

Em vista disso, a relação entre os minerais, tais como zinco, cobre, ferro, manganês, cálcio, iodo e selênio, e a qualidade do sêmen, estudada desde 1980, está ganhando cada vez mais destaque. Uma vez que o agronegócio é um mercado em ascensão, que pretende utilizar cada vez mais ferramentas como melhoramento genético e inseminação artificial para atingir o lucro máximo em bovinos de corte e de leite, é de suma importância um controle rigoroso da qualidade do sêmen para garantir a efetividade do processo reprodutivo e bons resultados futuros.

A avaliação das concentrações de cobre, ferro, zinco, chumbo e níquel em sêmen de animais, demonstrou que a concentração destes elementos tem correlação com a ocorrência de alterações na cauda, acrossomo e cabeça dos espermatozóides. Os resultados sugerem que estes elementos podem causar muitos efeitos significativos e diretos na qualidade do sêmen e vários estudos apontam que cálcio, magnésio, zinco e cobre são essenciais para a espermatogênese e fertilidade (MASSANYI et al., 2005; SLIVKOVA et al., 2009).

Estudos com algumas espécies de animais, incluindo bovinos, demonstraram que a concentração de zinco no sêmen está correlacionada com a densidade, motilidade e viabilidade do espermatozoide, desenvolvimento testicular, maturação do espermatozoide e síntese de testosterona, contribuindo para a fertilidade, porém, alguns estudos indicam que concentrações extremas, baixas ou altas, provocam alterações morfológicas. A concentração de Zn em sêmen é indicador da função secretória da próstata, que secreta também magnésio, cálcio e potássio (CHIA et al., 2000; MANKAD et al., 2006). Além de ser indispensável para manutenção e evolução da espermatogênese, o Zn também pode prevenir contra os efeitos tóxicos de muitos elementos e é requerido para produção de um composto antibacteriano e antiinflamatório liberado pela próstata (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009; KENDALL et al., 2000; MASSANYI et al., 2005; YUYAN et al., 2008).

A produção de sêmen requer uma intensa divisão celular e grandes quantidades deste elemento, pois muitas enzimas vitais envolvidas na síntese de ácidos nucleicos e proteínas são metaloenzimas zinco dependente, que irão atuar na diferenciação e multiplicação celular. A suplementação com este elemento, levando a maiores concentrações no sêmen, demonstrou correlação com a maior motilidade dos espermatozóides e menor porcentagem de alterações – defeitos de cabeça, peça intermediária e gota citoplasmática proximal, em estudos com touros (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009; KENDALL et al., 2000; OLIVEIRA, A. R., 2006).

A deficiência de zinco pode causar alterações degenerativas na espermatogênese, depleção das células e acúmulo no lúmen dos túbulos seminíferos, podendo levar à disfunção gonadal, falha na espermatogênese, redução na secreção de testosterona, diminuição do peso testicular e atrofia dos túbulos seminíferos, além de estar relacionada a crescimentos malignos nos testículos. As células de Leydig são a principal fonte de andrógenos, entre eles a testosterona, a deficiência deste elemento prejudica a resposta das células de Leydig ao hormônio, podendo gerar hipogonadismo (diminuição da função das gônadas). No sêmen, o Zn está presente em alta concentração, tanto no plasma seminal como na cabeça, na peça intermediária e na cauda dos espermatozóides, a cabeça tem uma concentração quatro vezes maior do que o plasma seminal e aproximadamente 90% do conteúdo de zinco nos espermatozóides está localizado na cauda e na peça intermediária (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009; NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008).

O zinco disponibilizado pela próstata assegura que haja a quantidade necessária no núcleo do espermatozóide, para manter a estabilidade da estrutura da cromatina e preservar a integridade genômica. A concentração de Zn regula alguns processos ligados à penetração e à fertilização do ovócito. Depois da penetração no ovócito, o núcleo do espermatozóide sofre descondensação e forma o pronúcleo, este processo requer a redução da concentração deste elemento (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008).

Deficiências de cobre demonstraram relação com produção de menores volumes de ejaculado, menor concentração de esperma, menor motilidade e alterações morfológicas, porém altas concentrações deste elemento são

prejudiciais a reprodução. A melhora no manejo zootécnico tem intensificado a utilização de concentrados energéticos ricos em Cu, se por um lado os resultados de produtividade e reprodução são favoráveis, por outro, ocorre aumento da frequência de problemas metabólicos relacionados à intoxicação por este elemento. Estudos em carneiros utilizando suplementação de molibdênio demonstraram que este mineral prejudica a absorção de cobre, podendo levar a deficiência, o que causou redução na produção de testosterona (NIEKERK, 1989; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008; YUYAN et al., 2008).

As concentrações de cobre no esperma aparecem reduzidas em casos de azoospermia (ausência de espermatozóides no sêmen) e aumentadas em casos de oligospermia (presença de um baixo número de espermatozóides no ejaculado). A ingestão excessiva de Cu tem efeito negativo sobre a reprodução, apresentando efeitos tóxicos sobre o epitélio seminífero, redução da motilidade dos espermatozóides e aumento no número de má formações das células do esperma (SLIVKOVA et al., 2009).

Em touros, a administração de cobre na dieta melhorou a qualidade do sêmen, a melhora foi associada com a motilidade espermática e com a redução no número de espermatozóides mortos. Este elemento é encontrado geralmente associado a proteínas e na forma iônica é tóxico para os espermatozóides. O Cu é integrante da superóxido dismutase e da ceruloplasmina, que são necessárias para a manutenção do equilíbrio e desativação de radicais livres e, como tal, sua deficiência implica menor disponibilidade dessas moléculas e maior dano oxidativo às células (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; WONG et al., 2001).

Durante os desafios metabólicos, tais como o período de reprodução, ocorre um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, que atacam a membrana dos espermatozóides reduzindo sua viabilidade. O estresse oxidativo é apontado como uma das principais causas de infertilidade nos mamíferos, e elementos como o cobre, ferro, selênio e zinco, presentes em enzimas com ação antioxidante como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase, estão relacionados à diminuição dos danos causados por estas espécies e melhora da capacidade reprodutiva dos animais (AYDEMIR et al., 2006; SORDILLO; AITKEN, 2009).

Vários estudos observaram que deficiências de ferro podem reduzir a atividade de enzimas antioxidantes, ferro-dependentes ou que contém ferro, tais como, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, gerando um aumento na peroxidação de lipídeos (GAUR et al., 2000; MUDRON et al., 1996; YUYAN et al., 2008). A redução na atividade destas enzimas faz com que os espermatozoides não consigam reparar os danos provocados pelo excesso de radicais livres, este aumento na peroxidação lipídica da membrana plasmática é relacionado à queda da motilidade e da capacidade de fusão do espermatozoide ao ovócito. O Fe é também componente essencial de algumas proteínas presentes nas células de Leydig e células de Sertoli (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; PESCH; BERGMANN; BOSTEDT, 2006).

O selênio está relacionado à maturação do espermatozoide nos epidídimos e ao fornecimento de ATP, é um elemento essencial para o desenvolvimento testicular e para a espermatogênese, sua deficiência pode causar infertilidade, redução da motilidade do espermatozoide, quebra da cauda, defeitos citoplasmáticos e estresse oxidativo devido à diminuição da atividade antioxidante da glutathione peroxidase (HEFNAWY; PÉREZ, 2010; NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; XU et al., 2003). Pesquisas sugerem que em concentrações inadequadas - deficiência ou excesso – este elemento pode causar parada do ciclo celular e aumento da apoptose, devido a geração de espécies reativas de oxigênio. (KANTOLA; SAARANEN; VANHA-PERTTULA, 1988; NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008). O Se tem demonstrado efeito protetor contra o efeito tóxico de alguns metais sobre o sistema reprodutivo, já que é um poderoso antioxidante, e protege também o DNA contra danos oxidativos, além de apresentar correlação positiva com densidade do espermatozoide, número, viabilidade e motilidade dos espermatozoides (KENDALL et al., 2000; SAFARINEJAD, M.; SAFARINEJAD, S., 2009; XU et al., 2003).

Em touros este elemento se concentra nos testículos e epidídimo e neles exerce importantes funções metabólicas, como antioxidante na formação (testículos) e na maturação espermática (epidídimos) e estrutural, através da selenoproteína, que, além de ação antioxidante, atua na fixação da peça intermediária dos espermatozoides, na estrutura da membrana e das mitocôndrias. Quando há deficiência de Se, há uma menor síntese de selenoproteína, e como

consequencia a gametogênese do macho fica comprometida, e os espermatozóides se apresentam com cauda quebrada, deformações de cabeça e da peça intermediária, e até ruptura estrutural e oligospermia, observam-se também muitos espermatozóides mortos (necrozoespermia) (LI-GUANG et al., 2010; LIMA; DOMINGUES, 2007).

A intoxicação por selênio não é muito comum no Brasil, mas tem grande importância em várias partes do mundo, pois quando ocorre, a mortalidade é alta. Este elemento pode estar presente na água, xampus usados para tratamento de dermatites, rações e misturas minerais, anti-helmínticos e alguns tipos de plantas acumuladoras de Se (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

O cálcio tem um papel fundamental na motilidade progressiva dos espermatozóides, controlada pelo Ca intracelular que, por sua vez, é regulado pelo Ca extracelular, equilíbrio este mantido pela próstata (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993). Estudos demonstraram que o cálcio pode se ligar a calmodulina, e este complexo regula a atividade de várias enzimas relacionadas à motilidade espermática (BRIGGILER et al., 2005). Mecanismos dependentes deste elemento estão envolvidos na síntese de esteróides nos testículos e atuando como segundo mensageiro tem também importante papel na regulação dos processos que permitem ao espermatozóide desenvolver sua capacidade de fertilização. A espermatogênese é um processo complexo e muito organizado, pelo qual a espermatogônia prolifera e se diferencia para originar o espermatozóide maduro, esse processo depende da capacidade da espermatogônia de proliferar e entrar no programa de diferenciação que inclui a meiose. Há evidências de que a elevação do cálcio intracelular é um sinal essencial para divisão, diferenciação e maturação celulares. As concentrações intracelulares de Ca têm papel fundamental em todas as atividades que ocorrem nos espermatozóides, depois da ejaculação, regulam a hiperativação do espermatozóide, a quimiotaxia, a capacitação, a reação do acrossomo, a ligação e a fusão do espermatozóide ao ovócito e a ativação metabólica do embrião. Apesar de seu tamanho limitado e de sua aparente simplicidade estrutural, o espermatozóide possui mecanismos sofisticados de regulação das concentrações deste elemento no citoplasma e da geração da complexa sinalização de cálcio. Para que ocorra a fecundação do ovócito, é necessário que o espermatozóide seja capacitado, o processo de capacitação

depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons de Ca (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009; NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; WONG et al., 2001).

O manganês é constituinte de uma metaloenzima que está ligada à síntese de esteróides e ao aumento da liberação dos hormônios gonadais. Em touros com deficiência deste elemento no sêmen, observa-se degeneração testicular, diminuição do volume do ejaculado, redução na motilidade e no número de espermatozóides, assim como aumento no número de espermatozóides anormais e alta porcentagem de patologias espermáticas em animais jovens, porém não afeta a libido. A deficiência orgânica de Mn nem sempre é acompanhada de deficiência no esperma (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Outro elemento crucial na fisiologia dos espermatozóides é o magnésio, que está presente em altas concentrações no sêmen e é requerido em quase todos os sistemas enzimáticos. Este elemento tem um papel importante na espermatogênese, principalmente em relação à motilidade do espermatozóide e também está relacionado à ejaculação. Redução na concentração de Mg no sêmen está correlacionada com várias desordens reprodutivas (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009; WONG et al., 2001).

A deficiência de iodo pode, desde que afetada a tireóide, influenciar a fertilidade. A introdução de I nas dietas minerais leva à melhora da libido, e maior concentração e motilidade dos espermatozóides. O acréscimo deste elemento na alimentação pode provocar um aumento da atividade tireoidiana que, por sua vez, melhora a capacidade reprodutiva pelo estímulo que provoca sobre a hipófise anterior responsável pela secreção de gonadotrofinas (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

1.5 Toxicidade dos Metais para a reprodução

A toxicologia veterinária tem despertado grande interesse, principalmente do ponto de vista dos animais de produção (bovinos, suínos, aves, etc), que estão expostos a agentes empregados na agropecuária, medicamentos veterinários e a resíduos de metais presentes nos alimentos, no solo, nas plantas e na água. Atualmente, tem sido rara a ocorrência de toxicidade aguda relacionada à presença de metais em produtos veterinários, tais como, aditivos alimentares e

carrapaticidas, pois o surgimento de princípios ativos mais seguros e legislação mais rigorosa têm provocado a substituição destes elementos. Porém, a toxicidade crônica, gerada pela exposição prolongada a baixas concentrações de metais tóxicos, pode resultar em danos significativos à criação, tornando-se um problema de saúde pública, cabe ressaltar que muitas plantas são acumuladoras destes metais e podem servir de alimento para os bovinos. Neste contexto, existe uma preocupação crescente em relação aos possíveis efeitos tóxicos dos metais sobre a reprodução dos mamíferos (PERALTA-VIDEA et al., 2009; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Cádmio e chumbo são elementos tóxicos muito estudados em relação aos seus efeitos sobre a reprodução, exposição a estes elementos tem demonstrado correlação com infertilidade e produção de sêmen de baixa qualidade em vários experimentos (MEEKER et al., 2010; XU et al., 1993). Estudos toxicológicos demonstraram que metais como cádmio, chumbo e arsênio, podem se acumular nos testículos e epidídimo, alterando suas funções reprodutivas e endócrinas. Estes elementos atingem os espermatozoides, e embora o mecanismo de ação tóxica ainda não tenha sido completamente estabelecido, é certo que este processo envolve a geração de espécies reativas de oxigênio, causando lipoperoxidação lipídica e danos ao DNA, além de indução de apoptose e desenvolvimento de processos inflamatórios. Testes *in vitro* com espermatozoides de coelhos, concluíram que concentrações de Cd, Pb e As, acima de 1µM, provocam alterações morfológicas que podem reduzir a fertilidade (CASTELLANOS et al., 2010; CASTELLINI et al., 2009).

O chumbo é um metal tóxico que se distribui no meio ambiente gerado por fontes naturais e antropogênicas. Na medicina veterinária, principalmente entre os anos de 1960 e 1980, não era raro a presença deste elemento em comedouros, bebedouros, tintas de parede e até mesmo em medicamentos. Os animais mais suscetíveis à exposição são os ruminantes, bovinos com deficiências nutricionais podem apresentar perversão de apetite, chegando a mastigar objetos com altos teores de Pb. Este elemento pode ser absorvido por todas as vias, no caso dos animais, a via oral é a principal fonte de exposição e a absorção depende da solubilidade do sal ingerido, após ser absorvido, o Pb se distribui pelos tecidos, sendo os eritrócitos e o tecido ósseo os principais locais de deposição (PERALTA-

VIDEA et al., 2009; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). A acumulação deste elemento em tecidos pode causar vários problemas à saúde incluindo neurotoxicidade, hematotoxicidade e problemas reprodutivos. Estudos com humanos indicaram que uma anormalidade na estrutura da cromatina do espermatozóide, não está relacionada à concentração de chumbo no sangue, mas sim sua concentração no espermatozóide (BONDE et al., 2002; MASSANYI et al., 2004; RODMILANS et al., 1996). O Pb também parece estar relacionado à oligospermia e atenospermia (espermatozóides com baixa mobilidade). Este elemento não afeta apenas o número de espermatozóides, mas também causa danos a estrutura do espermatozóide e integridade da membrana, alterações da motilidade e atividade funcional, reduzindo a fertilidade (BENOFF et al., 2003; SLIVKOVA et al., 2009).

O cádmio é considerado um dos metais com maior efeito tóxico para o organismo animal, e devido a sua baixa taxa de excreção, possui efeito cumulativo. Uma das fontes de contaminação é a suplementação das rações com sulfato de zinco e outras fontes de zinco mal processadas, pode ocorrer também contaminação de lençóis freáticos e da vegetação, por resíduos industriais ou orgânicos, utilizados na fertilização de pastos e lavouras (PERALTA-VIDEA et al., 2009; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Exposição a este elemento, por via aérea ou oral, pode gerar disfunções renais, danos ao DNA e também vários efeitos sobre a reprodução, causando alterações degenerativas. Como possui uma meia vida biológica longa (10-30 anos), pode se acumular nas gônadas e, atuar em vários processos patológicos tais como a degeneração dos testículos e células de Leydig. (PERALTA-VIDEA et al., 2009; TOMAN; MASSANYI, 2002).

Os testículos são extremamente sensíveis à toxicidade do cádmio. Desde 1950 estudos têm demonstrado que o Cd provoca diminuição das células germinativas, edema testicular, hemorragia, necrose e esterilidade em várias espécies de animais, porém os mecanismos desta ação tóxica não estão completamente elucidados, descobertas recentes demonstram que o cádmio pode substituir o zinco e o cálcio em alguns processos fisiológicos causando ativação e/ou inativação de várias enzimas e também está relacionado ao estresse oxidativo gerando danos significativos aos testículos (SIU et al., 2009). Altas concentrações de Cd no esperma também estão correlacionadas com alterações de densidade do esperma, diminuição da motilidade e número de espermatozóides, resultando em

oligospermia (BLOTTNER et al., 1999; MASSANYI; LUKAC; TRANDZIK, 1996; SLIVKOVA et al., 2009; THOMPSON; BANNIGAN, 2008; XU et al., 2003).

Estudos com ratos apontaram vários efeitos nocivos do níquel sobre a reprodução, causando alterações estruturais e morfológicas nos testículos, vesícula seminal e próstata, levando a diminuição da motilidade e número de espermatozóides. Algumas pesquisas realizadas com bois, carneiros, javalis, cavalos e raposas, demonstraram uma correlação positiva entre a concentração de níquel no esperma e a ocorrência de separação do flagelo, também foi observada uma diminuição na estimulação da produção de testosterona pelas células de Leydig após tratamento de animais com concentração não citotóxica deste elemento (FORGÁCS et al., 2001; MASSANYI et al., 2000; PANDEY; SRIVASTAVA, 2000; SOBTI; GILL, 1989; ZEMANOVA et al., 2007). A presença de Ni também está correlacionada com alterações morfológicas, tais como, degeneração do epitélio testicular e sarcoma, e alterações funcionais – inibição da espermatogênese ou completa esterilidade e redução da produção de testosterona (SLIVKOVA et al., 2009).

Em relação ao arsênio, vários foram os compostos arsenicais utilizados como praguicidas e na medicina veterinária, como suplementos nutricionais para bovinos, promotores de crescimento e componente de fármacos para as mais diversas afecções. Atualmente, as principais fontes de exposição estão relacionadas à veiculação de altas concentrações de As em água ou ingestão de pastagens contaminadas. Este elemento provoca grande preocupação ambiental, devido a sua toxicidade e abundância, uma vez que está relacionado ao desenvolvimento de câncer em mamíferos. A principal via de absorção é por meio do trato gastrointestinal, o mecanismo de ação tóxica está relacionado à liberação de espécies reativas de oxigênio que agem sobre o DNA e também atacam a membrana dos espermatozóides, resultando em lesões irreversíveis. O arsênio também provoca várias alterações metabólicas, por se ligar a grupos contendo enxofre, de enzimas e proteínas (PERALTA-VIDEA et al., 2009; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

O bário é um constituinte natural do solo, mas é gerado por várias fontes antropogênicas. O aumento da concentração deste elemento no solo provoca a acumulação em algumas plantas e a transferência para os animais através da

cadeia alimentar. Sais insolúveis de bário, tais como o sulfato, utilizado para contraste em radiografias, não apresentam efeitos tóxicos por não serem absorvidos pelo organismo, porém sais solúveis, como o cloreto e o nitrato, usados como praguicidas e na fabricação de fogos de artifício, são extremamente tóxicos e se ingeridos podem causar a morte. Intoxicações por Ba estão associadas a manifestações neurológicas e cardiovasculares, aumento do ritmo cardíaco, salivação excessiva, tremores, convulsões, insuficiência respiratória e hemorragias internas. (OSKARSSON; REEVES, 2007; PÉLISSIER-ALICOT et al., 1999).

Em relação aos efeitos sobre a reprodução, estudos demonstraram que este elemento interfere na capacitação do espermatozóide, processo que requer hiperpolarização da membrana, aumento do cálcio intracelular e aumento de pH. Neste mecanismo estão envolvidos canais de potássio, que são bloqueados pelo bário, impedindo a hiperpolarização e consequentemente afetando o processo de capacitação e a fertilização (ACEVEDO et. al., 2006).

O céσιο possui 31 isótopos, e é utilizado em indústrias, na esterilização de alimentos, fabricação de detectores infravermelhos, eletrodos e baterias alcalinas, e também na medicina, na radioterapia contra o câncer e outros tratamentos. Descobertas sobre o núcleo do Cs levaram a utilização deste elemento em atividades nucleares, resultando em acidentes e contaminações ambientais extremamente perigosas para os animais e vegetais (LESTAEVEL et al., 2010).

No organismo, o céσιο possui um comportamento análogo ao do potássio, sendo incorporado ao compartimento intracelular por transporte ativo. Após ser ingerido ou inalado, é rapidamente absorvido, se distribui de forma homogênea pelos tecidos moles, tais como, fígado, rins, baço e pâncreas e se concentra no músculo esquelético, a principal via de excreção é a urinária. A toxicidade do Cs está relacionada a alterações metabólicas e fisiológicas, podendo causar desordens reprodutivas, além de efeitos sobre a medula, fígado, rins, ossos, sistema nervoso e cardiovascular. Experimentos com ratos têm demonstrado que a exposição crônica ao céσιο gera alterações no metabolismo de vitamina D, colesterol e hormônios esteróides, já a exposição aguda, afeta principalmente a medula, fígado e sistema reprodutivo, causando azoospermia, atrofia testicular e esterilidade, também foi observada formação de tumores malignos e benignos em vários tecidos e órgãos,

podendo levar a morte (LESTAEVEL et al., 2010; MESSIHA, 1984; PINSKY; BOSE, 1984).

1.6 Aparelho Reprodutor Bovino

O aparelho reprodutivo bovino é constituído basicamente por:

Testículos: em número de dois, com forma ovalada, alojados na bolsa escrotal, possuem duas funções primordiais: a produção de espermatozóides, através do processo de espermatogênese, que dura cerca de 61 dias nos bovinos e a produção do hormônio sexual masculino, testosterona e outros hormônios como progesterona, estrógenos e colesterol, através do processo de esteroidogênese. Estas duas funções ocorrem nos túbulos seminíferos, onde estão as células de Sertoli e nas células intersticiais ou células de Leydig (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Epidídimo: canal que serve para transporte e reservatório de espermatozóides produzidos nos testículos. É constituído de cabeça – onde ocorre reabsorção, corpo - transporte e a maturação espermática e cauda - tem a função de armazenamento dos espermatozóides férteis. Ao passar pelo epidídimo os espermatozóides sofrem alterações morfológicas e funcionais importantes como a migração da gota citoplasmática de uma posição proximal para distal, condensação da cromatina, início da motilidade e habilidade para reconhecer e se ligar ao oócito. A passagem do espermatozóide através do epidídimo dura cerca de 10 dias nos bovinos. Na cabeça do epidídimo estão localizados cerca de 36% dos espermatozóides, no corpo cerca de 18% e o restante localiza-se na cauda (HAFEZ; GARNER, 1995; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Ducto deferente: tem função de transportar os espermatozóides, vindos do epidídimo no momento da ejaculação (HAFEZ; GARNER, 1995; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Glândulas sexuais acessórias: são responsáveis pela produção de líquidos que nutrem os espermatozóides e estão situadas junto à uretra, elas contribuem para a variação da concentração e volume do ejaculado. As glândulas vesiculares, prostática e bulbouretral são estruturas localizadas na pélvis, e nestas estruturas é produzido o plasma seminal, que é o maior responsável pelo volume do ejaculado em bovino e atua como veículo para conduzir os espermatozóides do trato

reprodutivo masculino para o feminino (HAFEZ; GARNER, 1995; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Pênis: é o órgão masculino responsável pela cópula, ou seja, através dele os espermatozóides são depositados no órgão genital feminino, é formado por uma porção denominada corpo, pelo músculo retrator e pela glândula (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Prepúcio: é uma camada de pele que recobre e protege o pênis, constitui-se de partes externa e interna, que se ligam ao pênis, contendo glândulas para lubrificação. O óstio prepucial é a abertura através da qual ocorre a exteriorização normal do pênis (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

1.7 Sêmen

A produção de sêmen se inicia com a espermatogênese, que ocorre nos testículos, mais precisamente, nos túbulos seminíferos, onde se encontram as células de Sertoli. A espermatogênese é um processo cíclico no qual os gonócitos, primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e diferenciam-se em espermatogônias. A última geração destas células, formada pelas espermatogônias B, sofrem meiose, formando os espermatócitos primários que originam as espermátides arredondadas (células haplóides), que irão se diferenciar em espermatozóides, num processo chamado espermiogênese. O desenvolvimento da espermatogênese depende do suporte funcional das células de Sertoli, das concentrações adequadas de esteróides, gonadotrofinas, alguns minerais e de fatores de crescimento. O processo de multiplicação, meiose e diferenciação das células germinativas em estágios mais avançados de desenvolvimento está sincronizado com as mudanças morfológicas e a expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig e as secreções hormonais (AGUIAR; ARAÚJO; MOURA, 2006; HAFEZ; GARNER, 1995).

Os espermatozóides ao final da espermatogênese possuem aspecto alongado, conforme demonstrado pela Figura 1. São constituídos por: cabeça - com formato achatado e DNA compacto, peça intermediária - responsável pela conexão da cabeça com a cauda, cauda - onde estão localizadas as mitocôndrias, tem como função originar a movimentação do espermatozóide e acrossomo – estrutura composta por uma camada dupla de membranas, que envolve a cabeça, e é uma

das responsáveis pela capacitação do espermatozóide. O acrossomo é composto por várias enzimas hidrolíticas (hialuronidase, esterases e acrosina) que são envolvidas no processo de fertilização. O amadurecimento dos espermatozóides e o progressivo aumento de sua motilidade continuam ao misturá-los com o plasma seminal e inclusive depois da emissão de sêmen nas vias genitais femininas (AGUIAR; ARAÚJO; MOURA, 2006; ROBINSON et al., 2006; TURNER, 2008).

Figura 1. Esquema de um espermatozóide – cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda. (Adaptado de DIRKSEN; GRUNDER; STOBBER, 1993).

O sêmen é um líquido com aspecto semi gelatinoso, que possui os gametas masculinos e uma porção líquida, denominada de plasma seminal, formada no ato da ejaculação, composta por secreções dos órgãos acessórios que compõem o sistema reprodutivo masculino. O volume de sêmen pode variar conforme o método de coleta (eletroejaculação – impulsos elétricos, vagina artificial, etc), características do próprio animal e eficiência da contração dos vasos deferentes e do epidídimo, em resposta aos estímulos. O aspecto reflete a concentração de espermatozóides no ejaculado, e pode variar de cremoso ou marmóreo, leitoso, opaco até aquoso. Normalmente, a cor do sêmen é branca ou marmórea. O pH do sêmen nos bovinos pode variar de 6,4 a 7,8 tornando-se mais ou menos alcalino com a quantidade de secreção das glândulas acessórias (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

A motilidade (porcentagem de espermatozóides móveis) apresenta correlação com a fertilidade e deve ser avaliada imediatamente após a coleta do esperma. O sêmen não deve sofrer choques térmicos e ação dos ventos, que podem comprometer a sua qualidade, o ideal é manter o sêmen, desde a coleta até as

avaliações, numa temperatura semelhante à corporal (37,5°C). A fertilidade é dependente da porcentagem de células anormais no ejaculado, por isso, a análise das características morfológicas é muito importante para se conhecer a eficiência reprodutiva do touro. As anormalidades morfológicas são classificadas em: defeitos maiores e defeitos menores. Os defeitos maiores são consequência de anomalias no testículo e epidídimo, e podem comprometer seriamente a fertilidade, como por exemplo: espermatozóide subdesenvolvido, formas duplas, decapitados, piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça isolada anormal, defeitos da peça intermediária, gotas proximais, pseudo gotas, cauda fortemente dobrada e enrolada. Os defeitos menores são as anomalias espermáticas menos importantes, talvez não ligadas diretamente a processos patológicos dos testículos, tais como: cabeça delgada, pequena, larga, gigante e curta, cabeças isoladas normais, destacamento de acrossomo, gota distal e cauda dobrada (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

1.8 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

O crescente interesse sobre os efeitos de macronutrientes e principalmente elementos traço no organismo, através da determinação de metais em amostras de fluidos biológicos, gerou uma procura por medidas cada vez mais confiáveis e precisas, o que evidenciou a necessidade de técnicas analíticas cada vez mais eficazes e sensíveis para análises de amostras clínicas (BLAS BRAVO et al., 2007; GOULLÉ et al., 2005; SANTOS, 2006; TAYLOR et al., 2004; TAYLOR, 2006). Atualmente, as mais conhecidas neste tipo de pesquisa são: espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e com chama (FAAS), espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (BOLANN et al., 2007; TAYLOR, 2006; THOMAS, 1999).

A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) é uma técnica monoelementar que utiliza uma chama para gerar átomos no estado fundamental, quando a luz passa através da “nuvem atômica” formada na chama, comprimentos de onda característicos dos metais de interesse presentes na

amostra, são absorvidos. O FAAS possui um limite de detecção na ordem de mgL^{-1} . A espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) é também uma técnica monoelementar. Neste caso a chama é substituída por um pequeno tubo de grafite aquecido para gerar a fonte de átomos. Ocorre uma alta concentração de átomos no estado fundamental em uma área menor que a chama, isto acarreta uma maior absorção de luz, resultando em um limite de detecção aproximadamente 100 vezes menor que o do FAAS. A espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES) é uma técnica multielementar e assim como o ICP-MS, utiliza o plasma para excitar os átomos, mas neste caso eles são excitados até o ponto em que emitam fótons com comprimentos de onda característicos de um elemento específico. Já o ICP-MS utiliza o plasma para gerar íons dos elementos (SANTOS, 2006; THOMAS, 2001b).

O ICP-MS é uma ferramenta versátil e apresenta vantagens, quando comparada as outras técnicas de espectrometria atômica, devido a sua capacidade analítica multielementar, análises isotópicas, alta sensibilidade, baixo limite de detecção, eficiência e utilização de pequeno volume de amostra (SUTTON; CARUSO, 1999; TAYLOR, 2006; THOMAS, 1999). Diante destas razões, o ICP-MS têm se destacado na análise de elementos traço em amostras biológicas, como, sangue, plasma, sêmen e urina.

Os primeiros equipamentos foram comercializados em 1983, e o ICP-MS foi inicialmente utilizado para análise de amostras geológicas, na caracterização e datação de rochas e minérios (OLIVEIRA, A. P., 2006; TAYLOR et al., 2004; TAYLOR et al., 2005; TAYLOR et al., 2006). O espectrômetro de massas é um instrumento que separa íons em movimento, com base em suas razões massa-carga (m/z), e é composto por cinco partes principais: sistema de introdução de amostra, ICP (fonte de íons), interface (focalização), sistema analisador e sistema de detecção de íons. Um esquema das partes que compõe o espectrômetro de massas é demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Esquema do sistema de análise por ICP-MS: sistema de introdução da amostra (bomba, nebulizador e câmara de nebulização); ICP (fonte de íons) – tocha, bobina de radiofrequência e plasma; interface (focalizador) – acopla o ICP ao MS – cone de amostragem, região de expansão, *Skimmer* e lentes iônicas; sistema analisador de massa (quadrupolo) e sistema de detecção. (Adaptado de THOMAS, 2001a).

A forma mais utilizada de introdução de amostras é a líquida, apresentando vantagens quanto à homogeneidade. O sistema de introdução de amostra convencional é formado por um nebulizador pneumático ou ultrassônico e uma câmara de nebulização. A amostra é bombeada até o nebulizador onde é transformada em um aerossol fino, segue então para a câmara de nebulização que separa as gotas maiores das menores. Depois disto, o fluxo de argônio (gás nebulizador) carrega a amostra até o plasma, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (SANTOS, 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SUTTON; CARUSO, 1999; THOMAS, 2001a) conforme representado na Figura 3.

Figura 3. Sequência de eventos que ocorrem com a amostra após sua introdução e até a chegada no plasma. (Adaptado de THOMAS, 2001a).

O plasma é gerado em uma tocha de quartzo, que consiste em três tubos concêntricos para o transporte de gás argônio. O fluxo de gás externo, designado fluxo de resfriamento ou gás suporte é introduzido tangencialmente na tocha, e sustenta o ICP. O fluxo auxiliar (tubo intermediário) é usado para manter o plasma afastado das laterais da tocha de quartzo. O fluxo de gás interno (gás nebulizador) transporta a amostra nebulizada até o plasma (SUTTON; CARUSO, 1999).

A tocha é adaptada a um gerador de radiofrequência de 27,12 ou 40,68 MHz, através de um filamento metálico. A corrente de radiofrequência (RF) que circula através do filamento metálico, gera campos elétricos e magnéticos oscilantes, que produzem uma região de indução no topo da tocha. A ionização do fluxo de argônio (para formação do plasma) é iniciada por uma faísca proveniente do filamento metálico (bobina de *Tesla*), que fornece íons e elétrons livres, estes são acelerados vetorialmente pelos campos elétricos e magnéticos, tendo energia suficiente para ionizar o gás argônio. Colisões sucessivas com os átomos de gás produzem mais íons e uma vez alcançada a temperatura de ionização, o processo é auto-sustentável e um plasma é formado quase instantaneamente. O gás permanece eletricamente neutro, e parte da energia do plasma é então transferida para excitar e ionizar o analito (SUTTON; CARUSO, 1999; THOMAS, 2001b).

O ICP produz íons monocarregados, para transportar estes íons para o espectrômetro de massas (MS), é utilizada uma interface, com bomba de vácuo de múltiplo estágio, esta interface acopla a tocha de ICP ao MS, e sua principal função é reduzir a pressão e a densidade do feixe, minimizando a perda de íons. O feixe de íons formado no plasma é extraído desta região por uma diferença de pressão, e lançado para uma região de baixa pressão (THOMAS, 1999). Os íons atravessam o pequeno orifício do cone de amostragem, de níquel ou platina (aproximadamente 1 mm de diâmetro), que se encontra refrigerado, e passam para uma região de pré-vácuo, onde ocorre a expansão do gás, resultando em seu resfriamento. Da mesma forma, uma fração destes íons passa através do pequeno orifício de um segundo cone, denominado *Skimmer* e a maior parte do argônio é bombeada para fora, em seguida os íons seguem para uma câmara mantida a pressão do espectrômetro de massas (SUTTON; CARUSO, 1999). Nesta câmara os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares, por um potencial negativo, são acelerados

e focalizados por uma série de lentes magnéticas (eletrodos submetidos a diferentes voltagens), seguindo então para o orifício de entrada do analisador de massas (SANTOS, 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; THOMAS, 2001c).

No analisador, os íons são separados de acordo com sua razão massa/carga. O analisador de massas mais utilizado é o quadrupolo, embora existam analisadores de massas para se conseguir alta resolução como o focalizador de setor duplo (SUTTON; CARUSO, 1999). Com o desenvolvimento de ICP-MS com cela de colisão (CC) e reação dinâmica (DRC), esta técnica se mostrou altamente favorável para a determinação de muitos elementos em amostras clínicas, simplificando-se a etapa de pré-tratamento das amostras, uma vez que permite a introdução direta da amostra, reduzindo as interferências (THOMAS, 2001c).

Interferências em ICP-MS

Apesar das muitas vantagens, principalmente na análise de elementos traço em matrizes biológicas, o ICP-MS também é uma técnica suscetível a problemas, pois várias interferências significativas podem ocorrer relacionadas à formação de óxidos, elementos presentes na matriz e/ou diluente, no ar atmosférico e gás argônio. É fundamental entender as possíveis interferências para a correta interpretação dos dados e desenvolvimento de metodologias analíticas. As interferências em ICP-MS podem ser divididas em: físicas e espectrais.

Interferências Físicas

Estão relacionadas com as propriedades físicas das amostras, tais como, viscosidade, tensão superficial e volatilidade, que podem interferir na introdução e ionização da amostra no plasma. Para detectar e corrigir estas interferências pode-se utilizar: padrão interno, adição de padrão, diluição isotópica, ajuste de matriz ou aumentar a diluição da amostra (NIXON; MOYER, 1996). As interferências físicas podem ser divididas em dois grupos: interferências de transporte e supressão ou aumento da intensidade de sinal do analito.

O exemplo mais claro de interferência de transporte é a obstrução da abertura de entrada do cone de amostragem e do *Skimmer*, que pode ocorrer

quando são medidas soluções contendo altas concentrações de sais de baixa volatilidade ou compostos orgânicos (formação de depósitos de carbono). A deposição de sais ou carbono reduz o diâmetro de abertura dos cones, comprometendo a sensibilidade e afetando o processo de amostragem. O nível de tolerância para o teor de sólidos dissolvidos é de 0,2%, para análises por ICP-MS. A viscosidade da amostra também está relacionada com a interferência de transporte quando se usa a nebulização pneumática, pois uma viscosidade maior gera gotas maiores, diminuindo a quantidade de amostra que alcança o plasma, e por consequência diminui o sinal do analito. Outra propriedade importante é a tensão superficial, já que líquidos com menor tensão superficial produzem partículas menores, aumentando a quantidade da amostra que chega ao plasma. A viscosidade e a tensão superficial afetam a taxa de aspiração, tamanho das gotas (aerossol) e a sensibilidade (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992; SILVA, 2004).

A matriz da amostra pode ter um grande efeito sobre a temperatura do plasma e, assim, na atomização e nas características de ionização do plasma. A supressão da ionização do analito no plasma pode ocorrer devido a um excesso de um elemento na matriz com baixo potencial de ionização, que pode levar a um excesso de elétrons e íons positivos, os quais provocam um deslocamento do equilíbrio no plasma, levando a formação de átomos do analito (GREGOIRE, 1987). Como este efeito está relacionado a quantidade absoluta do elemento causador da interferência, esta pode ser reduzida através da diluição da amostra, as condições operacionais do plasma também devem ser consideradas (EVANS; GIGLIO, 1993).

O efeito de espaço-carga também é uma interferência física, que provoca supressão do sinal, neste caso, como os íons têm uma energia translacional de acordo com sua massa, um excesso de íons relativamente pesados, provenientes da matriz, faz com que os íons mais leves sejam repelidos do feixe de íons, suprimindo seu sinal, uma vez que, poucos chegam até o detector (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992; SILVA, 2004).

Outra interferência observada é o efeito de memória, ocasionado pelo lento decaimento do sinal para um nível de até 0,1% do sinal total, quando a solução do analito é substituída pelo branco. Isto ocorre devido principalmente, ao excesso de analito proveniente das paredes da câmara de nebulização e vidrarias relacionadas, tornado-se pior para os componentes mais voláteis, tais como, Pb, Cd,

Li e Hg, e menos comum para componentes refratários (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

Interferências Espectrais

As interferências espectrais ocorrem quando uma espécie iônica no plasma tem a mesma razão massa/carga (m/z) que um íon do analito. Estas interferências são mais encontradas na determinação de elementos com massa inferior a 82 u.m.a. (As, Zn, Fe), e podem ser divididas em: interferências isobáricas e interferências poliatômicas (Tabela1).

As interferências isobáricas ocorrem quando dois elementos possuem isótopos de mesma massa nominal (sobreposição de leitura), por exemplo, ^{40}Ca (isótopo mais abundante) e ^{40}Ar . Este tipo de interferência raramente impede uma determinação, pois a maioria dos elementos possui um isótopo livre de superposição isobárica, então pode-se escolher outro isótopo do elemento, por exemplo, ^{44}Ca (segundo isótopo mais abundante) (EVANS; GIGLIO, 1993; SANTOS, 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As interferências poliatômicas ocorrem devido à formação de moléculas ionizadas, nas altas temperaturas do plasma ou na região de interface. Estes íons poliatômicos podem interferir com alguns isótopos de mesma massa nominal, e são produzidos a partir do argônio e outros gases (O_2 e N_2), reagentes utilizados no tratamento das amostras (H_2SO_4 e HCl) ou componentes da própria matriz (sais e íons). As interferências poliatômicas mais comuns são: formação de óxidos (MoO , CaO , ArO), íons de dupla carga (elementos com segundo potencial de ionização baixo - Ba, La), dímeros (Ar_2 , O_2 , N_2), hidretos (ArH) e hidróxidos (CaOH , ArOH). Uma vez que a formação de íons no plasma depende da vazão do gás carregador e da potência de radiofrequência, estes parâmetros devem ser ajustados de maneira adequada para minimizar estas interferências. Já as interferências poliatômicas relacionadas à formação de íons contendo, H ou O, podem ser reduzidas utilizando-se membranas de dessolvatação ou nebulizadores ultrassônicos, que irão diminuir o carregamento do plasma com água (e a quantidade destes interferentes) (PRICHARD; MACKAY; POINTS, 1996; SILVA, 2004).

Tabela 1 - Interferências espectrais em ICP-MS de isótopos dos elementos em estudo e suas respectivas abundâncias

Isótopo	Abundância	Interferentes
⁷⁵ As	100	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺ , ⁵⁹ Co ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ³⁸ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ³⁹ K, ⁴³ Ca ¹⁶ O ₂ , ²³ Na ¹² C ⁴⁰ Ar, ¹² C ³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺
¹³⁰ Ba	0,106	⁹⁸ Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
¹³² Ba	0,101	¹⁰⁰ Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
¹³⁴ Ba	2,417	¹⁰² Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
¹³⁶ Ba	7,854	¹⁰⁴ Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
⁴⁰ Ca	96,97	⁴⁰ Ar ⁺
⁴² Ca	0,64	⁴⁰ Ar ¹ H ₂
⁴³ Ca	0,145	²⁷ Al ¹⁶ O ⁺
⁴⁴ Ca	2,06	¹² C ¹⁶ O ₂ , ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ⁺ , ²⁸ Si ¹⁶ O ⁺
⁴⁶ Ca	0,003	¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³² S ¹⁴ N ⁺
⁴⁸ Ca	0,19	³³ S ¹⁵ N ⁺ , ³⁴ S ¹⁴ N ⁺ , ³² S ¹⁶ O ⁺
¹¹⁰ Cd	12,5	³⁹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
¹¹¹ Cd	12,8	⁹⁵ Mo ¹⁶ O ⁺ , ⁹⁴ Zr ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁹ K ₂ ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺
¹¹² Cd	24,1	⁴⁰ Ca ₂ ¹⁶ O ₂ , ⁴⁰ Ar ₂ ¹⁶ O ₂ , ⁹⁶ Ru ¹⁶ O ⁺
¹¹³ Cd	12,22	⁹⁶ Zr ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ₂ ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ₂ ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁹⁶ Ru ¹⁷ O ⁺
¹¹⁴ Cd	28,7	⁹⁸ Mo ¹⁶ O ⁺ , ⁹⁸ Ru ¹⁶ O ⁺
¹¹⁶ Cd	7,49	¹⁰⁰ Ru ¹⁶ O ⁺
⁵⁹ Co	100,0	⁴³ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴² Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ²⁴ Mg ³⁵ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ²³ Na ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁹ F ⁺
¹³³ Cs	100,0	¹⁰¹ Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
⁶³ Cu	69,1	³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺ , ⁴⁷ Ti ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ⁴⁰ Ca ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ¹⁴ N ¹² C ³⁷ Cl ⁺ , ¹⁶ O ¹² C ³⁵ Cl ⁺
⁶⁵ Cu	30,9	⁴⁹ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ³³ S ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ¹² C ¹⁶ O ³⁷ Cl ⁺ , ¹² C ¹⁸ O ³⁵ Cl ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺
⁵⁴ Fe	5,82	³⁷ Cl ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N, ³⁸ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁶ S ¹⁸ O ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O
⁵⁶ Fe	91,66	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺
⁵⁷ Fe	2,19	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁹ F ⁺
⁵⁸ Fe	0,33	⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺
²⁴ Mg	78,7	¹² C ₂ ⁺
²⁵ Mg	10,13	¹² C ₂ ¹ H ⁺
²⁶ Mg	11,17	¹² C ¹⁴ N ⁺ , ¹² C ₂ ¹ H ₂ ⁺ , ¹² C ¹³ C ¹ H ⁺
⁵⁵ Mn	100,0	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ²³ Na ³² S ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁹ F ⁺
⁹⁴ Mo	9,3	³⁹ K ₂ ¹⁶ O ⁺

Isótopo	Abundância	Interferentes
⁹⁵ Mo	15,9	⁴⁰ Ar ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁶ Mo	16,7	³⁹ K ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁷ O ⁺
⁹⁷ Mo	9,6	⁴⁰ Ar ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁸¹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁸ Mo	24,1	⁸¹ Br ¹⁷ O ⁺ , ⁴¹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
⁵⁸ Ni	67,77	²³ Na ³⁵ Cl ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ⁴² Ca ¹⁶ O ⁺ , ²⁹ Si ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ²³ Na ³⁵ Cl ⁺
⁶⁰ Ni	26,16	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ³⁷ Cl ⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁶¹ Ni	1,25	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁵ Sc ¹⁶ O ⁺
⁶² Ni	3,66	⁴⁶ Ti ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ³⁹ K ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Ni	1,16	³² S ¹⁶ O ⁺ , ³² S ₂ ⁺
²⁰⁶ Pb	24,1	¹⁹⁰ Pt ¹⁶ O ⁺
²⁰⁷ Pb	22,1	¹⁹¹ Ir ¹⁶ O ⁺
²⁰⁸ Pb	52,4	¹⁹² Pt ¹⁶ O ⁺
⁷⁴ Se	0,87	³⁷ Cl ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁶ S ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁴ S ⁺
⁷⁶ Se	9,02	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁸ Ar ⁺
⁷⁷ Se	7,58	⁴⁰ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ₂ ¹ H ⁺ , ¹² C ¹⁹ F ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺
⁷⁸ Se	23,52	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸⁰ Se	49,82	⁴⁰ Ar ₂ ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₃ ⁺
⁸² Se	9,19	¹² C ³⁵ Cl ₂ ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₃ ⁺ , ⁴⁰ Ar ₂ ¹ H ₂ ⁺
⁶⁴ Zn	48,89	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺ , ³² S ₂ ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺
⁶⁶ Zn	27,81	⁵⁰ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³² S ³⁴ S ⁺ , ³³ S ₂ ⁺
⁶⁷ Zn	4,11	³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ³⁴ S ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³³ S ³⁴ S ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺
⁶⁸ Zn	18,57	³⁶ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ³² S ⁺ , ³⁴ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁸ O ₂ ⁺ , ³² S ¹⁸ O ₂ ⁺ , ³² S ³⁶ S ⁺
⁷⁰ Zn	0,62	³⁵ Cl ³⁵ Cl ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁸ O ₂ ⁺ , ³⁶ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³⁴ S ³⁶ S ⁺ , ³⁶ Ar ³⁴ S ⁺ , ³⁸ Ar ³² S ⁺

(Reproduzido de May e Wiedmeyer, 1998)

Os óxidos são provenientes da dissociação incompleta da amostra ou recombinação de íons no plasma, sua formação também é associada com a quantidade de vapor de água transportado, pois o analito pode ser atomizado em um excesso de átomos de oxigênio. O controle da resposta de óxido em uma análise é determinado pela razão óxido/ íon (MO^+/M^+), geralmente expressa em porcentagem,

esta razão é uma aproximação da razão correta $MO^+/(MO^+/M^+)$, e na maioria dos casos não deve exceder 3%. A eliminação ou remoção dos óxidos está relacionada com a força de ligação entre o analito e o oxigênio. Um exemplo comum, é a interferência de $^{40}Ar^{16}O$ e $^{40}Ca^{16}O$ sobre o ^{56}Fe . Esta interferência pode ser reduzida através do aumento da potência do plasma (aumento da temperatura), diminuição da vazão do gás carregador, introdução de uma câmara de nebulização resfriada (a pelo menos 4°C) e utilização de nebulizador ultrassônico com sistema de dessolvatação. Outra alternativa é utilizar uma Cella de Reação Dinâmica (DRC) (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

Os íons de dupla carga aparecem no espectro com metade da massa do íon univalente desejado, isto acarreta pequena perda de sinal e consequentemente, da sensibilidade da espécie univalente. Os elementos mais suscetíveis a esta interferência são os de baixo potencial de ionização (alcalinos terrosos, terras-raras e alguns metais de transição). O controle desta interferência é realizado pelo monitoramento da razão M^{2+}/M^+ , que não deve exceder 3%. Aumentar a vazão do gás carregador ou diminuir a potência de radiofrequência (reduzindo a temperatura do plasma) são opções para controlar esta interferência (SILVA, 2004).

Cela de Reação Dinâmica (DRC)

A cela de reação dinâmica (DRC) é um dispositivo, que pode ser adicionado ao ICP-MS para reduzir interferências espectrais e começou a ser comercializado em 1999. Ele atua como uma interface, localizado na câmara de vácuo, entre as lentes iônicas e o analisador de massa e promove a reação entre o íon (analito ou interferente) e a molécula (gás de reação), para conter as interferências e, assim, melhorar a sensibilidade do analito. O DRC é constituído por um quadrupolo, pressurizado com um gás de reação, que pode ser Xe, CH₄, (CH₃)₂, NH₃, He e mistura H₂:Ar (1:9 v/v), com lentes em cada extremidade sendo alimentado por radiofrequência (rf) – focaliza os íons e promove as colisões e reações, e voltagem DC (contínua) (BARANOV; TANNER, 1999; TANNER; BARANOV; VOLLKOPF, 2000).

Os analitos e os interferentes, após passarem pela interface do ICP-MS, são levados sob vácuo até o DRC que possui dois modos para eliminar esses

interferentes: discriminação por energia cinética e discriminação por massa. A discriminação por energia cinética é feita colocando-se o DRC com polarização menos positiva que a polarização do filtro de massas, isto faz com que os produtos iônicos das colisões, que tem a mesma energia da cela, sejam rejeitados e os íons do analito, com maior energia, sejam transmitidos. A discriminação por massa é feita utilizando-se um quadrupolo no interior do DRC, que funciona como um filtro de massas, semelhante ao quadrupolo do ICP-MS. A transmissão dos íons dentro do quadrupolo é gerenciada por um diagrama de estabilidade e o seu posicionamento é definido por dois parâmetros de rejeição: RPa (proporcional a voltagem DC) e RPq (proporcional a voltagem rf), sendo que a e q são parâmetros definidos pelas equações de *Mathieu* e descrevem as regiões de estabilidade e instabilidade dos íons no quadrupolo (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; THOMAS, 2002a).

Uma vez que os íons possuem carga, eles podem interagir com o momento dipolo de uma molécula polar ou induzir um dipolo em uma molécula não polar, estas interações são efetivas e ocorrem para a maioria das distâncias inter atômicas, sendo assim, a taxa de colisão entre os íons e moléculas neutras é alta. As interações íon-dipolo são, geralmente, fortes o suficiente, para excederem a barreira da energia de ativação e promoverem reações exotérmicas, permitidas pela termodinâmica, logo as reações íon-molécula normalmente são rápidas e altamente específicas. Como a barreira da energia de ativação, para promover as reações, é geralmente insignificante, a probabilidade de uma partícula (elétron, átomo de hidrogênio e próton) transferir reações é secundária e depende da exotermicidade da reação (diferença de potencial de ionização entre produto e reagentes neutros para promover a transferência de elétrons) (TANNER; BARANOV, 1999; TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002).

Os tipos de reações que ocorrem no interior da câmara geralmente são: reação de transferência de carga (equação 1) – depende do potencial de ionização (PI), deve-se considerar: $PI_{\text{analito}} < PI_{\text{gás de reação}} < PI_{\text{íon interferente}}$; reação de transferência de prótons (equação 2); e reação de oxidação – onde o gás, ao invés de reagir com o interferente, reage com o íon do analito (equação 3).

A Figura 4 mostra um esquema do DRC-ICP-MS, e um exemplo de interferência isobárica, entre ^{56}Fe e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, solucionado com a utilização de DRC tendo NH_3 como gás de reação, ocorre a formação de átomos de oxigênio e argônio e o íon positivo NH_3 , conforme mostrado pela equação 1, eliminando assim a interferência. A otimização do DRC deve considerar a vazão do gás onde se obtém o menor sinal de fundo e a intensidade máxima para o íon do analito, é importante observar que a vazão do gás escolhida, deve estar de acordo com o menor limite de detecção e com a natureza reativa dos analitos de interesse com o gás de reação (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; THOMAS, 2002a).

Figura 4. Esquema de um DRC-ICP-MS, mostrando a localização do DRC (entre as lentes iônicas e o quadrupolo). Exemplo da interferência isobárica entre o $^{56}\text{Fe}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, eliminada através da utilização do gás de reação NH_3 , ocorre uma reação de transferência de carga que resulta na formação de $\text{Ar} + \text{O} + \text{NH}_3^+$. (Adaptado de THOMAS, 2002a).

Os benefícios do DRC dependem do gás de reação e das taxas de reação do analito e dos interferentes, um exemplo é a eliminação da interferência de $^{40}\text{Ar}^+$ pelo gás de reação NH_3 , para determinação de ^{40}Ca . A reação 1, transferência de carga (ou de elétrons), ocorre porque o potencial de ionização da amônia (10,2 eV) é menor que o potencial do argônio (15,8 eV), a reação é exotérmica e rápida. Entretanto, o potencial de ionização do cálcio (6,1 eV) é menor que o potencial da amônia, correspondendo a uma reação endotérmica que não ocorre (Reação 2). A

diferença na taxa constante de reações entre elementos isobáricos como Ar^+ e Ca^+ , permite que o sinal para o íon Ar^+ , seja suprimido enquanto o sinal do íon Ca^+ não é afetado, isto gera uma grande melhora no limite de detecção deste elemento (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; THOMAS, 2002b).

Outro exemplo de gás de reação muito utilizado é o H_2 , que possui duas particularidades em relação a sua seletividade química. Primeiro, a ligação H-H é relativamente forte (energia de dissociação de 4,5 eV), no mínimo 2,0 eV mais forte que a maioria das ligações MH^+ , logo as reações de transferência do átomo H com cátions de metais, são geralmente endotérmicas e não ocorrem. Segundo, as reações de troca de energia entre o H_2 (potencial de ionização de 15,6 eV) e os cátions dos metais, com menor energia de ionização (6,0 a 9,0 eV), também são energeticamente impossíveis, resultando em especificidade reacionária com os interferentes. Se por um lado, a pequena massa do hidrogênio apresenta vantagens, por outro, tem sido demonstrado que apenas o H_2 (puro) é incapaz de produzir um ambiente termicamente eficiente para a entrada do feixe de íons na cela. Para resolver este problema foi proposta a utilização de misturas de H_2 com gases de maior peso, tais como: neônio (Ne), xenônio (Xe) ou argônio (Ar), estas misturas se mostraram eficientes na supressão dos interferentes (KOPPENAAL; EIDEN; BARINAGA, 2004)

A utilização do DRC tem demonstrado muitas vantagens na determinação de alguns elementos em amostras clínicas, uma vez que permite simplificar a etapa de pré tratamento da amostra, eliminando possíveis contaminações que podem ocorrer durante este processo, possibilitando a análise das amostras através de uma simples diluição e reduzindo interferências isobáricas, como as que ocorrem com os íons de ^{80}Se , ^{75}As e ^{56}Fe , devido a formação de $^{40}\text{Ar}_2$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$. O DRC associado com o filtro de massas do quadrupolo analisador é uma alternativa eficaz para a resolução química das interferências isobáricas, além disso, apresenta outros benefícios, tais como, aumento da

sensibilidade, precisão e resolução das massas (KOPPENAAL; EIDEN; BARINAGA, 2004; TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002).

1.9 Determinação de metais em sêmen

A maioria dos métodos usados para diagnosticar deficiências minerais ou avaliar a concentração destes elementos no organismo utiliza sangue, plasma, urina, sêmen ou outro fluido biológico como amostra. A escolha da amostra depende de muitos fatores, tais como: toxicocinética, tipo de procedimento para coleta (invasivo ou não), risco de contaminação da amostra e objetivo do estudo (PARSONS; BARBOSA, 2007). É preciso considerar que as deficiências minerais em bovinos também podem ser estudadas a partir da análise de solo ou pasto, porém ocorrem variações na disponibilidade e interferências entre minerais, além da dificuldade de coleta de uma amostra representativa e risco de contaminação, dificultando o diagnóstico (GONZÁLES, 2000).

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas, com maior sensibilidade, precisão e exatidão, têm permitido a utilização de matrizes menos ou não invasivas, tais como o sêmen. A análise de metais em sêmen é fundamental para a investigação de distúrbios relacionados ao aparelho reprodutor masculino, pois permite avaliar diretamente as concentrações dos elementos de interesse nas células reprodutivas e líquido seminal, onde exercem várias funções determinantes para a qualidade do sêmen e êxito na fertilidade, ressaltando que as concentrações de metais nesta matriz nem sempre refletem as concentrações sanguíneas dos elementos. A análise de sêmen também é útil para avaliação da exposição a metais tóxicos presentes no ambiente (ESTEBAN; CASTAÑO, 2009; ROCHA, 2003).

O interesse pelo efeito dos metais sobre as células reprodutivas tem levado a realização de vários estudos para determinação de metais em sêmen, utilizado diferentes técnicas analíticas e estratégias de preparo de amostra, com o intuito de determinar o maior número de elementos, com sensibilidade adequada e possibilidade de aplicação em rotina. Na tentativa de reduzir a etapa de preparo de amostra, muitos estudos têm utilizado o plasma seminal (parte líquida do sêmen, composta por secreções das glândulas acessórias), obtido por centrifugação. Porém, a concentração no plasma seminal não expressa diretamente a concentração do elemento no sêmen (ABDEL-RAHMAN et al., 2000).

Massanyi e colaboradores determinaram cobre, zinco, ferro, cádmio, níquel e chumbo, em sêmen de touros e carneiros. As amostras (cerca de 1g) foram digeridas em microondas, por 20 minutos, utilizando ácido nítrico e ácido clorídrico. Cádmio, níquel e chumbo foram determinados por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) e cobre, zinco e ferro, por chama (FAAS) (MASSANYI et al., 2004).

Slivkova e colaboradores determinaram cádmio, chumbo, zinco e cobre em sêmen humano. As amostras, cerca de 1 mL, foram submetidas a desmineralização em bloco digestor por 65 minutos a 120°C, utilizando ácido nítrico e ácido perclórico. Concentrações de Cd e Pb foram determinadas por voltametria de redissolução anódica (ASV) e Cu e Zn foram determinados por FAAS (SLIVKOVA et al., 2009).

Vários trabalhos utilizam o plasma seminal. Pesch, Bergmann e Bostedt, determinaram alguns elementos em plasma seminal de cavalos. Sódio, potássio, cálcio (utilizando o-cresoftaldeína), magnésio (reação de cor com *xilidylblue*), cobre (reação com 3,5-diBr-PAESA) e zinco (reação de complexação com 5-Br-PAPS), foram determinados por fotômetro de chama utilizando diferentes reações (PESCH; BERGMANN; BOSTEDT, 2006). Xu e colaboradores determinaram cádmio, chumbo e selênio em plasma seminal humano, utilizando espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (XU et al., 2003).

A maioria dos métodos descritos para determinação de metais em sêmen requer a digestão da amostra, para eliminação da matéria orgânica, o que acarreta um aumento no tempo de análise e risco de contaminação, e também a perda de elementos voláteis. Além disso, as técnicas utilizadas são geralmente monoelementares, exigem um maior volume de amostra e maior tempo de análise, sendo, portanto menos interessantes para uso em rotina.

Neste sentido, a utilização de métodos com introdução direta da amostra são mais atrativos, e quando associados à técnicas de alta sensibilidade, como o ICP-MS, apresentam muitas vantagens, pois permitem uma análise multielementar e também análises isotópicas, determinação de elementos traço (concentrações em um intervalo de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), com amplo intervalo linear, excelente precisão e exatidão, não requerem grandes volumes de amostra e

possuem alta velocidade de análise, sendo portanto, ideais para utilização em rotina (SUTTON; CARUSO, 1999).

A introdução direta de amostras biológicas em ICP-MS se apresenta como uma grande vantagem desta técnica e tem sido muito utilizada para determinação de elementos em sangue e plasma. As amostras, analisadas diretamente, são geralmente diluídas em surfactante Triton X-100, que impede o entupimento do bico injetor e nebulizador, e a utilização de uma maior diluição das amostras também evita estes problemas e reduz os efeitos de supressão de sinal devido à matriz (PALMER et al., 2006).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido para determinação de 15 elementos, essenciais e tóxicos em sêmen bovino, com introdução direta da amostra, utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente com cela de reação dinâmica (DRC-ICP- MS).

O método proposto foi em seguida aplicado para determinação destes elementos em amostras de sêmen bovino de animais de diferentes raças.

Diante da grande importância econômica dos rebanhos bovinos e dos programas de reprodução e inseminação artificial, a utilização de uma metodologia, simples, rápida e robusta, capaz de determinar através da introdução direta da amostra, elementos essenciais e tóxicos, apresenta-se como uma ferramenta imprescindível para a avaliação da qualidade do sêmen, podendo ser futuramente utilizada em análises de rotina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação e Acessórios

Neste projeto utilizamos um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente equipado com cela de reação dinâmica – DRC-ICP-MS, modelo ELAN DRC II (PerkinElmer, USA), conectado a um computador com o *software* ELAN versão 3.4. Este equipamento encontra-se instalado em uma sala limpa classe “1000”. Também foi utilizado um microondas, modelo Start D, (Milestone, USA). Um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama (FAAS), modelo AA 6200 (Shimadzu, Japão), com lâmpada de deutério para correção do sinal de fundo. E um espectrômetro de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GF AAS), modelo AAS 5 (Zeiss, Alemanha) equipado com lâmpada de deutério para correção do sinal de fundo e tubos de grafite com plataforma. Os comprimentos de onda utilizados para determinação de Se, Cu, e Mn por GF AAS foram: 196,0; 324,8 e 279,5 nm respectivamente. O volume de injeção das amostras foi de 20µL. Os elementos Ca, Fe, Mg e Zn foram analisados nos comprimentos de onda 422,7; 248,3; 285,2 e 213,9 respectivamente por FAAS.

3.2 Reagentes, soluções e limpeza de material

Foram utilizados água deionizada de alta pureza, resistividade 18,2 MΩ cm, obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®); ácido nítrico (HNO₃), (Vetec® - 65%v/v), destilado em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo da *Kürner Analysentechnik* para eliminação de impurezas e Triton® X-100 suprapuro (Sigma-Aldrich).

A limpeza do material utilizado para preparo e armazenamento das soluções e amostras requer uma atenção especial no caso de análise de baixas concentrações de metais. Diante disto, todos os frascos utilizados foram mantidos em solução de ácido nítrico 15% v/v por 24 horas, enxaguados com água Milli-Q e secos em câmara de fluxo laminar.

Foram empregadas solução multielementar a 10mg L⁻¹ (*Multi-element ICP-MS Calibration*, PerkinElmer), contendo os analitos Cd, Pb, Mn, Se, Ni, As, Co,

Ba e Cs; soluções padrão de 10mg L^{-1} de I e Mo e soluções de 1000mg L^{-1} para Ca, Cu, Fe, Mg e Zn (*Atomic spectroscopy standard*, PerkinElmer). Para os analitos: Cd, Pb, Mn, Se, Ni, As, Co, Ba, Cs, Mo e I, foram preparadas soluções estoque de $100\mu\text{g L}^{-1}$ e para Ca, Cu, Fe, Mg e Zn, soluções estoque de $10.000\mu\text{g L}^{-1}$ em HNO_3 bidestilado 4% v/v para o preparo das curvas de calibração.

Soluções de padrão interno de ródio (Rh), irídio (Ir) e ítrio (Y), (*Atomic spectroscopy standard*, PerkinElmer), de 1000mg L^{-1} , foram diluídas para o preparo de soluções estoque de $1000\mu\text{g L}^{-1}$ em HNO_3 bidestilado 4% v/v.

Nas análises por GF AAS foram utilizados padrões de Se, Cu e Mn de 1000mg L^{-1} (Merck) e os modificadores químicos paládio (Pd), (Fluka) solução a 1% v/v e magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), (Fluka) solução a 0,05% v/v.

Nas análises por FAAS foram utilizados os padrões de Ca, Fe, Mg e Zn de 1000mg L^{-1} (Ultra Scientific) e cloreto de lantânio ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), (Sigma-Aldrich) como modificador químico, solução a 5% m/v.

3.3 Preparo dos diluentes e das curvas de calibração

Para diluição das amostras e padrões foram preparadas solução diluente contendo surfactante Triton X-100 a 0,01% v/v e ácido nítrico bidestilado a 0,5% v/v em água deionizada e soluções de ácido nítrico bidestilado a 4% v/v.

Nas análises por ICP-MS, para elaboração da curva analítica de Cd, Pb, Mn, Se, Ni, As, Co, Ba, Cs, Mo e I, foram preparadas soluções padrão de 1 a $20\mu\text{g L}^{-1}$ e para os analitos Ca, Cu, Fe, Mg e Zn, foram preparadas soluções padrão de 200 a $2000\mu\text{g L}^{-1}$. As soluções padrão foram diluídas em diluente contendo 0,01% v/v de Triton X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico bidestilado, para análise das amostras por introdução direta e diluídas em ácido nítrico 4% v/v para análise das amostras digeridas. Em todas as amostras padrão foram adicionados $100\mu\text{L}$ da solução estoque de cada padrão interno (Rh, Ir e Y) avaliado, de modo que a concentração final de padrão interno nas amostras foi de $10\mu\text{g L}^{-1}$.

Nas análises por GF AAS foram elaboradas curvas analíticas de 2 a $10\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu e 2,5 a $25,0\mu\text{g L}^{-1}$ para Mn em HNO_3 0,5% v/v. Selênio foi analisado por adição de padrão, com adições de 0 a $20\mu\text{g L}^{-1}$ de Se. Em todas as amostras e

padrões, foram adicionados 3µL da solução de modificador químico Pd/Mg(NO₃)₂ (1:1 %v/v).

Nas análises por FAAS foram elaboradas curvas analíticas de 2,50 a 5,00 mg L⁻¹ para Ca; 0,04 a 0,12 mg L⁻¹ para Fe; 0,10 a 0,20 mg L⁻¹ para Mg e 0,06 a 0,14 mg L⁻¹ para Zn. Os elementos Ca, Mg e Zn foram determinados por ajuste de matriz, utilizando um pool de semen “base” diluído 1:10 para análise de Ca e Zn e diluído 1:50 para determinação de Mg, o diluente utilizado foi ácido nítrico bidestilado a 0,5% v/v. O ferro foi determinado utilizando calibração em meio aquoso, HNO₃ 0,5% v/v. Em todas as amostras padrão foram adicionados 200µL da solução de modificador químico cloreto de lantânio, obtendo uma concentração final de 0,1% v/v.

3.3.1 Calibração por ajuste de matriz

Para as curvas de calibração preparadas pelo método de ajuste de matriz, foi utilizado sêmen bovino “base”, obtido de animais sadios, diluído 1:50 (diluição final) em diluente contendo 0,01% v/v de Triton X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico bidestilado.

As curvas foram preparadas em sêmen “base” contendo os analitos: Cd, Pb, Mn, Se, Ni, As, Co, Ba, Cs, Mo e I, nas concentrações de 1 a 20µg L⁻¹ e Ca, Cu, Fe, Mg e Zn, nas concentrações de 200 a 2000µg L⁻¹. O diluente utilizado foi Triton X-100 a 0,01% v/v e ácido nítrico bidestilado a 0,5% v/v. Os padrões internos Rh, Ir e Y foram adicionados na concentração final de 10µg L⁻¹. Foram feitas duas amostras branco: a) contendo a matriz (sêmen diluído 1:50), o diluente e os padrões internos e b) branco reagente, contendo apenas o diluente e os padrões internos.

3.4 Amostras de sêmen

3.4.1 Coleta das amostras de sêmen

Para este estudo foram utilizadas amostras de sêmen coletadas de animais sadios utilizando vagina artificial. As amostras de sêmen bovino foram obtidas de empresa especializada em reprodução bovina e inseminação artificial, acondicionadas em tubos cônicos de 15mL “livres de metal” mantidas em nitrogênio

líquido do momento da coleta até a entrega das amostras, após isto as amostras foram mantidas em freezer (- 80°C) até serem analisadas.

3.4.2 Preparo do “pool” de sêmen e do sêmen “base”

Para desenvolvimento da metodologia analítica, foram preparados 4 “pool” de sêmen bovino, utilizando sêmen de seis diferentes animais para obtenção de cada *pool*. Nas determinações para otimização da metodologia, cada *pool* foi analisado em três replicatas de preparação.

O sêmen “base” utilizado na calibração por ajuste de matriz foi obtido a partir de um pool de sêmen contendo amostras de seis bovinos.

3.4.3 Preparo das amostras sêmen para introdução direta

Para avaliar o método de calibração em meio aquoso e por ajuste de matriz, as amostras foram diluídas na proporção 1:50 em solução diluente contendo 0,01% v/v Triton X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico bidestilado.

Em todas as amostras foram adicionados 100µL da solução estoque de padrão interno (Ir, Rh e Y), de modo que a concentração final de padrão interno nas amostras foi de 10µg⁻¹. Foram preparadas amostras branco contendo padrão interno (Ir, Rh e Y) em solução diluente.

3.4.4 Preparo das amostras para digestão

Para digestão, foram utilizados 1mL de amostra e 7mL de ácido nítrico 20%v/v. As amostras foram digeridas em microondas, segundo o programa de digestão descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de sêmen analisadas por ICP-MS

Etapa	Tempo	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	00:10:00	450	140
2	00:20:00	750	190
3	00:30:00	---	resfriamento

Após a digestão, as amostras foram transferidas para tubo cônico de 15mL e o volume foi completado para 10mL com água deionizada, em seguida, 2mL

desta solução foi transferido para tubo cônico, foi adicionado 100µL da solução estoque de padrão interno (Ir, Rh e Y) e o volume foi completado para 10mL com água deionizada.

Foram preparadas amostras branco da digestão em meio ácido, contendo 100µL da solução estoque de padrão interno (Ir, Rh e Y).

3.4.5 Preparo das amostras de sêmen para análise por espectrometria de absorção atômica

As amostras foram diluídas na proporção 1:10 em ácido nítrico bidestilado 0,5% v/v para análise de Cu, Se e Mn por GF AAS e foram preparadas amostras branco com ácido nítrico bidestilado 0,5% v/v e modificador químico Pd/Mg(NO₃)₂ (1:1 %v/v). As análises de selênio foram feitas por adição de padrão.

Para análise por FAAS as amostras foram diluídas 1:10 para determinação de Ca, Fe e Zn e 1: 50 para determinação de Mg, utilizando ácido nítrico bidestilado 0,5% v/v como diluente e cloreto de lantânio como modificador químico a 0,1% v/v. Foram preparadas amostras branco com ácido nítrico bidestilado 0,5% v/v e modificador químico e amostras branco contendo a matriz (sêmen diluído), modificador químico e diluente para as análises por ajuste de matriz.

3.5 Condições instrumentais de operação do ICP-MS

As condições instrumentais de operação do ICP-MS, ELAN DRC II, utilizadas para análise das amostras de sêmen, estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer)

Parâmetro	Condição/ característica
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo - amostras clínicas (2,0mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de radiofrequência (W)	1100
Vazão do argônio (L min ⁻¹)	
Nebulizador	0,56 - 0,98 (otimizado diariamente)
Plasma	15
Auxiliar	1,2
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
Skimmer	0,9mm
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
Sweeps (varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
Dwell time (tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Modo padrão (quadrupolo-ICP-MS)	⁷⁵ As, ¹³⁸ Ba, ¹³⁷ Ba, ⁴⁴ Ca, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ⁵⁹ Co, ¹³³ Cs, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁵⁷ Fe, ⁵⁸ Fe, ¹²⁷ I, ²⁴ Mg, ²⁵ Mg, ²⁶ Mg, ⁹⁸ Mo, ⁹⁵ Mo, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁸ Pb, ⁸² Se, ⁶⁴ Zn e ⁶⁶ Zn

3.6 Otimização da Cella de Reação Dinâmica por ajuste de matriz com sêmen base

Após ignição do plasma o gás de reação foi purgado três vezes (por 30 segundos), a uma vazão de 0,001mL min⁻¹ para garantir que o sistema contenha apenas o gás de reação, mistura de hidrogênio e argônio na proporção 1:9.

Para otimização do DRC-ICP-MS considerou-se os parâmetros Rpq e vazão do gás de reação, para cada valor de vazão do gás é feita uma varredura no quadrupolo instalado no DRC, para determinar o melhor Rpq. O ponto, vazão e Rpq, que apresenta menor concentração equivalente de sinal de fundo (BEC), é considerado a melhor condição devido a menor presença de interferentes.

Durante os testes foram utilizadas duas soluções: matriz – sêmen base diluído 1:50 (branco, contendo os interferentes da matriz, que irão gerar o sinal de

fundo) e *spike* (solução contendo a matriz – sêmen base diluído 1:50 e *spike* do analito na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$), assim foram definidos os valores de vazão e RPq que apresentam melhor sensibilidade para a concentração avaliada do analito em relação à matriz. As condições instrumentais de operação do DRC-ICP-MS estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais do DRC-ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer)

Parâmetro	Condição/ característica
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo - amostras clínicas (2,0mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de radiofrequência (W)	1100
Vazão do argônio (L min^{-1})	
Nebulizador	0,56 - 0,98 (otimizado diariamente)
Plasma	15
Auxiliar	1,2
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
Skimmer	0,9mm
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
<i>Sweeps</i> (varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
<i>Dwell time</i> (tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min^{-1})	1,0
Modo DRC (DRC-ICP-MS)	Gás de reação H_2 : ^{75}As , ^{59}Co , ^{127}I , ^{60}Ni , ^{58}Ni , ^{82}Se e ^{78}Se
Vazão H_2 (mL min^{-1})	0,1 a 1,4 (otimização diária)
Variação do RPq	H_2 : 0,40 a 0,50

3.7 Condições instrumentais do espectrofotômetro de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) e por chama (FAAS)

Para avaliação da exatidão do método analítico, as amostras de sêmen foram analisadas por duas diferentes técnicas analíticas: FAAS e GF AAS. Selênio, cobre e manganês foram analisados por GF AAS e os analitos cálcio, ferro, magnésio e zinco foram analisados por FAAS.

Os parâmetros utilizados nas análises por GF AAS, definidos após elaboração das curvas de pirólise e atomização dos analitos, estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 5 - Parâmetros otimizados para determinação de Se, Cu e Mn nas amostras de sêmen, por GF AAS

Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)	Vazão do gás argônio (L min ⁻¹)
90	5	20	Máx.
105	3	20	Máx.
110	2	10	Máx.
1200 ^c / 1300 ^{a,b}	250	10	Máx.
1900 ^{a,c} / 2000 ^b	1500	4	Stop
2300 ^{a,c} / 2500 ^b	500	4	Máx.

^aSe; ^bCu; ^cMn

Os parâmetros utilizados nas análises por FAAS, utilizando atomização por chama ar-acetileno (Ar-C₂H₂) e lâmpada de deutério para correção do sinal de fundo, definidos após otimização dos métodos, estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 6 - Parâmetros otimizados para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras de sêmen, por FAAS

Elemento	Corrente da lâmpada (mA)	Abertura da fenda (nm)	Vazão do gás argônio (mL min ⁻¹)
Ca	10	0,7	2,0
Fe	12	0,2	2,2
Mg	8	0,7	1,8
Zn	8	0,7	2,0

3.8 Padrões internos

A padronização interna é utilizada para corrigir flutuações do sinal (contagens por minuto) decorrentes de variações na viscosidade, densidade e tensão superficial, os quais afetam diretamente o transporte da amostra, prejudicando a repetitividade e a exatidão. A exatidão é afetada quando ocorre uma diferença entre a matriz da amostra e a matriz do padrão de calibração que afeta diferentemente o sinal do analito, a exatidão também pode ser influenciada por

desvios de comportamento do sistema analítico em função do tempo. O padrão interno é uma espécie química, não presente na amostra, incorporada a cada amostra e padrão em uma concentração fixa e conhecida. Assim, o procedimento envolve o cálculo da razão do sinal do analito pelo sinal do elemento escolhido como padrão interno.

Alguns critérios devem ser observados para a seleção do elemento a ser utilizado como padrão interno. Em ICP-MS, o elemento mais apropriado para ser utilizado como padrão interno é aquele que se encontra localizado mais proximamente do espectro de massa do analito e deve ser livre de interferências espectrais. Quando a análise multielementar cobre uma larga faixa de massa, podem ser usados vários elementos como padrão interno, simultaneamente, para alcançar valores ótimos. Para resultados ótimos, os analitos em determinação que utilizam valores de baixa razão massa/carga (m/z), requerem um padrão interno com baixo valor de m/z e os analitos com valores intermediários ou altos de m/z , requerem padrão interno localizado nesta mesma faixa de massa (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

No presente trabalho, foram avaliados três padrões internos: ródio (^{103}Rh), irídio (^{193}Ir) e ítrio (^{89}Y), adicionados na concentração de $10\mu\text{g L}^{-1}$, em cada amostra e nos padrões.

3.9 Validação Analítica

Existem várias definições para validação analítica e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração das agências reguladoras. Segundo a ANVISA, a validação analítica deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A farmacopéia americana (USP) acrescenta que a validação de métodos deve assegurar a sua credibilidade durante o uso rotineiro, diferentes operadores, com equipamentos similares e em diferentes laboratórios, sendo capaz, dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis. A validação é um processo que deve fornecer uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2007). Logo, todo método

analítico deve ser cientificamente respaldado pela credibilidade que uma validação analítica pode proporcionar.

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo adequado ao propósito de utilização do método, definindo assim os parâmetros analíticos que devem ser avaliados. Os parâmetros analíticos, também chamados de características de desempenho ou figuras de mérito, incluem: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

3.9.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é definida como a capacidade do método, de avaliar, de forma inequívoca, a substância ou elemento de interesse, na presença de componentes que podem interferir na sua determinação, tais como, componentes da matriz e elementos com propriedades semelhantes ao de interesse (ANVISA, 2003; USP, 2007).

No caso da técnica de ICP-MS, utilizando como detector um espectrômetro de massas, a seletividade é avaliada pela razão massa/carga do elemento. Pode-se também realizar estudos de adição e recuperação, apesar das limitações.

3.9.2 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do elemento em estudo. A relação entre o sinal obtido e a concentração do elemento, é expressa através de uma equação de reta, chamada curva analítica ($y = ax + b$). Os sinais obtidos são colocados no eixo das ordenadas (y) e as concentrações no eixo das abcissas (x). Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva (a - coeficiente angular, inclinação ou *slope* e b - coeficiente linear), é feita usando o método dos mínimos quadrados, também são calculados os coeficientes de correlação de *Pearson* (r) e de determinação (r^2), estes parâmetros permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como

evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2007).

Para validação deste parâmetro, foi elaborada uma curva analítica com 5 pontos (5 concentrações) e foram avaliados os coeficientes de correlação.

A faixa de aplicação de um método analítico corresponde ao intervalo de concentração, onde, a linearidade, precisão e exatidão obtidas são aceitáveis. A técnica de ICP-MS possui ampla linearidade, de mg L^{-1} a ng L^{-1} , devido principalmente aos detectores utilizados (duplo estágio: analógico e pulso), possibilitando assim uma ampla faixa de aplicação.

3.9.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do elemento, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ANVISA, 2003; USP, 2007). Pode ser calculado pela equação 4, onde DP representa o desvio padrão de 10 leituras consecutivas da amostra branco e o *slope* (coeficiente angular) é obtido a partir da curva analítica.

$$LD = 3,0 \times \frac{DP}{\text{slope}} \quad (\text{Equação 4})$$

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do elemento, que pode ser quantificada, com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental (ANVISA, 2003; USP, 2007). Pode ser calculado pela equação 5, onde: DP representa o desvio padrão de 10 leituras consecutivas da amostra branco e o *slope* (coeficiente angular) é obtido a partir da curva analítica.

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{\text{slope}} \quad (\text{Equação 5})$$

3.9.4 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada através desvio padrão relativo (coeficiente de variação - CV) de um número significativo de medições (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2007), conforme a equação 6, onde: CV é

o coeficiente de variação, expresso em porcentagem, DP é o desvio padrão das medidas e $\bar{x}$ é a média dos valores obtidos.

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

A precisão é considerada em três níveis: repetitividade ou precisão intra ensaio (representa a concordância entre resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições); precisão intermediária ou inter ensaio (avalia o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos) e reprodutibilidade (avalia a concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas, tais como a alteração de laboratório) (ANVISA, 2003; USP, 2007).

Para avaliar a precisão do método foram feitas análises de 4 *pools* de sêmen durante 2 dias, avaliando-se assim a precisão intra-ensaio (repetitividade), através do preparo em triplicata das amostras e a precisão intermediária.

3.9.5 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: utilização de materiais de referência certificados, comparação de métodos e ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2007).

Como não existem materiais de referência de sêmen, a exatidão do método foi avaliada através da comparação com resultados obtidos por outras técnicas analíticas e ensaios de recuperação realizados em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha do fator de diluição e diluente

A determinação de elementos químicos em matrizes biológicas utilizando introdução direta de amostra no ICP-MS tem sido aplicada frequentemente. Alguns métodos utilizam amostras diluídas 1:10, porém pode causar impregnação da matriz na câmara de nebulização e deposição no nebulizador e nos cones, o que acarreta interferências que inviabilizam a análise de um grande número de amostras. Diante disto, Palmer e colaboradores, propuseram um método para análise de amostras de sangue com uma diluição 1:50 em 0,005% v/v Triton X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico bidestilado, possibilitando a análise em rotina (PALMER et al., 2006). No presente estudo, avaliamos o mesmo diluente proposto por Palmer e colaboradores (PALMER et al., 2006).

Neste sentido, após estudos preliminares com 4 *pools* de sêmen, analisados em triplicata, mostrarem que em diferentes diluições (1:10, 1:20 e 1:50) são obtidos resultados e variações (desvio padrão) semelhantes, optamos por diluir as amostras de sêmen na proporção 1:50. A utilização do maior fator de diluição é vantajosa, pois permite utilizar um menor volume de amostra, além de minimizar o efeito de supressão de sinal causado pela matriz e reduzir a deposição de material nos cones, sendo mais aplicável a análise de rotina ou de um grande número de amostras, sem necessidade de limpeza mais frequente do sistema.

4.2 Determinação de metais em sêmen por ICP-MS, com introdução direta da amostra

Inicialmente foi avaliada a possibilidade de determinação direta dos metais em sêmen, utilizando a amostra diluída 1:50, em diluente contendo 0,01% v/v de Triton X-100 e 0,5% de ácido nítrico.

A calibração em meio aquoso é um método utilizado quando as espécies interferentes presentes na matriz, não produzem efeito significativo na diluição avaliada. Quando estas interferências são relevantes, uma opção é utilizar o método de calibração por ajuste de matriz, que consiste em duplicar a matriz da amostra nas soluções padrão e no branco, através da adição dos principais

componentes da matriz ou uso da própria matriz contendo baixos níveis dos elementos que serão analisados. Este método é utilizado com frequência na análise de amostras clínicas por ICP-MS. Outra alternativa para corrigir interferências causadas pela matriz é a calibração por adição de padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas dos analitos a serem determinados diretamente na amostra que se deseja analisar, desta forma constrói-se uma curva analítica e a extrapolação da reta obtida define, no eixo das abcissas, a concentração do elemento a ser determinado (PALMER et al., 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Foram avaliados o método de calibração em meio aquoso e por ajuste de matriz. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. As correções relacionadas ao fator de diluição das amostras foram consideradas, os resultados expressam a média das leituras em triplicata de 3 amostragens de cada “pool” de sêmen avaliado com o respectivo desvio padrão das medidas, ao lado do elemento, está o isótopo considerado na análise.

Tabela 7 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a introdução direta da amostra de sêmen, diluída 1:50, utilizando calibração em meio aquoso.

Elemento	Amostra (pool de sêmen) - Concentração $\pm$ DP*			
	1	2	3	4
Ca (44)	33093,1 $\pm$ 140,7	38345,8 $\pm$ 249,1	34780,5 $\pm$ 444,6	29254,1 $\pm$ 543,9
Cu (63)	70,3 $\pm$ 1,8	89,9 $\pm$ 0,4	72,3 $\pm$ 1,1	85,8 $\pm$ 1,9
Fe (57)	593,2 $\pm$ 16,9	614,0 $\pm$ 5,9	677,8 $\pm$ 5,0	620,0 $\pm$ 19,7
Mg (24)	8679,2 $\pm$ 337,8	7271,1 $\pm$ 47,1	7891,9 $\pm$ 116,3	8883,1 $\pm$ 175,7
Zn (64)	1258,1 $\pm$ 32,4	1013,5 $\pm$ 12,1	1179,0 $\pm$ 20,3	1171,1 $\pm$ 23,6
I (127)	78,5 $\pm$ 2,1	51,9 $\pm$ 0,7	56,2 $\pm$ 1,3	61,4 $\pm$ 1,9
Mo (98)	5,9 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,1
As (75)	6,3 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,4
Ba (138)	28,7 $\pm$ 1,0	28,0 $\pm$ 0,6	33,1 $\pm$ 0,3	26,9 $\pm$ 0,9
Co (59)	3,1 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,1
Cs (133)	16,4 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,1	14,2 $\pm$ 0,2
Mn (55)	46,1 $\pm$ 2,0	40,5 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 1,0	53,0 $\pm$ 1,3
Ni (60)	28,0 $\pm$ 2,8	33,3 $\pm$ 2,6	30,0 $\pm$ 3,8	29,2 $\pm$ 2,2
Pb (208)	12,3 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
Se (82)	636,8 $\pm$ 23,4	556,7 $\pm$ 3,4	521,4 $\pm$ 12,6	562,4 $\pm$ 11,1

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 8 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a introdução direta da amostra de sêmen, diluída 1:50, utilizando calibração por ajuste de matriz.

Elemento	Amostra (<i>pool</i> de sêmen) - Concentração $\pm$ DP*			
	1	2	3	4
Ca (44)	32837,3 $\pm$ 989,4	38359,3 $\pm$ 238,6	32333,6 $\pm$ 260,5	31675,3 $\pm$ 305,2
Cu (63)	62,3 $\pm$ 2,2	81,0 $\pm$ 3,6	55,7 $\pm$ 1,3	75,2 $\pm$ 1,2
Fe (57)	436,9 $\pm$ 24,2	454,8 $\pm$ 19,0	596,7 $\pm$ 12,4	577,4 $\pm$ 26,6
Mg (24)	8207,5 $\pm$ 264,5	5380,9 $\pm$ 230,5	7759,5 $\pm$ 25,6	7934,2 $\pm$ 3,4
Zn (64)	1238,4 $\pm$ 27,4	949,2 $\pm$ 27,7	1044,9 $\pm$ 12,7	1206,1 $\pm$ 16,5
I (127)	35,4 $\pm$ 3,0	23,1 $\pm$ 1,4	24,5 $\pm$ 0,4	31,0 $\pm$ 0,4
Mo (98)	6,1 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,0	8,3 $\pm$ 0,1
As (75)	7,5 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,3	11,1 $\pm$ 0,1
Ba (138)	29,0 $\pm$ 1,8	28,8 $\pm$ 1,0	33,2 $\pm$ 0,2	30,7 $\pm$ 0,7
Co (59)	3,1 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1
Cs (133)	14,9 $\pm$ 0,5	8,9 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,0	14,6 $\pm$ 0,2
Mn (55)	45,4 $\pm$ 1,9	39,7 $\pm$ 2,3	46,9 $\pm$ 0,0	57,6 $\pm$ 0,5
Ni (60)	7,6 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 0,5	8,6 $\pm$ 0,2	8,9 $\pm$ 0,7
Pb (208)	8,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1
Se (82)	711,3 $\pm$ 24,9	600,9 $\pm$ 16,5	527,6 $\pm$ 12,5	714,3 $\pm$ 10,4

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

Os resultados obtidos pelos dois métodos de calibração avaliados foram comparados com os resultados obtidos após a digestão da amostra em microondas e análise por ICP-MS. A concentração de Cd também foi avaliada, porém as amostras de sêmen apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção para este elemento.

4.3 Determinação de metais em sêmen por ICP-MS, após digestão das amostras em microondas

Para avaliar o efeito de interferência de componentes da matriz, as mesmas amostras de sêmen (*pool*), analisadas com introdução direta, foram digeridas em microondas e diluídas na proporção 1:50. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a análise das amostras de sêmen após digestão em microondas.

Elemento	Amostra (pool de sêmen) - Concentração $\pm$ DP*			
	1	2	3	4
Ca (44)	41931,7 $\pm$ 880,2	47772,9 $\pm$ 774,2	39938,8 $\pm$ 610,1	30880,6 $\pm$ 431,3
Cu (63)	70,6 $\pm$ 1,0	100,3 $\pm$ 0,3	66,6 $\pm$ 1,1	74,4 $\pm$ 9,2
Fe (57)	497,4 $\pm$ 3,9	568,2 $\pm$ 7,5	825,1 $\pm$ 12,7	572,5 $\pm$ 37,6
Mg (24)	9015,5 $\pm$ 188,7	9902,0 $\pm$ 46,7	8891,9 $\pm$ 68,2	8887,4 $\pm$ 111,3
Zn (64)	1536,9 $\pm$ 12,0	1318,0 $\pm$ 7,8	1321,0 $\pm$ 8,5	1196,8 $\pm$ 14,3
I (127)	88,9 $\pm$ 2,9	59,0 $\pm$ 4,1	85,5 $\pm$ 6,5	72,1 $\pm$ 3,5
Mo (98)	7,3 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,2
As (75)	17,6 $\pm$ 1,5	19,0 $\pm$ 1,4	15,2 $\pm$ 0,4	19,1 $\pm$ 1,1
Ba (138)	32,2 $\pm$ 0,8	33,4 $\pm$ 0,1	35,1 $\pm$ 0,5	25,4 $\pm$ 0,1
Co (59)	4,7 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,1
Cs (133)	17,3 $\pm$ 0,7	11,1 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,1	12,5 $\pm$ 0,3
Mn (55)	55,0 $\pm$ 1,4	53,7 $\pm$ 3,2	60,5 $\pm$ 3,0	50,7 $\pm$ 2,7
Ni (60)	18,4 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,7	23,8 $\pm$ 0,7	9,3 $\pm$ 0,9
Pb (208)	12,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1
Se (82)	2275,5 $\pm$ 84,3	2039,9 $\pm$ 81,6	1468,1 $\pm$ 8,9	1685,5 $\pm$ 176,1

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

A avaliação estatística dos dados, aplicando-se o teste ANOVA - fator único (alfa de 0,05 e nível de confiança de 95%) demonstrou que os resultados apresentaram em geral uma boa concordância entre os valores obtidos com introdução direta de amostra (calibração em meio aquoso e por ajuste de matriz) e com prévia digestão das amostras para a maioria dos elementos.

Para os analitos: Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, Mo, Ba, Cs, Mn e Pb os resultados obtidos com introdução direta e digestão foram similares. Isto indica que não é necessária a digestão da amostra para a análise dos elementos, sendo, portanto, utilizada para os estudos posteriores a injeção direta das amostras no ICP-MS. A injeção direta das amostras permite uma análise mais rápida e adequada para a rotina, além de evitar possíveis contaminações que podem ocorrer durante o processo de digestão.

Entretanto os elementos: As, Se, I, Ni e Co apresentaram resultados discordantes. Para verificar a concentração destes analitos nas amostras de sêmen

e investigar os efeitos de possíveis interferências espectrais foi utilizada a cela de reação dinâmica (DRC).

Após determinação dos elementos nas amostras de sêmen, foram determinados os limites de detecção e quantificação do método e os valores de coeficientes de correlação linear (r), apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e coeficiente de correlação linear (r) determinados por ICP-MS (modo padrão) e calibração em meio aquoso

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	r
⁴⁴ Ca	0,262	0,872	0,99989
⁶³ Cu	0,003	0,009	0,99993
⁵⁷ Fe	0,168	0,562	0,99989
²⁴ Mg	0,004	0,014	0,99998
⁶⁴ Zn	0,004	0,013	0,99993
¹²⁷ I	0,026	0,087	0,99982
⁹⁸ Mo	0,007	0,022	0,99999
⁷⁵ As	0,007	0,022	0,99999
¹³⁸ Ba	0,005	0,016	0,99999
⁵⁹ Co	0,002	0,005	0,99999
¹³³ Cs	0,002	0,007	0,99996
⁵⁵ Mn	0,003	0,009	0,99999
⁶⁰ Ni	0,067	0,223	0,99998
²⁰⁸ Pb	0,002	0,008	0,99998
⁸² Se	0,033	0,109	0,99998

* Resultados baseados na análise de 10 replicatas

4.4 Curvas de pirólise e atomização para determinação de Cu, Mn e Se por GF AAS

Para otimizar os parâmetros para determinação de cobre, manganês, e selênio por GF AAS, foram elaboradas curvas de pirólise (Figuras 5a e 5b) e atomização (Figuras 5c e 5d). As curvas demonstradas foram obtidas com as amostras de sêmen diluídas na proporção 1:10 em ácido nítrico 0,5% (v/v). Com base nestas curvas, considerando o sinal obtido pelo analito e o menor sinal de

fundo, foi definido o programa de aquecimento usado para a determinação destes elementos em sêmen, por GF AAS, descrito na Tabela 5.

Figura 5. a) curvas de pirólise para Se e Mn; b) curva de pirólise para Cu; c) curvas de atomização para Se e Mn e d) curva de atomização para Cu, todas elaboradas em sêmen diluído 1:10.

4.5 Determinação de Cu, Mn e Se por GF AAS e Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS

Para verificação da exatidão do método analítico, as amostras de sêmen foram analisadas por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) e por chama (FAAS). A tabela abaixo mostra os resultados obtidos nas análises.

Tabela 11 - Resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos com a análise das amostras de sêmen por GF AAS (Cu, Mn e Se) e FAAS (Ca, Fe, Mg e Zn).

Elemento	Amostra (pool de sêmen) - Concentração $\pm$ DP*			
	1	2	3	4
Cu	65,9 $\pm$ 1,7	94,0 $\pm$ 0,2	72,6 $\pm$ 1,8	87,5 $\pm$ 0,8
Mn	49,3 $\pm$ 5,1	45,7 $\pm$ 1,2	48,9 $\pm$ 1,0	53,0 $\pm$ 1,3
Se	707,0 $\pm$ 61,5	782,0 $\pm$ 183,6	473,7 $\pm$ 20,2	933,7 $\pm$ 70,0
Ca	39242,3 $\pm$ 361,4	41292,4 $\pm$ 466,4	38209,3 $\pm$ 739,6	36127,4 $\pm$ 707,5
Fe	571,4 $\pm$ 28,6	657,1 $\pm$ 24,7	742,9 $\pm$ 37,8	671,4 $\pm$ 24,7
Mg	8919,6 $\pm$ 77,7	9073,7 $\pm$ 145,1	8918,6 $\pm$ 242,6	9163,7 $\pm$ 118,7
Zn	1244,1 $\pm$ 49,6	1113,6 $\pm$ 49,6	1289,8 $\pm$ 26,9	1227,7 $\pm$ 53,1

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

Os limites de detecção obtidos na determinação de Cu, Mn e Se por GF AAS foram: 2,49; 1,36 e 1,56 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na determinação de Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS os LD foram: 60,3; 12,0; 5,33 e 8,67 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Não foi possível realizar a determinação de Mo, I, As, Ni, Co, Ba, Cs, e Pb pelas técnicas de GF AAS e FAAS, por estarem presentes em concentrações inferiores ao limite de detecção ou devido a problemas instrumentais.

De acordo com os resultados da tabela acima, podemos concluir que o método por ICP-MS e calibração em meio aquoso, apresentou resultados semelhantes para os elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn, quando comparado aos obtidos por espectrometria de absorção atômica (FAAS e GF AAS), aplicando-se o teste t de *Student* (alfa de 0,05 e nível de confiança de 95%).

Devido à impossibilidade de comparar os resultados obtidos com ICP-MS e AAS para os elementos As, Co, I e Ni, foi utilizada a cela de reação dinâmica (DRC) para investigar os efeitos de possíveis interferências espectrais. Apesar de o selênio ter sido determinado por GF AAS e apresentar resultados semelhantes ao ICP-MS, este analito foi também determinado utilizando DRC.

4.6 Otimização da cela de reação dinâmica para determinação de As, Co, I, Ni e Se por DRC-ICP-MS.

A alta concentração de interferentes nas matrizes biológicas ocasiona interferências poliatômicas que não são eliminadas com a diluição da amostra, calibração por ajuste de matriz, avaliação de um isótopo alternativo e digestão da amostra. Diante disto, para os elementos: ^{75}As , ^{59}Co , ^{127}I , ^{60}Ni e ^{82}Se , que apresentaram alguns resultados discordantes nas análises por introdução direta (calibração em meio aquoso e por ajuste de matriz) e após digestão da amostra, foi avaliado o uso da cela de reação dinâmica para determinação direta destes analitos em sêmen. As condições de operação do DRC foram otimizadas utilizando como matriz o sêmen bovino.

Arsênio sofre interferência de Ar e Cl^- , uma maior vazão do gás de reação foi necessária para reduzir o sinal de fundo. Co, I e Ni sofrem interferências poliatômicas que podem ter contribuído para geração de alguns resultados divergentes. Estes elementos apresentam alguns interferentes principais que podem estar presentes na matriz sêmen, tais como: Na, Ca, Cl e Ar. Porém observamos que não foi necessária uma alta vazão do gás para eliminação de interferentes na determinação de cobalto e iodo, já para análise de níquel, um aumento na vazão do gás de reação gerou menores sinais de fundo (BEC). Para determinação de Se, cujos principais interferentes são: C, Cl, S e Ar, para redução do BEC foi necessário a utilização de uma maior vazão de H_2 .

Os parâmetros RPq e vazão do gás hidrogênio foram otimizados com a finalidade de se obter uma baixa concentração equivalente do sinal de fundo (BEC). Os dados de intensidade e sinal de fundo para estes elementos em função do RPq e vazão do gás estão apresentados na Figura 6 e 7.

Figura 6. À esquerda estão apresentadas as concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H₂ e à direita estão apresentados a razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq para a determinação de ⁷⁵As, ⁵⁹Co, ¹²⁷I e ⁶⁰Ni em sêmen. Os pontos sem preenchimento correspondem ao valor otimizado.

Figura 7. À esquerda estão apresentadas as concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H_2 e à direita estão apresentados a razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq para a determinação de ^{82}Se em sêmen. Os pontos sem preenchimento correspondem ao valor otimizado.

4.6.1 Determinação de As, Co, I, Ni e Se em amostras de sêmen utilizando DRC-ICP-MS

As amostras de sêmen avaliadas anteriormente por ICP-MS foram analisadas após a otimização dos parâmetros: vazão do gás de reação e RPq utilizando o DRC. As calibrações foram realizadas em meio aquoso, os resultados obtidos na análise das amostras de sêmen, com e sem aplicação de DRC estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise das amostras de sêmen por DRC-ICP-MS e q-ICP-MS, diluição 1:50, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$

Elemento	Amostra (pool de sêmen) - Concentração $\pm$ DP*			
	1	2	3	4
^{75}As (a)	$7,4 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,4$
^{75}As (b)	$6,3 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,4$
^{59}Co (a)	$3,0 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,0$	$3,3 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,1$
^{59}Co (b)	$3,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,1$
^{127}I (a)	$73,1 \pm 0,5$	$50,1 \pm 0,4$	$48,9 \pm 0,6$	$51,5 \pm 0,4$
^{127}I (b)	$78,5 \pm 2,1$	$51,9 \pm 0,7$	$56,2 \pm 1,3$	$61,4 \pm 1,9$
^{60}Ni (a)	$12,1 \pm 0,2$	$19,9 \pm 0,9$	$15,6 \pm 0,4$	$13,2 \pm 0,5$
^{60}Ni (b)	$28,0 \pm 2,8$	$33,3 \pm 2,6$	$30,0 \pm 3,8$	$29,2 \pm 2,2$
^{82}Se (a)	$639,0 \pm 17,4$	$689,0 \pm 14,2$	$619,7 \pm 1,1$	$612,7 \pm 4,6$
^{82}Se (b)	$636,8 \pm 23,4$	$556,7 \pm 3,4$	$521,4 \pm 12,6$	$562,4 \pm 11,1$

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão (a) modo DRC-ICP-MS e (b) modo q-ICP-MS

O coeficiente angular das curvas analíticas obtidas com DRC sempre se apresentou menor, isto demonstra que as interferências que promovem um aumento no número de contagens são eliminadas. Houve também uma melhora na linearidade das curvas de ^{127}I e ^{60}Ni . A Tabela 13 apresenta os valores do coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção e de quantificação para ^{75}As , ^{59}Co , ^{127}I , ^{60}Ni e ^{82}Se , nas análises com e sem DRC.

Tabela 13 - Avaliação dos valores de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) no modo q-ICP-MS e no modo DRC-ICP-MS, utilizando calibração em meio aquoso.

Elemento	Coeficiente angular	r	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)*
^{75}As (a)	857,0	0,99947	0,005	0,016
^{75}As (b)	2231,5	0,99999	0,007	0,022
^{59}Co (a)	14348,4	0,99995	0,001	0,005
^{59}Co (b)	15902,6	0,99999	0,002	0,005
^{127}I (a)	4383,0	0,99993	0,086	0,285
^{127}I (b)	4965,4	0,99982	0,026	0,087
^{60}Ni (a)	2384,0	0,99999	0,020	0,066
^{60}Ni (b)	3602,2	0,99998	0,067	0,223
^{82}Se (a)	160,3	0,99977	0,050	0,164
^{82}Se (b)	291,0	0,99998	0,033	0,109

* Resultados baseados na análise de 10 replicatas (a) modo DRC-ICP-MS e (b) modo q-ICP-MS

Os resultados obtidos na análise ^{75}As , ^{59}Co , ^{127}I e ^{82}Se nas amostras de sêmen utilizando DRC-ICP-MS foram similares aos obtidos com a introdução direta da amostra, calibração em meio aquoso e análise por q-ICP-MS, a um nível de confiança de 95% e alfa de 0,05 aplicando-se o teste t de *Student*. Para a determinação de ^{60}Ni foi comprovada a necessidade de utilização do DRC para eliminação de interferências poliatômicas.

Os coeficientes de variação (CV) obtidos na análise das amostras de sêmen intra dia e inter dia foram inferiores a 10% demonstrando precisão adequada do método. Na avaliação da exatidão, através de ensaios de recuperação os elementos avaliados apresentaram resultados entre 85 e 115%.

4.7 Avaliação da utilização de padrão interno

Os padrões internos em ICP-MS podem auxiliar na correção de flutuações na intensidade de contagens dos analitos durante a análise. Neste estudo foram avaliados três padrões internos: ródio (^{103}Rh), irídio (^{193}Ir) e ítrio (^{89}Y), adicionados às amostras e padrões na concentração final de $10\mu\text{g L}^{-1}$.

A escolha do padrão interno a ser utilizado para cada elemento foi baseada na observação das menores incertezas com determinação precisa e exata do analito. Com bases nos resultados demonstrados acima foram definidos os padrões internos de melhor eficiência para cada elemento. Para os isótopos ^{44}Ca , ^{24}Mg , ^{98}Mo , ^{75}As , ^{59}Co , ^{133}Cs , ^{55}Mn , ^{60}Ni e ^{82}Se determinados em sêmen, ^{103}Rh foi o mais eficiente na concentração de $10\mu\text{g L}^{-1}$; para ^{63}Cu , ^{57}Fe , ^{64}Zn , ^{127}I e ^{208}Pb foi escolhido o ^{193}Ir na concentração de $10\mu\text{g L}^{-1}$ e para ^{138}Ba o padrão interno ^{89}Y foi o mais eficiente na concentração de $10\mu\text{g L}^{-1}$.

4.8 Análise de sêmen de bovinos utilizados em programas de inseminação artificial

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, I, Mo, As, Se, Ni, Co, Ba, Cs, Mn e Pb em amostras de sêmen de animais de diferentes classes (corte zebu e europeu e leite zebu e europeu) e raças utilizadas em programas de reprodução e inseminação artificial. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Aplicando-se o teste ANOVA - fator único, podemos observar que existe correlação entre as concentrações de Ca, Cu, Fe, Zn, I, Mo, As, Se, Ni, Co, Ba, Mn e Pb nas amostras de sêmen de animais de diferentes classes, p-valor > 0,05. As concentrações de Mg e Cs não apresentaram correlação entre as classes. Em relação ao magnésio as concentrações médias foram menores nos bovinos de corte zebu e maiores nos de leite europeu e o cézio apresentou concentração média três vezes maior nos bovinos de leite europeu que nas demais classes.

Tabela 14 - Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$

Elemento (concentração $\pm$ DP)*						
Raça	Ca	Cu	Fe	Mg	Zn	
Corte Zebu						
Nelore	38195,8 $\pm$ 139,1	75,2 $\pm$ 1,9	421,2 $\pm$ 15,4	9064,6 $\pm$ 71,6	1145,8 $\pm$ 29,4	
Brahman	36294,3 $\pm$ 78,3	32,7 $\pm$ 0,1	409,0 $\pm$ 4,7	8906,7 $\pm$ 27,7	889,3 $\pm$ 3,9	
Polled Hereford	31863,4 $\pm$ 159,7	45,4 $\pm$ 0,3	370,8 $\pm$ 9,5	8883,9 $\pm$ 29,0	1373,7 $\pm$ 10,4	
Nelore	91854,2 $\pm$ 1128,1	153,4 $\pm$ 0,9	625,8 $\pm$ 5,5	11582,8 $\pm$ 39,0	864,6 $\pm$ 7,3	
Nelore	43351,6 $\pm$ 107,5	82,3 $\pm$ 0,9	941,0 $\pm$ 17,3	11998,0 $\pm$ 26,0	1204,3 $\pm$ 6,8	
Nelore	26142,9 $\pm$ 526,2	41,0 $\pm$ 0,3	395,3 $\pm$ 9,4	7678,9 $\pm$ 65,2	683,8 $\pm$ 5,8	
Nelore Mocho	25057,8 $\pm$ 135,5	26,0 $\pm$ 0,3	617,0 $\pm$ 19,2	9148,0 $\pm$ 58,5	1388,6 $\pm$ 17,3	
Nelore	42171,3 $\pm$ 345,5	44,7 $\pm$ 0,7	721,9 $\pm$ 45,2	12798,7 $\pm$ 116,5	1777,0 $\pm$ 22,3	
Brahman	46317,8 $\pm$ 633,8	20,3 $\pm$ 0,3	400,6 $\pm$ 10,8	7462,2 $\pm$ 78,7	853,8 $\pm$ 15,7	
Nelore Mocho	42499,9 $\pm$ 391,8	76,5 $\pm$ 0,2	456,2 $\pm$ 6,6	11708,2 $\pm$ 61,7	843,7 $\pm$ 4,2	
Nelore Mocho	34644,6 $\pm$ 626,7	79,9 $\pm$ 0,4	320,1 $\pm$ 8,5	5892,4 $\pm$ 146,2	642,8 $\pm$ 5,9	
Nelore	10845,7 $\pm$ 160,4	18,8 $\pm$ 0,3	236,6 $\pm$ 6,8	6190,6 $\pm$ 69,3	282,0 $\pm$ 1,1	
Brahman	30841,7 $\pm$ 143,0	79,3 $\pm$ 1,2	607,0 $\pm$ 11,5	8352,1 $\pm$ 73,3	990,1 $\pm$ 18,3	
Nelore	46553,6 $\pm$ 422,3	97,4 $\pm$ 1,2	570,3 $\pm$ 7,6	9658,7 $\pm$ 180,4	499,3 $\pm$ 6,8	
Nelore	62522,9 $\pm$ 366,8	92,5 $\pm$ 0,5	545,5 $\pm$ 5,0	13737,9 $\pm$ 139,4	1253,3 $\pm$ 19,0	
Nelore Mocho	29780,7 $\pm$ 56,5	44,8 $\pm$ 0,5	481,8 $\pm$ 12,5	8422,4 $\pm$ 103,1	2500,9 $\pm$ 28,8	
Nelore	25105,8 $\pm$ 287,7	27,7 $\pm$ 0,4	417,1 $\pm$ 54,1	6139,3 $\pm$ 38,1	445,1 $\pm$ 6,6	
Brahman	46099,6 $\pm$ 398,4	65,3 $\pm$ 1,4	321,3 $\pm$ 14,8	11360,0 $\pm$ 153,2	902,3 $\pm$ 15,0	
Corte Europeu						
Bradfort	43118,1 $\pm$ 556,8	46,8 $\pm$ 0,6	552,4 $\pm$ 22,1	13843,2 $\pm$ 49,3	1385,5 $\pm$ 13,6	
Red Angus	46392,5 $\pm$ 222,4	53,9 $\pm$ 0,5	402,6 $\pm$ 14,9	10270,2 $\pm$ 65,6	543,0 $\pm$ 6,2	
Angus	76224,9 $\pm$ 755,5	56,3 $\pm$ 1,1	515,9 $\pm$ 17,9	7855,5 $\pm$ 50,3	864,1 $\pm$ 19,4	

Raça	Elemento (concentração $\pm$ DP)*				
	Ca	Cu	Fe	Mg	Zn
Red Brangus	48552,0 $\pm$ 226,2	54,8 $\pm$ 1,2	343,3 $\pm$ 4,9	16933,7 $\pm$ 74,3	628,7 $\pm$ 12,5
Simental	47469,5 $\pm$ 151,0	52,4 $\pm$ 1,3	436,8 $\pm$ 12,8	11359,3 $\pm$ 36,9	940,9 $\pm$ 16,9
Angus	34802,4 $\pm$ 266,3	40,0 $\pm$ 0,5	501,1 $\pm$ 7,2	11229,2 $\pm$ 92,4	1053,0 $\pm$ 10,9
Charolês	40167,3 $\pm$ 399,8	69,6 $\pm$ 1,1	364,2 $\pm$ 8,4	15550,0 $\pm$ 147,0	399,3 $\pm$ 3,8
Bradford 1/4	60261,6 $\pm$ 263,4	80,7 $\pm$ 1,4	660,2 $\pm$ 19,9	9876,3 $\pm$ 115,5	1347,7 $\pm$ 16,3
Bradfort	50321,0 $\pm$ 563,9	65,4 $\pm$ 0,2	555,4 $\pm$ 18,3	9390,0 $\pm$ 19,3	797,4 $\pm$ 1,0
Leite Zebu					
Gir Leiteiro Mocho	52283,6 $\pm$ 202,3	88,5 $\pm$ 1,2	453,2 $\pm$ 5,1	12446,2 $\pm$ 141,4	894,5 $\pm$ 20,5
Gir Leiteiro	41592,0 $\pm$ 298,9	118,5 $\pm$ 1,0	352,2 $\pm$ 12,1	17707,1 $\pm$ 243,7	501,1 $\pm$ 3,2
Guzerá leiteiro	43817,2 $\pm$ 419,1	51,1 $\pm$ 0,7	608,6 $\pm$ 5,0	11626,7 $\pm$ 74,9	1360,9 $\pm$ 7,8
Gir leiteiro	27954,6 $\pm$ 202,9	42,8 $\pm$ 0,6	444,6 $\pm$ 37,2	11413,0 $\pm$ 74,0	1049,7 $\pm$ 15,3
Guzerá leiteiro	43046,3 $\pm$ 1829,8	48,4 $\pm$ 1,6	397,9 $\pm$ 14,2	9660,6 $\pm$ 75,5	520,7 $\pm$ 19,2
Guzerá Leiteiro	22677,3 $\pm$ 16,7	45,3 $\pm$ 0,4	411,0 $\pm$ 4,6	11392,4 $\pm$ 56,4	1415,0 $\pm$ 14,7
Gir Leiteiro	52005,4 $\pm$ 265,5	24,1 $\pm$ 0,4	547,7 $\pm$ 15,7	8556,5 $\pm$ 64,6	753,6 $\pm$ 13,9
Girolando 3/8	40115,2 $\pm$ 414,6	74,1 $\pm$ 0,5	339,1 $\pm$ 3,7	11759,0 $\pm$ 148,8	688,1 $\pm$ 1,7
Gir Leiteiro	30756,2 $\pm$ 218,9	47,0 $\pm$ 0,3	617,7 $\pm$ 35,8	12039,5 $\pm$ 142,3	2324,0 $\pm$ 23,0
Gir leiteiro	32031,5 $\pm$ 71,9	53,1 $\pm$ 0,2	556,7 $\pm$ 6,6	14639,8 $\pm$ 94,2	989,5 $\pm$ 1,8
Girolando 3/8	36691,5 $\pm$ 408,5	28,5 $\pm$ 0,2	450,8 $\pm$ 32,3	10688,4 $\pm$ 33,3	1008,8 $\pm$ 8,6
Leite Europeu					
Jersey	29698,7 $\pm$ 202,7	45,2 $\pm$ 0,7	512,2 $\pm$ 13,0	8851,8 $\pm$ 95,3	1014,6 $\pm$ 17,2
Jersey	34267,3 $\pm$ 226,8	50,5 $\pm$ 0,8	546,4 $\pm$ 14,2	14488,9 $\pm$ 228,8	1207,7 $\pm$ 11,2
Galeria	64413,9 $\pm$ 109,6	72,5 $\pm$ 1,5	439,6 $\pm$ 12,4	14090,6 $\pm$ 134,1	680,8 $\pm$ 7,1

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 15 - Determinação de I, Mo, As, Se e Co nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$

Raça	Elemento (concentração $\pm$ DP)*				
	I	Mo	As	Se	Co
Corte Zebu					
Nelore	61,6 $\pm$ 1,2	6,9 $\pm$ 0,3	9,7 $\pm$ 0,5	510,9 $\pm$ 22,1	1,9 $\pm$ 0,1
Brahman	44,9 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,4	627,7 $\pm$ 5,1	3,7 $\pm$ 0,1
Polled Hereford	50,5 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,6	769,0 $\pm$ 21,9	2,9 $\pm$ 0,1
Nelore	24,3 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,1	705,3 $\pm$ 13,2	3,3 $\pm$ 0,1
Nelore	28,2 $\pm$ 1,1	7,2 $\pm$ 0,0	8,3 $\pm$ 0,1	768,4 $\pm$ 14,3	1,9 $\pm$ 0,1
Nelore	37,4 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 0,4	587,6 $\pm$ 3,7	1,0 $\pm$ 0,0
Nelore Mocho	86,1 $\pm$ 2,4	4,4 $\pm$ 0,1	10,0 $\pm$ 0,5	958,3 $\pm$ 19,5	1,9 $\pm$ 0,1
Nelore	58,7 $\pm$ 1,2	4,5 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,5	994,6 $\pm$ 16,5	2,0 $\pm$ 0,1
Brahman	49,3 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,1	12,2 $\pm$ 0,6	640,2 $\pm$ 7,6	2,1 $\pm$ 0,2
Nelore Mocho	80,7 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,2	11,0 $\pm$ 0,4	953,5 $\pm$ 13,8	2,5 $\pm$ 0,1
Nelore Mocho	67,8 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,2	11,4 $\pm$ 1,0	498,8 $\pm$ 12,5	1,3 $\pm$ 0,2
Nelore	99,5 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 1,2	147,8 $\pm$ 11,1	0,7 $\pm$ 0,0
Brahman	67,5 $\pm$ 1,4	5,4 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	465,9 $\pm$ 4,3	1,7 $\pm$ 0,1
Nelore	52,0 $\pm$ 2,9	6,8 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,2	715,2 $\pm$ 8,1	1,6 $\pm$ 0,1
Nelore	80,7 $\pm$ 1,2	7,5 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,7	627,2 $\pm$ 8,0	3,0 $\pm$ 0,1
Nelore Mocho	78,6 $\pm$ 2,1	4,3 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 1,0	621,6 $\pm$ 10,8	1,9 $\pm$ 0,1
Nelore	75,5 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,9	226,8 $\pm$ 10,1	1,7 $\pm$ 0,1
Brahman	49,0 $\pm$ 1,7	3,6 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,5	842,0 $\pm$ 9,4	2,5 $\pm$ 0,1
Corte Europeu					
Bradfort	70,7 $\pm$ 1,2	6,2 $\pm$ 0,2	10,8 $\pm$ 0,6	630,0 $\pm$ 7,9	3,7 $\pm$ 0,1
Red Angus	118,6 $\pm$ 2,1	4,5 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$ 0,2	640,4 $\pm$ 13,9	3,1 $\pm$ 0,0
Angus	83,0 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,2	826,0 $\pm$ 8,6	2,8 $\pm$ 0,1

Raça	Elemento (concentração $\pm$ DP)*				
	I	Mo	As	Se	Co
Red Brangus	70,2 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,3	580,4 $\pm$ 10,6	1,9 $\pm$ 0,1
Simental	95,8 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,2	581,9 $\pm$ 8,9	4,2 $\pm$ 0,2
Angus	47,3 $\pm$ 1,8	3,8 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,7	542,3 $\pm$ 17,7	2,5 $\pm$ 0,1
Charolês	41,4 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,4	559,7 $\pm$ 4,9	1,5 $\pm$ 0,1
Bradford 1/4	32,6 $\pm$ 1,1	4,0 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,3	722,5 $\pm$ 14,7	1,8 $\pm$ 0,0
Bradfort	72,8 $\pm$ 1,3	3,9 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,6	827,4 $\pm$ 10,5	3,0 $\pm$ 0,0
Leite Zebu					
Gir Leiteiro Mocho	77,6 $\pm$ 2,1	8,2 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,3	491,9 $\pm$ 14,2	2,1 $\pm$ 0,1
Gir Leiteiro	56,9 $\pm$ 1,2	6,4 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	1059,7 $\pm$ 4,2	1,2 $\pm$ 0,0
Guzerá leiteiro	34,6 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,1	15,6 $\pm$ 0,5	839,0 $\pm$ 20,5	2,2 $\pm$ 0,0
Gir leiteiro	54,0 $\pm$ 1,3	3,5 $\pm$ 0,1	10,4 $\pm$ 0,2	900,9 $\pm$ 10,6	3,2 $\pm$ 0,2
Guzerá leiteiro	67,0 $\pm$ 2,5	4,8 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 0,4	531,7 $\pm$ 9,4	2,0 $\pm$ 0,1
Guzerá Leiteiro	67,2 $\pm$ 1,3	4,1 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 8,0	741,5 $\pm$ 15,4	3,8 $\pm$ 0,5
Gir Leiteiro	85,1 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 0,1	10,3 $\pm$ 0,3	452,9 $\pm$ 8,3	2,2 $\pm$ 0,2
Girolando 3/8	46,1 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,4	1131,9 $\pm$ 8,4	2,3 $\pm$ 0,1
Gir Leiteiro	81,5 $\pm$ 2,2	4,0 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,4	675,6 $\pm$ 15,9	1,8 $\pm$ 0,0
Gir leiteiro	62,1 $\pm$ 1,9	5,3 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,4	811,8 $\pm$ 8,8	1,7 $\pm$ 0,1
Girolando 3/8	65,6 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,5	725,2 $\pm$ 10,1	1,8 $\pm$ 0,1
Leite Europeu					
Jersey	73,6 $\pm$ 1,9	4,6 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,4	722,5 $\pm$ 6,8	4,1 $\pm$ 0,1
Jersey	112,8 $\pm$ 1,8	5,0 $\pm$ 0,2	8,7 $\pm$ 0,5	660,0 $\pm$ 17,9	2,9 $\pm$ 0,1
Galeria	42,6 $\pm$ 2,1	4,9 $\pm$ 0,1	8,7 $\pm$ 0,8	785,6 $\pm$ 17,0	2,5 $\pm$ 0,0

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 16 - Determinação de Cs, Mn, Pb, Ba e Ni nas amostras de sêmen por ICP-MS, resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$

Raça	Elemento (concentração $\pm$ DP)*				
	Cs	Mn	Pb	Ba	Ni
Corte Zebu					
Nelore	14,9 $\pm$ 0,1	43,6 $\pm$ 0,2	32,6 $\pm$ 0,9	35,8 $\pm$ 0,5	16,1 $\pm$ 0,6
Brahman	15,0 $\pm$ 0,2	36,6 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,0	55,7 $\pm$ 5,6	13,3 $\pm$ 0,3
Polled Hereford	36,6 $\pm$ 0,4	39,7 $\pm$ 0,2	16,9 $\pm$ 0,0	52,6 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,1
Nelore	3,6 $\pm$ 0,1	31,5 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,2	42,7 $\pm$ 0,3	33,9 $\pm$ 0,3
Nelore	5,6 $\pm$ 0,0	56,1 $\pm$ 0,3	10,9 $\pm$ 0,1	46,3 $\pm$ 1,7	16,2 $\pm$ 0,1
Nelore	4,6 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,0	21,4 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,2
Nelore Mocho	19,9 $\pm$ 0,1	52,9 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,3	50,1 $\pm$ 1,2	8,1 $\pm$ 0,2
Nelore	13,6 $\pm$ 0,2	62,4 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,1	66,0 $\pm$ 1,3	16,3 $\pm$ 0,4
Brahman	21,3 $\pm$ 0,5	24,6 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,1	64,9 $\pm$ 1,3	16,1 $\pm$ 0,6
Nelore Mocho	28,4 $\pm$ 0,2	33,1 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0	90,4 $\pm$ 0,7	15,6 $\pm$ 0,2
Nelore Mocho	2,8 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	24,6 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 0,6
Nelore	4,9 $\pm$ 0,1	14,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1	15,2 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,1
Brahman	8,9 $\pm$ 0,0	32,7 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	52,3 $\pm$ 0,8	19,7 $\pm$ 0,6
Nelore	2,8 $\pm$ 0,0	23,4 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	21,8 $\pm$ 0,3	19,6 $\pm$ 0,9
Nelore	4,1 $\pm$ 0,0	27,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	37,1 $\pm$ 0,6	23,4 $\pm$ 0,0
Nelore Mocho	10,7 $\pm$ 0,2	33,3 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	47,8 $\pm$ 0,3	11,2 $\pm$ 0,4
Nelore	3,3 $\pm$ 0,0	27,8 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	47,6 $\pm$ 1,9	8,2 $\pm$ 0,3
Brahman	2,4 $\pm$ 0,1	13,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	44,2 $\pm$ 0,8	20,5 $\pm$ 0,6
Corte Europeu					
Bradfort	28,2 $\pm$ 0,2	60,0 $\pm$ 2,3	1,2 $\pm$ 0,1	21,9 $\pm$ 0,4	14,3 $\pm$ 0,2
Red Angus	13,1 $\pm$ 0,1	20,6 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,1	36,1 $\pm$ 0,4	15,6 $\pm$ 0,5
Angus	26,9 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2	65,2 $\pm$ 0,6	30,4 $\pm$ 0,7

Elemento (concentração $\pm$ DP)*					
Raça	Cs	Mn	Pb	Ba	Ni
Red Brangus	5,9 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	26,3 $\pm$ 0,3	17,5 $\pm$ 0,6
Simental	21,6 $\pm$ 0,1	20,6 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	34,5 $\pm$ 0,3	17,7 $\pm$ 0,2
Angus	28,4 $\pm$ 0,4	30,7 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 0,3	13,6 $\pm$ 0,4
Charolês	16,1 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	38,6 $\pm$ 0,5	21,3 $\pm$ 0,6
Bradford 1/4	6,1 $\pm$ 0,1	28,3 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,1	58,4 $\pm$ 0,4	43,9 $\pm$ 1,2
Bradfort	36,7 $\pm$ 0,1	28,9 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,2	79,1 $\pm$ 1,1	20,4 $\pm$ 0,6
Leite Zebu					
Gir Leiteiro Mocho	13,1 $\pm$ 0,2	25,6 $\pm$ 1,4	1,1 $\pm$ 0,2	36,1 $\pm$ 0,2	18,1 $\pm$ 1,3
Gir Leiteiro	16,6 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	43,1 $\pm$ 0,8	14,5 $\pm$ 0,4
Guzerá leiteiro	11,8 $\pm$ 0,2	59,1 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,1	67,1 $\pm$ 0,5	13,9 $\pm$ 0,1
Gir leiteiro	14,5 $\pm$ 0,1	33,2 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	19,1 $\pm$ 0,5	7,5 $\pm$ 0,4
Guzerá leiteiro	5,0 $\pm$ 0,1	16,9 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,1	21,5 $\pm$ 0,2	75,3 $\pm$ 0,9
Guzerá Leiteiro	6,7 $\pm$ 0,1	28,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	23,0 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,4
Gir Leiteiro	6,2 $\pm$ 0,0	35,0 $\pm$ 1,9	2,1 $\pm$ 0,1	182,9 $\pm$ 1,9	22,8 $\pm$ 0,7
Girolando 3/8	6,1 $\pm$ 0,1	12,8 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,5	13,3 $\pm$ 0,6
Gir Leiteiro	34,6 $\pm$ 0,1	43,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1	43,8 $\pm$ 0,3	13,0 $\pm$ 0,9
Gir leiteiro	8,8 $\pm$ 0,2	40,8 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 0,1	52,8 $\pm$ 0,1	27,8 $\pm$ 0,7
Girolando 3/8	19,3 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	27,7 $\pm$ 0,4	13,5 $\pm$ 0,5
Leite Europeu					
Jersey	32,2 $\pm$ 0,1	32,0 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,1	38,2 $\pm$ 0,1	11,3 $\pm$ 0,9
Jersey	41,9 $\pm$ 0,1	37,1 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,1	11,6 $\pm$ 0,5
Galeria	34,1 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1	40,1 $\pm$ 0,7	22,4 $\pm$ 0,3

* Resultados expressos em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) - média da leitura de três réplicas da amostra $\pm$ Desvio Padrão

4.9 Concentração de metais em sêmen bovino

A Tabela 17 apresenta uma revisão de trabalhos que realizaram determinação de metais em sêmen bovino por diversas técnicas analíticas. Na mesma tabela estão apresentados os valores médios e as faixas de concentração observadas para cada elemento avaliado neste estudo e também os valores obtidos nas análises de sêmen bovino em outros estudos publicados.

Tabela 17 - Resultados da determinação de metais em amostras de sêmen bovino no presente estudo e em diversos estudos encontrados na literatura.

Estudo	Técnica analítica	Analitos
Este estudo (2010)	ICP-MS	Ca: 41678,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (10845,7 a 91854,2) Cu: 58,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (18,8 a 153,4) Fe: 484,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (236,6 a 941,0) Mg: 10845,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5892,4 a 17707,1) Zn: 997,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (282,0 a 2500,9) I: 64,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (24,3 a 118,6) Mo: 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1,8 a 8,2) As: 9,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5,1 a 17,4) Se: 685,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (147,8 a 1131,9) Co: 2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,7 a 4,2) Cs: 15,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2,4 a 41,9) Mn: 30,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (9,5 a 62,4) Pb: 2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,0 a 32,6); Ba: 44,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (15,0 a 182,9) Ni: 18,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2,8 a 75,3)
Graves, C. N.; Eiler, H. (1979)	Absorção atômica (AAS)	Ca: 43,5 $\pm$ 10,3 mg/100mL Mg: 11,9 $\pm$ 0,84 mg/100mL
Massanyi, P. et al. (2004)	Absorção atômica (GF AAS E FAAS)	Cu: 1,64 $\pm$ 0,21 mg/Kg Zn: 83,15 $\pm$ 61,61 mg/Kg Fe: 38,04 $\pm$ 22,07 mg/Kg Pb: 0,06 $\pm$ 0,04 mg/Kg Ni: 0,12 $\pm$ 0,07 mg/Kg
Zemanova, J. et al. (2007)	Absorção atômica (GF AAS)	Ni: 0,12 $\pm$ 0,07 mg/Kg
Cragle, R. G.; Salisbury, G. W. (1958)	Fotômetro de chama	Mg: 9,8 $\pm$ 1,9 mg/100mL Fe: 0,61 $\pm$ 0,14 mg/100mL Ca: 22,5 $\pm$ 6,6 mg/100mL Cu: 0,60 $\pm$ 0,21 mg/100mL
Heimann, E. D. et al. (1984)	Ativação neutrônica (INAA)	Se: 0,461 $\pm$ 0,223 $\mu\text{g/mL}$
Kirton, K. T.; Hafs, H. D.; Hunter, A. G. (1964)	Colorimetria	Zn: 940 $\pm$ 125 $\mu\text{g/100mL}$
Pratt, W. D. et al. (1980)	Método fluorimétrico	Se: 0,073 $\pm$ 0,12 $\mu\text{g/mL}$

Alguns elementos avaliados neste estudo apresentaram resultados semelhantes em relação a outros trabalhos publicados, tais como níquel, chumbo e selênio. Porém alguns metais apresentaram resultados divergentes em relação aos estudos, como por exemplo, ferro, cálcio e cobre.

É importante destacar que a maioria dos trabalhos citados foram publicados a mais de 10 anos, em condições de operação muito diferentes das atuais, além de terem sido obtidos em regiões geográficas diferentes o que explicaria parcialmente a divergência com nossos resultados.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na determinação de ^{44}Ca , ^{63}Cu , ^{57}Fe , ^{24}Mg , ^{64}Zn , ^{127}I , ^{98}Mo , ^{75}As , ^{82}Se , ^{59}Co , ^{138}Ba , ^{133}Cs , ^{55}Mn e ^{208}Pb em sêmen bovino, por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), com introdução direta da amostra e calibração em meio aquoso, demonstraram a possibilidade da utilização desta técnica em rotina. Para determinação de ^{60}Ni , a utilização da cela de reação dinâmica (DRC) com o gás de reação H_2 foi fundamental, devido a interferências espectrais ou causadas pela matriz. O método foi adequadamente validado e apresenta inúmeras vantagens quando comparado a métodos previamente publicados para mesma finalidade, tais como ser multielementar, simples e rápido, com introdução direta da amostra, sem necessidade prévia de digestão das amostras.

A aplicação do método para determinação de 15 elementos essenciais e tóxicos em 41 amostras de sêmen bovino permitiu observar que existe correlação entre a concentração da maioria dos elementos avaliados entre os animais de diferentes raças.

6 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, H. A. et al. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, Paris, v. 38, p. 45-49, 2000.

ACEVEDO, J. J. et al. K_{ATP} channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. **Developmental Biology**, Kansas City, v. 289, p. 395-405, 2006.

AGUIAR, G. V.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros *Angus*. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006.

ANDRIEU, S. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? **The Veterinary Journal**, United Kingdom, v. 176, p. 77-83, 2008.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. 02 de julho de 2003. Brasília, DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 09 jan. 2009.

AYDEMIR, B. et al. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. **Biological Trace Element Research**, San Diego, v. 112, p. 193-203, 2006.

BARANOV, V. I.; TANNER, S. D. A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry Part I**, Cambridge, v. 14, p. 1133-1142, 1999.

BARBER, S. J.; PARKER, H. M.; MCDANIEL, C. D. Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. **Trace Minerals and Semen Quality**. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station. Mississippi, p. 100-105, 2005.

BARBOSA, F. A.; SOUZA, G. M. **Efeito dos microminerais na reprodução de bovinos**. 2001. Portal Agronomia. Belo Horizonte, MG. Disponível em: <www.agronomia.com.br/conteudo/artigos>. Acesso em: 20 fev. 2008.

BARTH A. D.; BRITO L. F. C.; KASTELIC J. P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, Alberta, v. 70, p. 485-494, 2008.

BENOFF, S. et al. Seminal lead concentrations negatively affect outcomes of artificial insemination. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 80, n. 3, p. 517-525, 2003.

BLACHE, D.; MALONEY, S. K.; REVELL, D. K. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. **Animal Feed Science and Technology**, California, v. 147, p. 140-157, 2008.

BLAS BRAVO, I. et al. Optimization of the trace element determination by ICP-MS in human blood serum. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 21, p.14-17, 2007.

BLOTTNER, S. et al. Influence of environmental cadmium on testicular proliferation in roe deer. **Reproductive Toxicology**, Louisville, v. 13, p. 261-267, 1999.

BOLANN, B. J. et al. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 67, p. 353-366, 2007.

BONDE, J. P. et al. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. **Occupational and Environmental Medicine**, Mumbai, v. 59, p. 234-242, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA. **Agronegócio brasileiro: Uma oportunidade de investimentos**. Brasília, DF. 2009. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 27 set. 2009.

BRIGGILER, C. I. M. et al. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, n. 9, p. 2013-2022, 2005.

CASTELLANOS, P. et al. Changes in fatty acid profiles in testis and spermatozoa of red deer exposed to metal pollution. **Reproductive Toxicology**, Louisville, 2010. In press.

CASTELLINI, C. et al. In vitro toxic effects of metal compounds on kinetic traits and ultrastructure of rabbit spermatozoa. **Reproductive Toxicology**, Louisville, v. 27, p. 46-54, 2009.

CHIA, S. E. et al. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 21, n. 1, p. 53-57, 2000.

COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T.; CHAICHI, M. J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. **Nutrition Research**, Indianapolis, v. 29, p. 82-88, 2009.

CRAGLE, R. G.; SALISBURY, G. W. **Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluids and semen**. New Mexico: State Department of Agriculture, p. 1273-1277, 1958.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STOBBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1993.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. **Environment International**, Cumbria, v. 35, p. 438-449, 2009.

EVANS, E. H.; GIGLIO, J. J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 8, p. 1-18, 1993.

FORGÁCS, Z. et al. Specific amino acids moderate the effects of Ni²⁺ on the testosterone production of mouse Leydig cells in vitro. **Journal of Toxicology Environmental Health Part A**, Ottawa, v. 62, p. 349-358, 2001.

GAUR, M. et al. Inductively coupled plasma emission spectroscopic and flame photometric analysis of goat epididymal fluid. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 2, p. 288-292, 2000.

GONZÁLES, F. H. D. Indicadores Sangüíneos do metabolismo mineral em ruminantes. In: GONZÁLES, F. H. D. et al. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, p. 31-51.

GOULLÉ, J. P. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values. **Forensic Science International**, Turku, v. 153, p. 39-44, 2005.

GRAVES, C. N.; EILER, H. Cortisol content of semen and the effect of exogenous cortisol on the concentration of cortisol and minerals (Ca, Mg, K and Na) in semen and blood plasma of bulls. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 21, p. 1225-1229, 1979.

GREGOIRE, D. C. The effect of easily ionizable concomitant elements on non-spectroscopic interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Gainsville, v. 42B, n. 7, p. 395-907, 1987.

GUO, C. H. et al. Aluminum accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 27, p. 176-181, 2009.

HAFEZ, E. S. E.; GARNER, D. L. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6. ed., São Paulo: Ed. Manole, 1995, p. 167-190.

HEFNAWY, A. E. G.; PÉREZ, J. L. T. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. **Small Ruminant Research**, Paris, 2010. In press.

HEIMANN, E. D. et al. Relationships among spermatozoal abnormalities and the selenium concentration of blood plasma, semen, and reproductive tissues in young bulls. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 7, p. 315-321, 1984.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. 2009. Brasília, DF. Disponível em: < www.ibge.gov.br >. Acesso em: 27 set. 2009.

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Q2B Validation of analytical procedures: methodology**, 1996. Rockville.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, Revisão 2, 2007. Brasília, DF.

JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, New York: Blackie & Son Ltd., 1992, p. 380.

KANTOLA, M.; SAARANEN, M.; VANHA-PERTTULA, T. Selenium and glutathione peroxidase in seminal plasma of men and bulls. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 83, p. 785-794, 1988.

KENDALL, N. R. et al. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 62, p. 277-283, 2000.

KIRTON, K. T.; HAFS, H. D.; HUNTER, A. G. Levels of some normal constituents of bull semen during repetitive ejaculation. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 8, p. 157-164, 1964.

KOPPENAAL, D. W.; EIDEN, G. C.; BARINAGA, C. J. Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status and applications. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 19, p. 561-570, 2004.

KUMAR, N. et al. Effect of different levels and source of zinc supplementation on quantitative and qualitative sêmen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* x *Bos taurus*) bulls. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 46, p. 663-675, 2006.

LEONEL, F. P. et al. Exigências nutricionais em macronutrientes minerais (Ca, P, Mg, Na e K) para novilhos de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 584-590, mar./abr. 2006.

LESTAEVEL, P. et al. Cesium 137: properties and biological effects resulting of an internal contamination. **Médecine Nucléaire**, Tours, 2010. In press.

LI-GUANG, S. et al. Effect of elemental nano-selenium on sêmen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male boer goats. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 118, p. 248-254, 2010.

LIMA, L. G.; DOMINGUES, J. L. Uso do selênio na produção de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 4, n. 4, p. 462-474, jul./ago. 2007. Disponível em: <<http://www.nutritime.com.br>>. Acesso em: 09 abr. 2009.

MANKAD, M. et al. Seminal plasma zinc concentration and α -glucosidase activity with respect to semen quality. **Biological Trace Element Research**, San Diego, v. 110, p. 97-106, 2006.

MASSANYI, P. et al. Contamination of bovine insemination doses with cadmium, copper, lead and zinc and its relation to semen activity. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, London, v. 35, n. 9, p. 1637-1644, 2000.

MASSANYI, P. et al. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in bull and ram semen and relation to the occurrence of pathological spermatozoa. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, London, v. 39, n. 11, p. 3005-3014, 2004.

MASSANYI, P. et al. Concentration of the some trace elements in the stallions semen and relation to the spermatozoa quality. **Savremena poljoprivreda**, Novi Sad, v. 54, n. 3-4, p. 307-311, 2005.

MASSANYI, P.; LUKAC, N.; TRANDZIK, J. In vitro inhibition of the motility of bovine spermatozoa by cadmium chloride. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, London, v. 31, n. 8, p. 1865-1879, 1996.

MAY, T. W.; WIEDMEYER, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, Shelton, v. 19, n. 5, p. 150-155, sept./oct. 1998.

MCDOWELL, L. R.; CONRAD, J. H. Trace mineral nutrition in Latin American. **World Animal Review**, Florida, Gainesville, p. 24-33, 1977.

MEEKER, J. D. et al. Environmental exposure to metals and male reproductive hormones: circulating testosterone is inversely associated with blood molybdenum. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 93, n. 1, p. 130-140, 2010.

MESSIHA, F. S. Cesium: a bibliography update. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, La Jolla, v. 21, p.113-129, 1984.

MORAES, S. S. **Importância da suplementação mineral para bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa – Gado de Corte, 2001a.

MORAES, S. S. **Novos microelementos minerais e minerais quelatados na nutrição de bovinos**. Campo Grande: Embrapa – Gado de Corte, 2001b.

MORAES, S. S. **Principais deficiências minerais em bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa – Gado de Corte, 2001c.

MORAES, S. S.; TOKARNIA, C. H.; DOBËREINER, J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 19, n. 1, p. 19-33, 1999.

MUDRON, P. et al. Effects of iron and vitamin E administration on some immunological parameters in pigs. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.**, Hannover, v. 103, p. 131-133, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle.** 7th. ed. Washington: National Academy of Sciences, 2000, 248p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7th. ed. Washington: National Academy of Sciences, 2001, 208p.

NICODEMO, M. L. F.; SERENO, J. R. B.; AMARAL, T. B. **Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos.** Documento 80, São Carlos: Embrapa, 2008.

NIEKERK, V. The influence of experimentally induced copper deficiency on the fertility of rams. Semen parameters and peripheral plasma androgen concentration. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 60, n. 1, p. 28-31, 1989.

NIXON, D. E.; MOYER, T. P. Routine clinical determination of lead, arsenic, cadmium and thallium in urine and whole blood by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Gainsville, v. 51, p. 13-25, 1996.

OLIVEIRA, A. P. Determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por ICP-MS. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 25, p. 76-83, 2006.

OLIVEIRA, A. R. **Efeito de diferentes fontes e concentrações de zinco na mistura mineral sobre desempenho e características seminais de touros jovens criados em campo.** 2006. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2006.

OSKARSSON, A.; REEVES, A. L. Chapter 20 - Barium. In: NORDBERG, G. F. et al. **Handbook on the Toxicology of Metals.** 3rd ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 407-414.

PALMER, C. D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparasion between inductively coupled plasma – mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Gainsville, v. 61, p. 980-990, 2006.

PANDEY, R.; SRIVASTAVA, S. P. Spermatotoxic effects of nickel in mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 64, p. 161-167, 2000.

PARSONS, P. J.; BARBOSA, F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochimica Acta Part B**, Gainsville, v. 62, p. 992-1003, 2007.

PATRIARCA, M. et al. Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis, and treatment of diseases. **Microchemical Journal**, Lake Charles, v. 59, p. 194-202, 1998.

PÉLISSIER-ALICOT, A. L. et al. Fatal poisoning due to intravasation after oral administration of barium sulfate for contrast radiography. **Forensic Science International**, Turku, v. 106, p. 109-113, 1999.

PERALTA-VIDEA, J. R. et al. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, London, v. 41, p. 1665-1677, 2009.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, Alberta, v. 66, p. 307-313, 2006.

PINSKY, C.; BOSE, R. Pharmacological and toxicological investigations of cesium. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, La Jolla, v. 21, p. 17-23, 1984.

PRATT, W. D. et al. Effects of selenium supplementation on bull sperm metabolism in vitro. **Theriogenology**, Alberta, v. 13, n. 5, p. 369-379, 1980.

PRICHARD, E.; MACKAY, G. M.; POINTS, J. **Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results**. Bodmin: Crown, 1996.

ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, Califórnia, v. 126, p. 259-276, 2006.

ROCHA, F. T. A. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Virginia, v. 17, p. 247-258, 2003.

RODMILANS, M. et al Effects of reduction of petrol lead on blood lead levels of the population of Barcelona. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 56, p. 717-721, 1996.

ROSA, I. V. **Deficiências minerais e desempenho reprodutivo em ruminantes**. Campo Grande: Embrapa – Gado de Corte, 1993.

ROSA, I. V. Suplementação mineral de bovinos sob pastejo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, 1994, Campinas. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1994, p. 213-243.

SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. **The Journal of Urology**, Charlottesville, v. 181, p. 741-751, 2009.

SANTOS, J. E. P. **Efeitos da nutrição na reprodução bovina**: Revisão. Veterinary Medicine Teaching and Research Center, School of Veterinary Medicine UC-Davis: California, 1999.

SANTOS, R. A. A. L. **Determinação de concentrações de elemento traço presentes no tecido sanguíneo de animais de pequeno porte através de ICP-MS**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SANTOS, S. B. **Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelos métodos PIXE e ICP-MS**. 2007. 157f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SAVORY, J.; WILLS, M. R. Trace metals: essential nutrients or toxins. **Clinical Chemistry**, Boston, v. 38, p. 1565-1573, 1992.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. M.; UNANIAN, M. M. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam**. Documento 51, Campo Grande: Embrapa, 1993, 128 p.

SILVA, A. S. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de mercúrio e tálio em amostras ambientais usando GF AAS e ETV-ICP-MS**. 2004. 124f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Santa Catarina, 2004.

SIU, E. R. et al. Cadmium-induced testicular injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Raleigh, v. 238, p. 240–249, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 5. ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002.

SLIVKOVA, J. et al. Concentration of trace elements in human semen and relation to spermatozoa quality. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, London, v. 44, p. 370-375, 2009.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 60-61, p. 549-560, 2000.

SOBTI, R. C.; GILL, R. K. Incidence of micronuclei and abnormalities in the head of spermatozoa caused by the salts of a heavy metal nickel. **Cytologia**, Tokio, v. 54, p. 249-254, 1989.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amherst, v. 128, p. 104-109, 2009.

SPEARS, J. W. Reevaluation of the metabolic essentiality of the minerals. **Journal of Animal Science**, Connecticut, v. 12, p. 1002-1008, 1999.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Ed. Manole, 2008.

STRACHAN, S. Trace Elements. **Current Anaesthesia & Critical Care**, London, v. 21, p. 44-48, 2010.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Florida, v. 856, p. 243-258, 1999.

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I. Theory, design and operation of a dynamic reaction cell for ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, Shelton, v. 20, p. 45-52, 1999.

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I.; BANDURA, D. R. Reactions cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. **Spectrochimica Acta Part B**, Gainesville, v. 57, p. 1361-1452, 2002.

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I.; VOLLKOPF, U. A dynamic reaction cell for inductively coupled mass spectrometry (ICP-DRC-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 15, pt. III, p. 1261-1269, 2000.

TAYLOR, A. Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 21, p. 381-383, 2006.

TAYLOR, A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 19, p. 505-556, 2004.

TAYLOR, A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 20, p. 323-369, 2005.

TAYLOR, A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 21, p. 439-491, 2006.

THOMAS, R. Choosing the right trace element technique. **Today's Chemist at Work**, Washington, v. 8, n. 10, p. 42-48, 1999.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. The sample introduction system. **Spectroscopy**, Duluth, v. 16, pt. II, n. 5, p. 56-60, 2001a.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. The plasma source. **Spectroscopy**, Duluth, v. 16, pt. III, n. 6, p. 26-30, 2001b.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. The interface region. **Spectroscopy**, Duluth, v. 16, pt. IV, n. 7, p. 26-34, 2001c.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. Mass analyzers: collision/reaction cell technology, **Spectroscopy**, Duluth, v. 17, pt. IX, v. 2, p. 42-48, 2002a.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. A review of interferences, **Spectroscopy**, Duluth, v. 17, pt. XII, v. 10, p. 24-31, 2002b.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, Louisville, v. 25, p. 304-315, 2008.

TOKARNIA, C. H. et al. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos – revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédia, v. 19, n. 2, p. 47-62, 1999.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Doenças causadas por deficiências minerais em bovinos em regime de campo no Brasil. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE PESQUISA EM NUTRIÇÃO MINERAL DE RUMINANTES EM PASTAGENS, 1976, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: UFMG/UFV/EPAMIG, 1976, p. 298-308.

TOKARNIA, C. H.; DOBËREINER, J.; MORAES, S. S. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédia, v. 8, p. 1-16, 1988.

TOKARNIA, C. H.; DOBËREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédia, v. 20, n. 3, p. 127-138, 2000.

TOMAN, R.; MASSANYI, P. Changes in the testis and epididymis of rabbits after an intraperitoneal and peroral administration of cadmium. **Trace Elements and Electrolytes**, Münster, v. 19, p. 114-117, 2002.

TURNER, F. B. **Evaluating relationships between various estimates of semen quality based on fertility assessments of boars**. 2008. 157f. Thesis (Master of Science in Animal Science) - North Carolina State University, North Carolina, 2008.

UNDERWOOD, E.; MERTZ, W. Introduction in trace elements in human and animal nutrition. In: MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. 5 th ed. San Diego: Academic Press, 1987, p. 1-19.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, USP. U. S. Pharmacopeia 30. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2007.

VALLE, S. F. **Caracterização do perfil mineral em bovinos de corte em Cachoeira do Sul (região da depressão central do Rio Grande do Sul)**. 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

XU, B. et al. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. **Reproductive Toxicology**, Louisville, v. 7, p. 613-618, 1993.

XU, D. X. et al. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. **Mutation Research**, North Carolina, v. 534, p. 155-163, 2003.

WONG, W. Y. et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, Louisville, v. 15, p. 131-136, 2001.

YUYAN, L. et al. Are serum zinc and copper levels related to semen quality? **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 89, n. 4, p. 1008-1011, 2008.

ZEMANOVA, J. et al. Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, British Columbia, v. 54, p. 281-286, 2007.