

## USO DA TÉCNICA HRICP-MS NA AVALIAÇÃO DOS ISÓTOPOS DE BORO EM EUCALIPTO

Edson Marcio Mattiello\*, Hugo Alberto Ruiz e Ivo Ribeiro da Silva

Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil

Jorge Eduardo de Souza Sarkis

Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, 05580-000 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 26/2/10; aceito em 21/9/10; publicado na web em 7/1/11

USE OF THE HRICP-MS TECHNIQUE FOR THE EVALUATION OF BORON ISOTOPES IN EUCALITPUS PLANTS. The  $^{10}\text{B}$  isotope tracer technique is essential to study the B mobility in plants. Factors that can influence the quality of measured B isotope ratios were optimized experimentally using High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HRICP-MS). An isotopically certified standard (NIST SRM-951) was used. The best combination was obtained using a resolution of 400, a RF power of 1250 W, followed by 15 measurements over a 10-s integration period each ( $15 \times 10$ ). Utilizing this approach it was possible to obtain a precision of 0.3 % in standard material and 2z % in the experimental samples. The results show the importance of establishing optimized work conditions before carrying out the analytical series.

Keywords: isotope ratio; micronutrients; translocation.

### INTRODUÇÃO

O boro (B) é um elemento quimicamente complexo; depois do carbono, deve ser o elemento de característica físico-química mais intrigante.<sup>1</sup> É um elemento essencial para as plantas e sua deficiência afeta o crescimento e produção das culturas em diversas regiões do mundo.<sup>2</sup> No solo, os teores disponíveis para as plantas variam entre 0,1 e 2 mg  $\text{dm}^{-3}$  de B (B extraído pelo método água quente),<sup>3</sup> e teores foliares entre 20 e 100 mg  $\text{kg}^{-1}$  são considerados adequados para a maioria das plantas cultivadas.<sup>4</sup> Os teores de B encontrados em tecido vegetal têm sido usados como indicativo do estado nutricional desse elemento nas plantas.

Diversas técnicas têm sido usadas para determinação de B no solo e em tecido vegetal.<sup>5</sup> O método colorimétrico é o mais difundido e baseia-se na formação de complexo colorido com ácido bórico a pH 5,1, utilizando azometina-H. A intensidade da cor é medida a 420 nm, em espectrofotômetro ou colorímetro. É um método simples, de rápida execução e com sensibilidade apropriada para a maioria dos estudos de fertilidade do solo e nutrição de plantas. A determinação de elementos-traços, entre eles o B, tem sido facilitada após a introdução dos espectrofotômetros de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), sobretudo pelo baixo limite de detecção, pela ampla faixa de linearidade e pela determinação múltipla de elementos.<sup>6</sup> No entanto, a determinação do teor total de B em tecido vegetal não permite o conhecimento da redistribuição ou remobilização do nutriente entre os órgãos da planta. Também não permite distinguir a origem do B nos estudos de fertilização e absorção do nutriente pelas plantas. Assim, estudos da razão isotópica de B em amostras vegetais são de fundamental importância para a compreensão da absorção e do transporte do nutriente internamente na planta, sendo relevante na distinção dos genótipos quanto à aquisição e utilização do nutriente<sup>7</sup> e na orientação de técnicas mais apropriadas de fertilização.

As técnicas tradicionalmente empregadas na determinação de razões isotópicas de B em amostras vegetais são a espectrometria de massas termo-iônica (TIMS) e a espectrometria de massas de íon secundário

(SIMS).<sup>8,9</sup> A TIMS é a técnica mais precisa e sensível e permite a análise por meio de íons positivos<sup>10</sup> ou negativos.<sup>11</sup> A grande desvantagem desta técnica se deve a interferências isobáricas, exigindo a separação química do elemento de interesse. A técnica SIMS possui a vantagem de permitir a determinação simultânea da concentração e composição isotópica do B nas amostras em estudo sem nenhum tratamento prévio, porém a precisão dos resultados é inferior à da técnica anterior (cerca de 3-4%), o que torna difícil a observação de pequenas variações na intensidade isotópica a ser medida.

A partir de meados da década de 1970 surgiu uma nova instrumentação analítica, resultante do acoplamento de uma fonte de íon extremamente eficiente (plasma indutivamente acoplado-ICP) com uma técnica de análise iônica extremamente seletiva (espectrometria de massas-MS). Essa técnica, denominada espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), rapidamente se popularizou e tem sido utilizada nas mais diversas áreas do conhecimento.<sup>12-14</sup> Atualmente, duas categorias de equipamentos dessa natureza estão disponíveis: os chamados de baixa resolução, cuja separação iônica é feita, fundamentalmente, por filtros quadrupolos; e aqueles conhecidos como de alta resolução ou setor magnético, nos quais a análise do feixe iônico é realizada por meio de um sistema conhecido como Nier-Johnson invertido, no qual um analisador magnético está acoplado a um setor elétrico.<sup>15</sup>

Ambas as técnicas têm sido utilizadas nos estudos de isótopos de B.<sup>16</sup> Técnicas de determinação dos dois isótopos estáveis de B,  $^{10}\text{B}$  e  $^{11}\text{B}$ , com abundância natural aproximada de 19,9 e 80,1%, respectivamente, permitem o monitoramento do B em sistemas biológicos. O baixo limite de detecção é uma grande vantagem em relação aos demais métodos, podendo variar de 1 a 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de B em extratos biológicos digeridos.<sup>17,18</sup> A determinação de B por meio da diluição isotópica em ICP-MS é considerada a mais exata técnica para análises quantitativas.<sup>19</sup>

Análises isotópicas de B normalmente não sofrem interferências espectroscópicas. Entretanto, vários outros fatores podem influenciar a qualidade dos resultados analíticos, entre os quais: tempo morto dos detectores, efeito espaço/carga, eficiência de transmissão iônica, estabilidade da corrente iônica e resolução espectral.<sup>12</sup> Todos esses

\*e-mail: mattiello@ufv.br

parâmetros podem ser otimizados experimentalmente, por meio da análise de material de referência certificado isotopicamente; contudo, são poucos os relatos na literatura sobre as condições analíticas adequadas para análise da razão isotópica do B em material vegetal, por meio de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma ativado indutivamente (HRICP-MS).

A utilização de técnicas sensíveis e capazes de determinação de B com alta precisão e exatidão é fundamental para avaliações de razões isotópicas de B nos estudos de fertilização e absorção de B<sup>20</sup> e de mobilidade do nutriente em plantas.<sup>7,21</sup> Neste trabalho, objetivou-se avaliar a técnica HRICP-MS na determinação da razão isotópica de B em amostras de tecido de plantas de eucalipto submetidas à aplicação de <sup>10</sup>B e sua aplicação para estudos de mobilidade de B em plantas. Para isso, foram avaliados os principais fatores que influenciam a qualidade das medidas da razão isotópica do B, como a estatística de contagem, a potência da radiofrequência, a qualidade do espectro e o ajuste do sistema óptico do aparelho.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica. O ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Germany) foi preparado com água com resistividade de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>, obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). A solução de B, enriquecida com <sup>10</sup>B (99 atom% <sup>10</sup>B), foi preparada a partir de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Aldrich). A solução estoque de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de B foi preparada a partir de material de referência certificado NIST SRM-951, com 19,827% de <sup>10</sup>B e 80,173% de <sup>11</sup>B. Padrões contendo 91,85 μg L<sup>-1</sup> de B foram preparados a partir da solução estoque padrão e usados na fase de calibração e durante as séries analíticas. A concentração do padrão era próxima das concentrações esperadas nos extratos diluídos das amostras a serem analisadas.

### Obtenção do material vegetal

Mudas de dois clones comerciais de eucalipto, codificados sob os números 68 e 129, foram cultivadas em solução nutritiva,<sup>22</sup> 1/2 força, com 10 μmol L<sup>-1</sup> de B (abundância natural), sendo a fonte H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany), durante 21 dias, em casa de vegetação. Após esse período, selecionaram-se plantas uniformes de cada clone. Dois terços das plantas foram cultivados na ausência de B, e o terço restante, na presença de 20 μmol L<sup>-1</sup> de B (abundância natural). Decorridos 45 dias nessas condições, uma única folha madura das plantas crescidas na ausência e de outras crescidas na presença de B foi imersa em solução de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> enriquecido com 99 atom % <sup>10</sup>B, na concentração de 1,64 g L<sup>-1</sup> de <sup>10</sup>B, durante 1 min. Outras plantas cultivadas na ausência de B não receberam a solução de <sup>10</sup>B, permanecendo como testemunhas. Precauções foram tomadas para a não contaminação de outras partes da planta e da solução nutritiva. Dessa forma, podia-se verificar qualitativa e quantitativamente a translocação de B da folha madura para outras partes da planta.

Nos tempos de 1, 5, 12 e 17 dias após a imersão da folha madura em solução contendo <sup>10</sup>B, foram retiradas amostras de tecidos jovens (folhas jovens e ápices dos ramos), dos três tratamentos impostos. Previamente à imersão da folha madura em solução contendo <sup>10</sup>B foram retiradas amostras de tecidos jovens para referenciar o tempo zero.

### Preparo das amostras

As amostras dos tecidos jovens foram secas em estufa de circulação forçada a 65 °C por 96 h. Elas foram trituradas e, aproximada-

mente, 0,2 g do material foram calcinados a 550 °C em cadinhos de porcelana; em seguida, o resíduo foi dissolvido em 5 mL de ácido nítrico, na concentração de 1,59 mol L<sup>-1</sup>. O resíduo foi passado por filtro de náilon de 0,45 μm e armazenado em microtubos plásticos em ultrafreezer.

### Procedimento analítico e obtenção dos dados

Para a determinação da razão isotópica de <sup>10</sup>B:<sup>11</sup>B utilizou-se um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma ativado indutivamente (HRICP-MS, Element-Thermo Finnigan, Bremen, Germany), nas condições de operação apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições de operação do HRICP-MS

Instrument	Element ( Thermo Finnigan, Bremen, Germany)
Sensitivity	10 ng g <sup>-1</sup> <sup>115</sup> In = 1x 10 <sup>6</sup> counts
rf Power	1250 W
Nebulizer	Meinhardt glass with water cooled spray chamber , Scott type
Sample uptake	0.8 mL min <sup>-1</sup>
Interface	Ni cones
Gas flows (L min <sup>-1</sup> )	Plasma = 14, auxiliary 1.0 , nebulizer = 0.90
Resolution m /Δ m	300,
Integration window	80%
Scans	Electric, number of scans =30
Detector	Ion counting

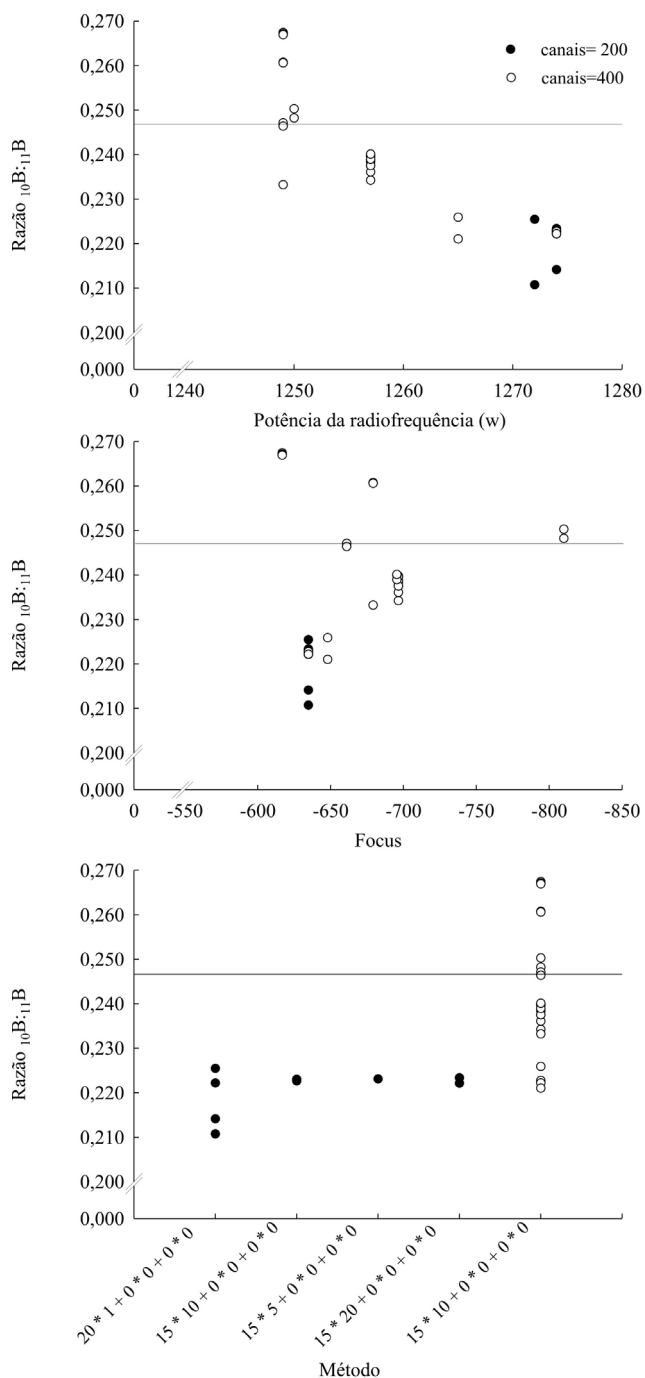
Soluções padrão NIST SRM-951, de razão <sup>10</sup>B/<sup>11</sup>B equivalente a 0,247, foram analisadas em diferentes combinações de potência da radiofrequência, focus e método de contagem. Também foi avaliada a estabilidade da leitura ao longo do tempo. A melhor combinação, a que mais se aproximasse do padrão certificado NIST SRM-951 e com menores valores de coeficiente de variação (CV), foi considerada apropriada para realização das séries analíticas.

Uma vez estabelecidas as condições de trabalho mais adequadas para as análises (calibração), procedeu-se à determinação da razão isotópica de B (<sup>10</sup>B:<sup>11</sup>B) em tecido de eucalipto. As amostras foram diluídas 10 vezes com água deionizada 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> e colocadas em amostrador automático, determinando-se a razão isotópica de <sup>10</sup>B:<sup>11</sup>B nos extratos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram estudados os principais fatores que poderiam influenciar a qualidade da razão isotópica: estatística de contagem, potência da radiofrequência, qualidade do espectro e ajuste do sistema óptico do aparelho. As amostras analisadas nessa fase (padrão certificado NIST 951) representaram diferentes combinações de fatores interferentes na razão isotópica de B. Os resultados mostraram que a qualidade da determinação da razão isotópica (exatidão e precisão) depende de ajustes específicos do aparelho e do método adotado (Figura 1). A aproximação dos valores medidos no aparelho ao padrão NIST 951 foi possível quando se adotaram canais de 400 (resolução de massa, M/ΔM).

A potência da radiofrequência foi a variável de maior influência na razão <sup>10</sup>B/<sup>11</sup>B, e o melhor ajuste, em relação ao padrão NIST 951, foi obtido utilizando valores de 1.250 W (Figura 1). A seleção de valores de resolução de massa mais elevados (3800) em HRICP-MS resultou em interferências do ion <sup>40</sup>Ar<sup>4+</sup> na leitura do <sup>10</sup>B devido à pequena diferença entre o número de massa de ambos. Essa interferência foi

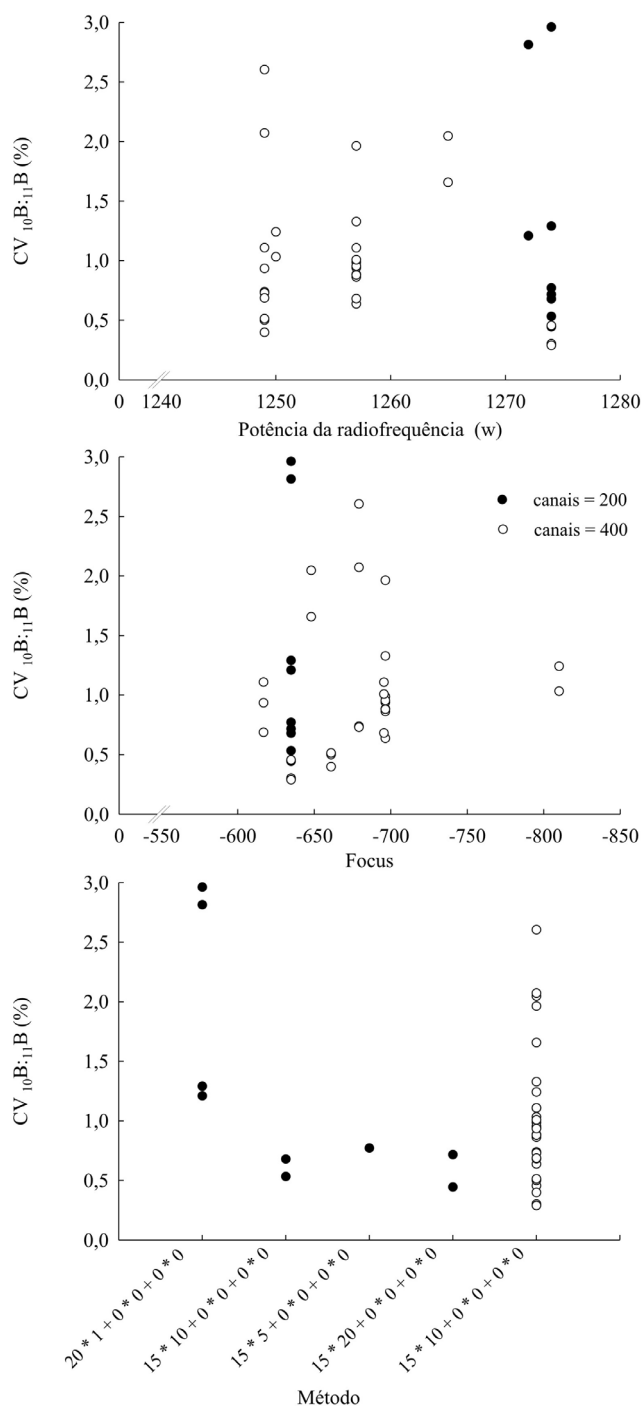


**Figura 1.** Razão isotópica de B considerando a potência da radiofrequência, focus e método, utilizando canais de 200 e 400. O traço (—) indica a razão isotópica do padrão NIST SMR 951

reduzida com a adoção de uma menor resolução (350) e menor valor de potência da radiofrequência (1200 W).<sup>23</sup> Operando em condições de menor resolução o sinal geralmente tem maior intensidade e os picos tem formato de topo achatado, resultando em maior precisão da medição da razão isotópica do B.<sup>23</sup>

O focus utilizado também influenciou a razão isotópica de B. Valores menores que -650 se mostraram mais apropriados para determinação da razão isotópica (Figura 1).

A calibração do aparelho em relação ao padrão NIST 951 foi possível apenas quando se adotou estatística de contagem de  $15 * 10$  (15 medições com 10 períodos de integração) (Figura 1). As demais

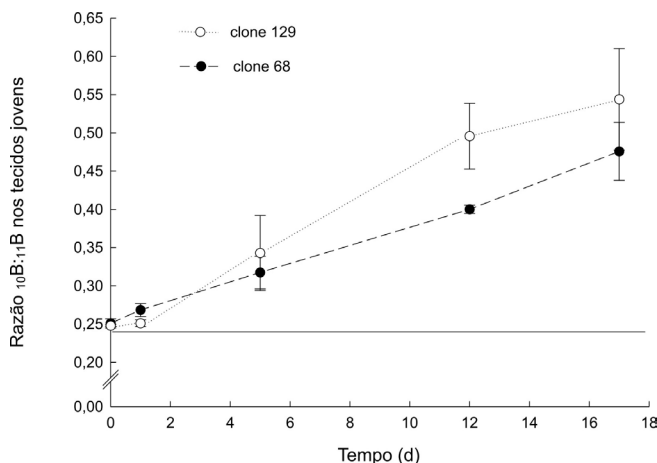


**Figura 2.** Coeficiente de variação (CV%) da razão isotópica de B, considerando a potência da radiofrequência, focus e método, utilizando canais de 200 e 400

combinações foram pouco exatas e precisas, sendo, portanto, descartadas nas determinações posteriores à fase de calibração.

O coeficiente de variação também foi influenciado pelas diferentes combinações na fase de calibração (Figura 2). Considerando como satisfatório nessa fase um CV menor que 1,5%, percebe-se que uma ampla faixa de potência da radiofrequência atende a essa pré-condição. Foi possível obter CV menor que 0,3% durante essa fase, evidenciando elevada precisão nas leituras do padrão. Em relação ao focus utilizado, foi possível obter CV menor que 1,5% em uma ampla faixa de trabalho.

Na Figura 3 é apresentada a razão  $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$  em amostras de tecidos jovens de dois clones de eucalipto que receberam uma única aplicação de  $^{10}\text{B}$  numa folha madura. A técnica usada mostrou-se precisa e exata, possibilitando a detecção do enriquecimento de  $^{10}\text{B}$  nos órgãos jovens da planta, com destaque para o clone 129, que se mostrou mais eficiente na translocação do B. Portanto, essa técnica, sob condições analíticas definidas, será extremamente valiosa em estudos futuros que envolvam a absorção ou redistribuição floemática de B em eucalipto,<sup>7</sup> ou mesmo auxiliar no isolamento de possíveis complexos orgânicos de B no floema, conforme já relatado para outras espécies.<sup>24</sup>



**Figura 3.** Razão isotópica de B em tecidos jovens de dois clones de eucalipto que receberam uma única aplicação de  $^{10}\text{B}$  na folha madura, considerando o tempo de aplicação de  $^{10}\text{B}$ . O traço (—) indica a razão isotópica do padrão NIST SMR 951

## CONCLUSÕES

Há necessidade do uso e correção por padrão certificado para correção das pequenas variações encontradas nas rotinas de trabalho.

Com o equipamento e as condições estabelecidas foi possível atingir coeficientes de variação de 0,3% para os padrões e de 2% para as amostras.

Por meio da determinação da razão isotópica de B em HRICP-MS, foi possível verificar a mobilidade de B em plantas de eucalipto.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre. A razão isotópica de B do material de referência NIST SRM 951 foi ligeiramente afetada pelo tempo de duração da série analítica (Figura 1S). Os resultados mostraram va-

riação da razão  $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$  de 0,230 a 0,248, sendo a média de 0,240. Em média, a exatidão foi de 97,2% ao longo da série analítica. Os valores de razão  $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$  para o material de referência no presente estudo são comparáveis com a faixa de 0,238-0,252 reportado anteriormente.<sup>23</sup>

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN, pela realização das análises e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Greenwood, N.; Earnshaw, A.; *Chemistry of the Elements*, 2<sup>nd</sup> ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1997.
- Shorrocks, V.; *Plant Soil* **1997**, *193*, 121.
- Goldberg, S.; Shouse, P.; Lesch, S.; Grieve, C.; Poss, J.; Forster, H.; Suarez, D.; *Soil Sci.* **2002**, *167*, 720.
- Malavolta, E.; Pimentel-Gomes, F.; Alcarde, J.; *Adubos e adubações*, 1<sup>a</sup> ed.; Nobel: São Paulo, 2000.
- Sah, R.; Brown, P.; *Microchem. J.* **1997**, *56*, 285.
- Duffy, M.; Thomas, R.; *Atom. Spectrosc.* **1996**, *17*, 128.
- Mattielo, E. M.; Ruiz, H. A.; Silva, I. R.; Sarkis, J. E. S.; Neves, J. C. L.; Pucci, M. M.; *R. Bras. Ci. Solo* **2009**, *33*, 1695.
- Derue, C.; Gibouin, D.; Verdus, M.; Lefebvre, F.; Demarty, M.; Ripoll, C.; Thellier, M.; *Microsc. Res. Techniq.* **2002**, *58*, 104.
- Vering, G.; Crone, C.; Bijma, J.; Arlinghaus, H.; *Appl. Surf. Sci.* **2003**, *203*, 785.
- Deyhle, A.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *206*, 79.
- Shen, J.; You, C.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1972.
- Heumann, K.; Gallus, S.; Radlinger, G.; Vogl, J.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **1998**, *13*, 1001.
- Houk, R. S.; *Accounts Chem. Res.* **1994**, *27*, 333.
- Jarvis, I.; Jarvis, K. E. *Chem. Geol.* **1992**, *95*, 1.
- Vanhaecke, F.; Moens, L.; Dams, R.; Taylor, P.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 567.
- Brown, P.; Hu, H.; *Ann. Bot.* **1996**, *77*, 497.
- Smith, F. G.; Wiedelin, D. R.; Houk, R. S.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1458.
- Evans, S.; Krahenbuhl, U.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1994**, *9*, 1249.
- Sah, R.; Brown, P.; *Plant Soil* **1997**, *193*, 15.
- Franco, H.; Trivelin, P.; Vitti, A.; Otto, R.; Faroni, C.; Tovajar, J.; *R. Bras. Ci. Solo* **2009**, *33*, 1667.
- Boaretto, R.; Quaggio, J.; Mourao, F.; Gine, M.; Boaretto, A.; *Commun. Soil. Sci. Plan.* **2008**, *39*, 2501.
- Clark, R. B.; *J. Agr. Food. Chem.* **1975**, *23*, 458.
- Gabler, H. E.; Bahr, A.; *Chem. Geol.* **1999**, *156*, 323.
- Hu, H. N.; Penn, S. G.; Lebrilla, C. B.; Brown, P. H.; *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 649.