

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO E SELÊNIO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

PAULA MARTIN DE MORAES

ORIENTADOR: PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada ao Departamento de Química e
Bioquímica do Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - UNESP, Campus de
Botucatu, para obtenção do Título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

**BOTUCATU - SP
NOVEMBRO, 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Moraes, Paula Martin de.

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de fósforo e selênio em amostras biológicas / Paula Martin de Moraes. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 10604065

1. Elementos traços – Análise. 2. Química analítica. 3. Peixe – Alimentação e rações.

Palavras-chave: Cultivar orgânico e convencional; Extração por ultra-som; GFAAS; Nutrição de peixes; Slurry; UV-visível.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquelas pessoas que compartilharam comigo seus conhecimentos e sempre me incentivaram a trilhar meus caminhos;

À matriarca Ignez

Aos meus pais Carlos Alberto e Maria da Graça

Aos meus irmãos Murilo e Denise

Aos meus sobrinhos Maria Fernanda, Otto e Luca

Aos meus amigos e ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades, pela proteção e bênçãos, pela luz e paciência nos momentos mais difíceis;

Aos meus familiares, por todo o apoio e incentivo constantes;

À minha tia Beth, pelo auxílio tão importante durante meus estudos;

Ao Prof. Dr. Pedro, pela orientação, pelo exemplo pessoal e profissional, pela confiança, pelos desafios e ensinamentos;

A todos os meus professores, por terem me proporcionado momentos únicos durante toda a graduação;

À minha turma BIO XLI, que com certeza será para sempre a melhor turma da galáxia (por Marcelo Santos);

Às minhas companheiras de república, que durante muito tempo estiveram ao meu lado;

Aos meus companheiros de laboratório, que compartilharam comigo horas de trabalho e também algumas viagens a congressos;

Aos meus amigos de Jundiaí e de Botucatu, que fizeram e fazem parte da minha vida;

Ao meu fiel companheiro e filhote Eros, por suas recepções calorosas e seu carinho incondicional;

De uma forma geral, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a construção do meu eu e para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
---------------------	----

CAPÍTULO I

1. Introdução Geral e Justificativas	1
1.1. Importância da determinação da disponibilidade de minerais na nutrição animal	1
1.2. Importância da determinação de minerais em estudos de nutrição de plantas	3
1.3. Principais fundamentos da Espectrometria de Absorção Atômica	6
1.3.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	9
1.3.2. Atuação dos modificadores químicos na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	12
1.3.2.1. Modificadores químicos convencionais	13
1.3.2.2. Modificadores permanentes	14
1.3.2.3. Modificadores permanentes com co-injeção de metais do grupo da platina	15
1.4. Fundamentos do processo de extração por ultra-som	16
1.4.1. Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido	17
1.4.2. Ultra-som no preparo de amostras e tratamento de efluentes	18
2. Referências Bibliográficas	20

CAPÍTULO II

Resumo	29
1. Introdução	29
2. Parte Experimental	31
2.1. Reagentes e soluções	31
2.2. Coleta e preparo das amostras	32
2.3. Instrumentação	32
2.4. Extração do Fósforo	33
2.5. Determinação de fósforo nas amostras de ração e fezes de peixes	33
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Otimização do tempo e da potência de sonificação no processo de extração dos analitos metálicos	34

3.2. Figuras de mérito do método de extração proposto	38
3.3. Aplicação do método	40
4. Conclusões	42
5. Referências Bibliográficas	43

CAPÍTULO III

Resumo	56
1. Introdução	56
2. Materiais e métodos	57
2.1. Reagentes, soluções padrão e amostras	57
2.2. Preparo das suspensões das amostras	59
2.3. Equipamentos	59
2.4. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio	60
2.5. Preparo das suspensões padrão	60
2.6. Procedimentos analíticos	61
3. Resultados e Discussão	62
3.1. Otimização das condições instrumentais	62
3.2. Determinação do tempo ótimo de sonificação das suspensões das amostras	64
3.3. Obtenção das curvas analíticas	65
4. Conclusões	68
5. Referências Bibliográficas	68

RESUMO

A determinação de fósforo em amostras de rações e fezes de peixes por espectrometria no visível e de selênio em amostras vegetais de cultura orgânica por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) representa o foco principal do trabalho desenvolvido. O fósforo e o selênio são macro e micronutrientes importantes para a nutrição vegetal e animal, no entanto, se utilizados sem um controle adequado podem poluir o solo e os recursos hídricos, atingindo todo o meio ambiente. Dessa forma, foram desenvolvidos métodos para extração dos analitos que diminuiriam significativamente os resíduos químicos produzidos nas determinações de rotina feitas na área de nutrição de plantas e de piscicultura. No caso do fósforo foram otimizados parâmetros físico-químicos para extração desse elemento por ultra-som e posterior quantificação por espectrofotometria no visível. No caso do selênio foram otimizados parâmetros físico-químicos para amostragem em suspensão (slurry) e determinação direta por GFAAS. Os principais parâmetros físico-químicos avaliados e otimizados foram: granulometria da amostra sólida, tempo e potência de sonificação, soluções extratoras, agentes surfactantes para estabilização do slurry; temperatura de pirólise e atomização, tipos de modificadores químicos e volume de amostragem nas determinações de selênio por GFAAS e tempo de reação e relação ao agente cromogênico/volume de amostra nas determinações espectrofotométricas de fósforo. O método de extração por ultra-som foi aplicado na determinação de fósforo biodisponível em amostras de rações de peixes e o método de amostragem em suspensão para a determinação de selênio em amostras orgânicas.

Palavras-chave: *macro e micronutrientes; nutrição de peixes; cultura orgânica; extração por ultra-som; slurry; UV-visível; GFAAS.*

Capítulo – I

1. Introdução Geral e Justificativas

1.1. Importância da determinação da disponibilidade de minerais na nutrição animal

Embora os elementos inorgânicos constituam, em proporção, apenas 4% do tecido corporal animal, eles são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais. Os principais papéis desses elementos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, podemos destacar seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos, através da ligação de seus íons a substratos, favorecendo assim diversas reações, principalmente na mediação de reações de óxido-redução através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destacamos o papel como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tais como o ferro na hemoglobina e o cobalto na vitamina B₁₂.¹⁻³

Por apresentarem proporções e quantidades variáveis no tecido corporal dos animais, os elementos inorgânicos são classificados como macroelementos (elementos que o organismo necessita em grandes quantidades) e microelementos (elementos que o organismo necessita em menores quantidades). Dos elementos químicos presentes na tabela periódica, 25 podem ser classificados como essenciais, no entanto, do ponto de vista prático, são considerados macroelementos essenciais o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre; e como microelementos essenciais o ferro, iodo, selênio, cobalto, manganês, zinco e cobre.^{3,4}

As fontes alimentares utilizadas na dieta de animais terão um alto valor biológico se os nutrientes presentes na mesma apresentarem alta biodisponibilidade. Isso significa que o organismo considerado deverá absorver e utilizar ativamente o nutriente no seu metabolismo.^{4,5} A determinação da concentração total do nutriente na fonte alimentar não fornece informação suficiente sobre a sua fração biodisponível. Na piscicultura, grande parte dos nutrientes não absorvidos pelos peixes permanece na água de cultivo, que é descartada nos mananciais hídricos, o que contribuiu no processo de eutrofização desses mananciais.⁴⁻⁷

Na determinação do coeficiente de digestibilidade de alimentos para peixes, utilizam-se os chamados indicadores fecais. Esses indicadores se dividem em internos e externos. Os marcadores internos ocorrem naturalmente nos alimentos, enquanto que os

marcadores externos são adicionados à dieta do animal.^{8-10, 13} Os marcadores externos são os mais utilizados, sendo o óxido de crômio (III) - Cr_2O_3 - o marcador que apresenta melhor aceitação por ser completamente indigestível, não absorvível e passar uniformemente através do aparelho digestório do animal.^{9, 10} A determinação da concentração dos nutrientes e do Cr_2O_3 nas rações e fezes, permite estimar o coeficiente de biodisponibilidade aparente dos nutrientes metabolizados pelo animal, comparando-se as quantidades de nutrientes e de óxido presentes inicialmente na ração com as quantidades presentes nas fezes do animal.¹⁰⁻¹³

Os procedimentos de determinação das concentrações dos nutrientes metálicos e do indicador fecal Cr_2O_3 tanto nas fezes como nas rações, apresenta dificuldades na etapa de preparo das amostras. Normalmente a mineralização das amostras é feita por aquecimento lento em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica. Os extratos resultantes são soluções ácidas contendo os nutrientes inorgânicos mais íons dicromato, espécie altamente tóxica.^{14, 15} Este procedimento, além de demorado, apresenta o inconveniente de gerar resíduos tóxicos que podem comprometer a saúde do analista e contaminar o meio ambiente. Dessa forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a extração e a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos para posterior determinação do coeficiente de biodisponibilidade aparente desses nutrientes nos estudos de nutrição animal. Neste contexto, a extração do analito por ultra-sonificação apresenta-se como técnica bastante robusta.¹⁶⁻¹⁹ Os efeitos químicos provocados pelos ultra-sons ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência (< 1 MHz). A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras.^{16, 17} No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes ou completa mineralização no caso de compostos orgânicos.¹⁷⁻¹⁹ Assim, a utilização da extração de nutrientes metálicos de amostras biológicas por ultra-sonificação, permite a eliminação da mineralização ácida que, pela metodologia clássica, constitui o principal problema.^{14, 15}

1.2. Importância da determinação de minerais em estudos de nutrição de plantas

A determinação química dos minerais encontrados nos vegetais é o primeiro passo para analisar a necessidade de adição ou não desses nutrientes no solo para suprir a necessidade nutricional das plantas. Cada elemento, em maior ou menor quantidade tem sua função no metabolismo do vegetal. Se houver pouca disponibilidade do mineral no solo, o crescimento e desenvolvimento da planta podem ser prejudicados e, em excesso, também pode causar desenvolvimento anormal do vegetal.¹⁶⁻²⁴

Um nutriente metálico pode funcionar como constituinte de uma estrutura orgânica, como ativador de reações enzimáticas ou como transportador de cargas, além de ter função regulatória. Dependendo da quantidade requerida, o elemento pode ser classificado como macronutriente ou micronutriente. Os macronutrientes são necessários em quantidades elevadas pelo fato de fazerem parte de moléculas essenciais para o vegetal, ou seja, possuem um papel estrutural. Por outro lado, os micronutrientes estão mais relacionados à ativação de certas enzimas, tendo ação regulatória do sistema fisiológico.¹⁶⁻¹⁸

A deficiência dos minerais nas plantas apresenta sintomas que dependem de sua função e mobilidade no vegetal. Como os nutrientes inorgânicos têm funções específicas, os sintomas de sua deficiência são característicos, sendo limitantes para o desenvolvimento do vegetal.¹⁹⁻²¹

Elementos como o nitrogênio, ferro e magnésio estão envolvidos na formação da molécula de clorofila. Na falta destes elementos, o sintoma característico é o amarelecimento da planta, denominado clorose. A deficiência desses elementos causa o mesmo sintoma, porém com diferenciação entre cada um deles devido à sua mobilidade no vegetal.²⁰

Como as reações metabólicas são bastante integradas, uma perturbação específica causada por um determinado nutriente pode desencadear uma série de reações que leva a uma sintomatologia geral, como o subdesenvolvimento, clorose e a necrose dos tecidos. Desse modo, é difícil diagnosticar qual nutriente está em falta a partir da observação de sintomas de deficiência. A análise do solo é uma das maneiras de se determinar se uma cultura está bem nutrida ou se há carência de algum nutriente. Contudo, esta análise apenas fornece a quantidade de nutrientes que está disponível para ser absorvido pelas raízes, mas

não fornece informações se isso realmente irá ocorrer já que a absorção depende de outros fatores. A alternativa mais correta para se determinar o teor de um nutriente na planta é através de análises foliares.^{22,23}

Também é importante ressaltar que os micronutrientes em excesso também podem causar necrose e subdesenvolvimento (enfezamento). Além disso, o excesso de certos macronutrientes pode provocar a deficiência de alguns micronutrientes. Um exemplo clássico é a interação negativa entre o fósforo e o zinco.²³

Existe também a necessidade de sabermos a quantidade de nutrientes no vegetal não só para determinar se há deficiência ou não do mineral, mas também porque cada macro ou micronutriente é essencial para o funcionamento do metabolismo vegetal, e indiretamente no animal, reafirmando a importância da determinação química dos nutrientes presentes na planta.^{24,25}

A chamada “Lei do mínimo” de Liebig diz que a produtividade de uma cultura é limitada pelo elemento que está em menor quantidade. Nesse caso, mesmo se aumentarmos a concentração dos demais nutrientes não haverá aumento na produção em decorrência da ação limitante deste nutriente em déficit. Além de se levar em conta a “lei do mínimo”, devemos considerar que há limite máximo para a utilização de um nutriente. Se a planta possui uma deficiência, há um crescimento proporcional à quantidade de nutrientes nos tecidos, porém depois de algum tempo, o crescimento tende a desacelerar e depois ficar estagnado. No caso de macronutrientes, a zona adequada corresponde à sobra do nutriente absorvido, o qual pode se acumular no vacúolo sem provocar resposta no crescimento. No caso de micronutrientes, essa sobra pode provocar toxicidade nos tecidos e reduzir o crescimento da planta. A região crítica de um nutriente no tecido é aquela que quantidades inferiores ao da região provocam diminuição do seu potencial de crescimento e acima dela o incremento deixa de ser exponencial.²³⁻²⁵

Os nutrientes estudados são importantes não só para a nutrição vegetal, mas também para a nutrição animal, já que sua presença na dieta humana é de significativa importância para o funcionamento dos processos vitais do metabolismo.²⁵

Os minerais desempenham diversas funções, muitos são usados com “blocos” construtores dos tecidos corporais, como os ossos, dentes, músculos e outras estruturas orgânicas. Podem também ser componentes de enzimas porque estão envolvidos na

regulação do metabolismo, além de atuar como íons, ou eletrólitos, que carregam cargas elétricas, podendo ainda, serem ativadores de vários hormônios e enzimas.²⁶

A presença de cálcio é fundamental para o homem, pois participa principalmente da estrutura óssea, onde a formação de sais, como o fosfato de cálcio, é responsável pela resistência desta estrutura. Este mineral também participa da formação dos dentes e em estado iônico ou em combinação com certas proteínas, exerce considerável influência no metabolismo humano.²⁷

A deficiência de cálcio está relacionada principalmente a doenças ósseas, muitos fatores estão envolvidos na formação ou mineralização dos tecidos ósseos e um desequilíbrio qualquer desses fatores pode resultar em desmineralização óssea causando raquitismo em crianças e osteoporose em adultos.²⁶

A principal função do ferro no organismo é a formação de compostos essenciais ao transporte e à utilização de oxigênio. A maior parte dele é usada para formar hemoglobina, um complexo de ferro e proteína que transporta oxigênio dos pulmões aos tecidos corporais. É também armazenado nos tecidos, sobretudo como compostos de proteína chamados ferritinas.^{26,27}

O selênio é componente de várias enzimas, sobretudo a glutathione peroxidase, uma enzima que ajuda a catabolizar os radicais livres e evita danos às estruturas celulares, como as membranas das hemácias. Atua também em conjunto com a vitamina E, como um antioxidante, e supõe-se ter atuação importante na prevenção de câncer.²⁶

O zinco é encontrado em praticamente todos os tecidos corporais como componentes de diversas metaloenzimas. Várias dessas enzimas estão envolvidas nas principais vias do metabolismo de energia, incluindo a lactato desidrogenase (LDH), que é importante para o sistema de energia do ácido láctico. O zinco também tem participação em uma série de outras funções, como a síntese de proteínas, o processo de crescimento e a cicatrização. Além disso, ele está associado às funções imunológicas, incluindo o funcionamento ideal dos glóbulos brancos e o sistema linfático.²⁷

Considerando-se o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos macros e micronutrientes torna-se fundamental para os estudos de nutrição vegetal. Neste contexto, a extração de analitos por ultra-som, apresenta-se como um método bastante promissor. Este procedimento de extração permite a eliminação da

mineralização nítrico/perclórica das amostras em bloco digestor, que na metodologia clássica, constitui o principal problema, pois além de gerar gases tóxicos para o ambiente, pode comprometer a saúde do analista. Além disso, o tempo de análise poderá ser reduzido consideravelmente.

1.3. Principais fundamentos da Espectrometria de Absorção Atômica

O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica consiste na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária emitida por átomos gasosos no estado fundamental. Suas determinações utilizam a absorbância como grandeza física e a Lei de Lambert-Beer para determinação das concentrações. A absorbância é puramente uma quantidade matemática que pode ser representado por: $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$, e segue uma relação linear com a concentração, definida pela "Lei de Beer", onde, I_0 a radiação inicial emitida em um determinado comprimento de onda e I a radiação final emitida pelo decaimento.²⁸

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é utilizada para determinações quantitativas tanto de elementos metálicos e semi-metálicos quanto de alguns elementos não metálicos. É aplicada a uma grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, geológicos, tecnológicos etc. Dentre os tipos de atomizadores mais usados em AAS estão a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg/L, enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GFAAS - do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) é utilizada para determinações de baixas concentrações (µg/L). Sendo assim, a GFAAS apresenta maior sensibilidade que a FAAS devido a maior parte do analito ser introduzido no tubo de grafite e atomizada no caminho óptico, além de condensar a nuvem atômica mais eficientemente por ser um sistema fechado. Já a FAAS é um sistema onde maior parte da amostra é descartada pelo dreno do nebulizador (95%) e a parte da amostra que alcança a chama é diluída pelos gases desta, diminuindo sua sensibilidade. Outra

vantagem na GFAAS quando comparada com a FAAS é a pequena quantidade de amostra utilizada, da ordem de microlitros na GFAAS, enquanto que a FAAS trabalha com amostra de alguns mililitros.²⁸⁻³⁰

O átomo é composto de um núcleo rodeado por elétrons. Estes elétrons ocupam posições nos orbitais em uma determinada ordem e com caminhos definidos. O “estado fundamental” é a distribuição normal dos elétrons, onde, a energia mais baixa corresponde a configuração eletrônica estável do átomo.³⁰

Quando os átomos se encontram no estado gasoso fundamental podem absorver energia sofrendo alterações e passando para um estado conhecido como “estado excitado”, onde os elétrons mais externos (elétrons de valência) serão promovidos para configurações menos estáveis. A radiação absorvida para passar um determinado átomo de seu estado fundamental para seu estado excitado corresponde a comprimentos de ondas específicos característicos de cada elemento que podem ser determinados pela equação de Planck:

$$E = hc/\lambda$$

Onde, (E) é a energia para passar um átomo do seu estado fundamental para seu estado excitado, (h) é a constante de Planck ($h=6,62608 \times 10^{-34}$); (c) é a velocidade da luz ($c=2,99792 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$) e (λ) é o comprimento de onda.³⁰

Por ser instável, o estado excitado do átomo tende imediatamente e espontaneamente a retornar para sua configuração no estado fundamental. Ao retornar ao seu estado inicial a energia radiante equivalente à quantidade absorvida no processo inicial de excitação será emitida (I).^{29, 30}

Como todos os elementos possuem uma estrutura eletrônica única e o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade individual de cada elemento, pode-se determinar qualitativamente qual é o elemento, sendo assim, uma técnica que apresenta alta seletividade e relativamente poucas interferências.³¹

A fração de átomos excitados em um determinado nível de energia é uma função da temperatura e do comprimento de onda (Tabela 1) e é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E/KT}}{g_0}$$

Sendo, N^* o número de átomos no estado excitado e N_0 o número de átomos no estado fundamental; E é a energia específica da excitação; K é a constante de Boltzmann ($k=1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta.^{31, 32}

Tabela 1. Razão N^*/N_0 e a dependência com a Temperatura e o comprimento de onda.

Elemento	Energia de Excitação (eV)	λ (nm)	g^*/g_0	N^*/N_0		
				2000 K	3000 K	4000 K
Zn	5,80	213,9	3	$7,29 \cdot 10^{-15}$	$5,58 \cdot 10^{-10}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$
Cu	2,93	422,7	3	$1,21 \cdot 10^{-7}$	$3,69 \cdot 10^{-5}$	$6,03 \cdot 10^{-4}$
Na	2,11	589,0	2	$0,86 \cdot 10^{-4}$	$5,88 \cdot 10^{-4}$	$4,44 \cdot 10^{-3}$
Cs	1,46	852,1	2	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$7,24 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-2}$

Com isso, chega-se á lei de Lambert-Beer, relacionando a absorvância (A) ou densidade óptica com o número de átomos no estado fundamental (N).

$$A = \log \frac{\Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43 Nlk(\lambda)$$

Onde, $\Phi_0(\lambda)$ é a potência radiante emitida, $\Phi_{tr}(\lambda)$ é a potência radiante transmitida em λ ; N é o número de átomos livres na camada absorvedora; l é o comprimento da camada absorvedora e $k(\lambda)$ é o coeficiente de absorção atômica espectral.²⁹⁻³²

Os seis principais constituintes da espectrometria de absorção atômica são: 1) a fonte de radiação; 2) o sistema de introdução de amostras; 3) o sistema de atomização; 4) o monocromador; 5) o sistema de detecção e 6) a leitura. Estes componentes são conectados a sistemas computadorizados para o controle do equipamento e tratamento dos dados.³²

1.3.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a amostra é introduzida por uma micropipeta ou um amostrador automático no tubo de grafite através de um orifício no tubo. A amostra pode ser injetada no tubo caindo diretamente em sua parede ou sobre uma plataforma de L'vov presente na parte inferior do tubo. Dentre as diferentes configurações de tubos de grafite, a THGA (Transversely-Heated Graphite Atomizer) é uma das mais utilizadas, pois permite uma distribuição uniforme da temperatura ao longo do tubo de grafite, reduzindo eventuais condensações nas extremidades do tubo, o que diminuiria a sensibilidade. A GFAAS permite a utilização de um programa de aquecimento, pré-definido, que submete a amostra injetada no tubo de grafite a diferentes ciclos de temperatura e tempo. As cinco etapas básicas de aquecimento do tubo são: ³³⁻⁴¹

SECAGEM: etapa de eliminação do solvente, que é evaporado lentamente da amostra para evitar respingos e conseqüente perda do analito, restando apenas os resíduos sólidos (Figura 4).

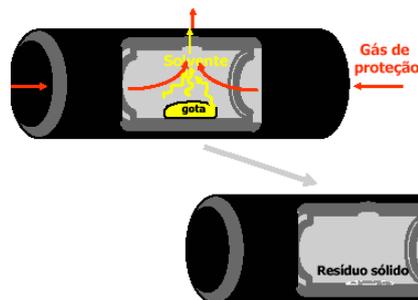


Figura 4. Etapa de secagem da amostras no programa de aquecimento para determinação em GFAAS.

PIRÓLISE: nesta etapa a temperatura e o tempo de pirólise devem ser ajustados para remoção da maior parte da matriz orgânica da amostra, reduzindo a interferência química e o sinal de fundo. Geralmente modificadores químicos são utilizados para estabilizar o analito a temperaturas mais altas, garantindo a eliminação da matriz sem perda do analito (Figura 5).

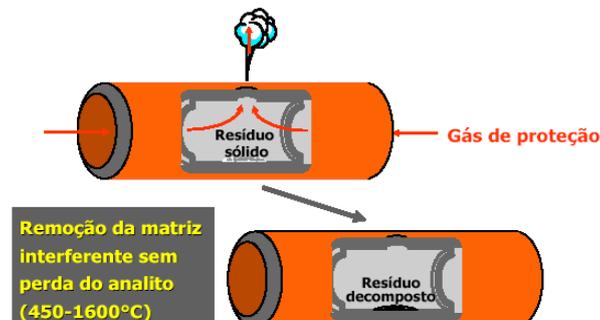


Figura 5. Etapa de pirólise da amostras no programa de aquecimento para determinação de em GFAAS.

ATOMIZAÇÃO: etapa em que a temperatura deve ser alta o suficiente para garantir a completa e rápida atomização do analito, formando a nuvem atômica para a conseqüente medida da radiação absorvida pelo analito no estado fundamental (Figura 6).



Figura 6. Etapa de atomização da amostras no programa de aquecimento para determinação em por GFAAS.

LIMPEZA: etapa para eliminar qualquer resíduo que possa ter ficado no tubo e posteriores efeitos de memória, onde as temperaturas são elevadas a 2400-2550°C por um curto período de tempo.

RESFRIAMENTO: retorna a temperatura ambiente para introdução de uma nova amostra.

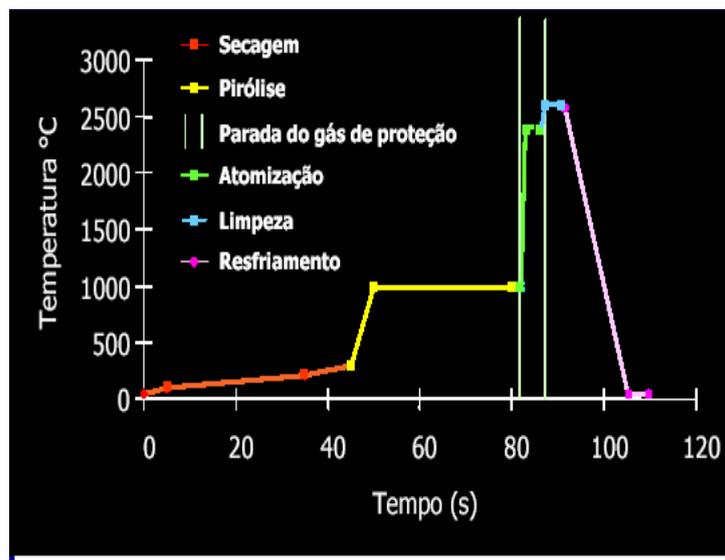


Figura 7. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

Durante todo o programa de aquecimento, um fluxo externo de argônio (gás inerte) passa ao redor do tubo protegendo-o do excessivo desgaste devido às elevadas temperaturas e o contato com o oxigênio atmosférico. Ao mesmo tempo, um fluxo interno de argônio, exceto na etapa de atomização, auxilia na eliminação do ar e dos vapores formados a partir

da volatilização das amostras. A Figura 7 mostra um exemplo de um programa de aquecimento com as cinco etapas envolvidas no processo de atomização do analito metálico.

33-37

Uma grande vantagem da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite consiste na análise direta de amostras sólidas e/ou suspensões, eliminando a etapa de digestão ácida, o que reduz o tempo de análise, o custo e a contaminação, além de minimizar, consideravelmente, a exposição de analista a manipulação de ácidos concentrados. Além disso, a GFAAS apresenta outras vantagens devido a sua versatilidade, como, ação do atomizador como reator químico, obtenção de excelentes limites de detecção, separação do analito da matriz no reator, utilização de pequenos volumes de amostra, caráter multielementar, rapidez, espectro simples etc.³⁸⁻⁴¹

Entretanto, apesar de ser uma técnica bem desenvolvida e robusta, a susceptibilidade a efeitos de matriz, que pode diminuir a sensibilidade ou provocar excessivo desgaste do tubo, limita uma aplicação mais ampla desta técnica em análises de rotina. Além dos erros sistemáticos e aleatórios que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados e o desempenho de método analítico em questão. Porém, estando todos os parâmetros instrumentais devidamente otimizados e se o conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) for adotado, o desempenho analítico da técnica pode ser melhorado. O conceito STPF consiste no uso de tubos de grafite com aquecimento transversal, recoberto piroliticamente e com plataforma; uso de modificadores químicos; aquecimento rápido; fluxo de gás interno interrompido durante a atomização; sinal analítico em absorbância integrada; rápido processamento do sinal e corretor de fundo eficiente (Zeeman).^{38, 39}

Os erros resultantes de alterações nas variáveis instrumentais e/ou operacionais podem ser reduzidos através da padronização interna em GFAAS, minimizando erros sistemáticos e corrigindo efeitos de matriz. Os métodos de adição de padrão e de compatibilização de matriz são bem estabelecidos e conhecidos, porém, a adição de padrão demanda muito tempo nas determinações quando comparada com a calibração externa e a compatibilização de matriz requer diluentes de elevada pureza e de composição química similar a matriz, o que é de difícil obtenção. Sendo assim, a padronização interna é uma alternativa para esses dois métodos de calibração, onde os cálculos são feitos baseados na suposição de que tanto o analito quanto o padrão interno apresentam influência similar à da

matriz e que ambos são perturbados da mesma forma pelas condições instrumentais ou operacionais.^{40, 41}

1.3.2. Atuação dos modificadores químicos na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A utilização de modificadores químicos foi introduzida na espectrometria atômica com atomização eletrotérmica em 1975 por Ediger com o termo “modificador de matriz.”²⁸ Com o decorrer dos anos, o emprego dos modificadores químicos se tornou uma prática comum em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. A sua principal função é diminuir, ou até mesmo eliminar, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra, por meio do aumento da eficiência da etapa de pirólise. O principal objetivo da utilização dos modificadores químicos é permitir altas temperaturas de pirólise. Com uma temperatura de pirólise elevada, é viável a eliminação dos concomitantes, sem com isso, afetar a atomização do analito de interesse. O modificador químico converte o analito em uma forma menos volátil, permitindo maiores temperaturas de pirólise e/ou converte os concomitantes em uma forma mais volátil, promovendo a separação analito-matriz.⁴²

Para um elemento que um elemento químico possa atuar como químico deve apresentar as seguintes:⁴³

- Sua aplicação se deve estender a um grande número de analitos, aumentando a simplicidade e a velocidade analítica na determinação;
- Deve apresentar alta pureza e concentrações não mensuráveis do analito de interesse;
- É desejável, dependendo do tipo de determinação, que o elemento tenha características ou forme compostos refratários;
- Em hipótese alguma deve reduzir o tempo de vida útil do tubo de grafite;
- Próximo ao comprimento de onda do elemento de interesse, o modificador não deve produzir uma atenuação de fundo significativa.

Nos últimos 30 anos vários compostos foram descritos na literatura como modificadores químicos, sendo que dezenas de combinações foram testadas. Compostos inorgânicos contendo metais do grupo da platina (Pt, Pd, Ir, Rh e Ru), contendo níquel e

magnésio e elementos formadores de carbetos (Hf, La, Mo, Nb, Ta, Th, V, W e Zr) e compostos orgânicos como ácido ascórbico, cítrico e tartárico, estão entre os modificadores mais comumente utilizados.⁴⁴ A utilização desses modificadores é feita individualmente ou em mistura de dois ou mais compostos. Várias misturas têm sido propostas como modificadores para ETAAS, no entanto, a mistura mais conhecida e utilizada é a de nitratos de paládio e magnésio, $Mg(OH)_2 + Pd(NO_3)_2$, mistura essa conhecida como modificador universal.⁴⁵

Os modificadores químicos podem ser utilizados de diferentes formas, como por exemplo, na injeção conjunta do modificador e da solução do analito ou como um filme fino depositado na parte interna do tubo de grafite. No último caso, o modificador recebe o nome de modificador permanente, porque permanece retido na parede interna do tubo de grafite após um número considerável de ciclos de aquecimento.⁴⁶

1.3.2.1. Modificadores químicos convencionais

Os modificadores convencionais são utilizados na forma de soluções, sendo adicionados no atomizador junto com a solução que contém o analito de interesse. Outra forma de se utilizar esses modificadores, e depositá-los previamente sobre a superfície grafítica, utilizando as etapas de secagem e pirólise para em seguida introduzir a solução da amostra sobre o modificador. Nos dois casos, os processos são repetidos em cada ciclo de aquecimento, apresentando algumas vantagens e limitações. No primeiro processo é possível obter uma melhor interação do modificador com os analitos, principalmente, quando se analisa amostras com altos teores de matéria orgânica. Este processo, no entanto, necessita que os reagentes apresentem alto grau de pureza e programas de aquecimento mais longos, o que acarreta o desgaste acelerado do tubo de grafite. No segundo processo, as impurezas são eliminadas na etapa de redução dos modificadores, com isso, podem-se utilizar reagentes menos puros (grau analítico p.a).⁴⁷

Considerando um modificador químico convencional, no caso o paládio, Stryls et. al. propuseram um possível mecanismo para estabilização térmica do arsênio e do selênio por esse modificador. Segundo esses pesquisadores, a estabilização térmica do selênio ocorre pela formação de um composto intermetálico Pd-Se-O, que em temperaturas acima de

1280°C se dissociam em átomos livres. Após essa dissociação, o Pd⁰ é adsorvido novamente na superfície do tubo de grafite.^{48, 49}

1.3.2.2. Modificadores permanentes

A modificação permanente de um tubo de grafite fundamenta-as utilização de uma massa maior de metal com elevado ponto de fusão que é depositado na superfície interna do tubo. Os metais utilizados como modificadores permanentes normalmente são àqueles formadores de carbetos e os metais do grupo da platina, com exceção do paládio e do ósmio que apresentam ponto de fusão baixo comparado os demais metais do grupo. As deposições desses modificadores podem ser feitas fisicamente, termicamente ou eletroquimicamente sobre a superfície gráfitica interna do tubo. As principais vantagens desse tipo de modificação são a possibilidade da utilização de reagentes de pureza moderada, o aumento da vida útil do tubo de grafite e a diminuição do tempo total de análise, considerando que o modificador não é injetado a cada ciclo de aquecimento.⁵⁰ Quando se trabalha com análise direta de amostras com teores altos de matéria orgânica, a interação do analito com esses modificadores pode ser dificultada pela formação de uma barreira orgânica de matriz entre o analito e o modificador. A formação do composto intermetálico e a sua interação com o grafite pirolítico do tubo de grafite são comprometidas, sendo estes fatores as principais desvantagens na utilização dos modificadores permanentes.^{51, 52}

Os mecanismos de atuação e funcionamento dos compostos (metais) utilizados como modificadores permanentes, principalmente os metais do grupo da platina, foram propostos a partir do final da década de 90. Contudo, existem inúmeras controvérsias, necessitando-se dessa forma de mais estudos para se chegar a total elucidação desses mecanismos.⁵³

Diversos estudos demonstraram que além da estabilização térmica dos analitos os modificadores podem também exercer uma função catalítica nas reações que ocorrem sobre a superfície do tubo de grafite. No entanto, a massa do modificador, nas condições típicas de ETAAS, diferentemente dos processos de catálise convencionais, é muito maior do que a massa do analito. Alguns trabalhos recentes sugerem proporções para as interações entre os modificadores permanentes e os analitos.^{46, 47, 50, 52, 54}

Os processos que ocorrem no atomizador durante as etapas de secagem, pirólise e atomização, quando se utilizam metias do grupo da platina como modificadores permanentes, são relativamente explicados pelo mecanismo propôs por Volynsky.⁵⁵ No mecanismo proposto por esse pesquisador, o modificador químico é reduzido à forma metálica sobre o carbono e posteriormente age na estabilização térmica do analito. A formação do metal nobre ocorre entre 800 e 1000 °C, podendo ter como precursor o cloreto ou o óxido dos analitos. Após a adsorção dos compostos dos analitos (cloreto ou óxido) sobre o modificador na forma elementar, ocorrem processos de redução desses compostos à forma elementar, com liberação de Cl₂ e/ou CO/CO₂. Em seguida ocorre formação de compostos intermetálicos (Analito-Modificador) e finalmente o processo de atomização do analito, sendo que o modificador nesse estágio pode se encontrar na forma sólida, líquida ou gasosa.^{55, 56}

Em relação à utilização de elementos formadores de carbetos, como modificadores permanentes, sabe-se que esses elementos também podem catalisar reações de redução de óxidos dos analitos.⁴² Esses elementos, particularmente Mo, Nb, Ta, Th, Ti, V, W e Zr, normalmente atuam na forma de carbetos ou óxido-carbetos metálicos. Um possível mecanismo para os processos que ocorrem no atomizador durante os ciclos de aquecimento quando se utilizam esses modificadores, foi também descrito por Volynsk.⁴⁶ Os processos de redução dos óxidos dos analitos podem ocorrer de uma forma homogênea ou heterogênea pelos carbetos desses elementos. Os compostos dos analitos produzidos ficam adsorvidos na superfície metálica do modificador e em seguida são vaporizados dando origem a átomos livres no estado gasoso (processo de atomização). O carbeto do modificador, possivelmente, é regenerado reagindo com o carbono do tubo de grafite, o que provoca o desgaste do tubo e caracteriza a grande limitação na utilização desses modificadores.^{46, 55}

1.3.2.3. Modificadores permanentes com co-injeção de metais do grupo da platina

Quando se compara os modificadores convencionais com os modificadores permanentes, observa-se que os permanentes apresentam algumas vantagens. No entanto, conforme foi descrito anteriormente, quando é necessária a injeção direta da amostra numa

determinação, a interação entre o modificador permanente e o analito fica prejudicada devido a uma barreira causada pelos concomitantes da amostra. Um artifício empregado para resolver, em alguns casos, esse problema, é a co-injeção de solução contendo metais do grupo da platina nos atomizadores recobertos com modificadores permanentes. Este procedimento na maioria das vezes favorece a interação dos analitos com os modificadores, melhorando a estabilidade do analito. Com o aumento da estabilidade do analito, é possível se trabalhar com temperaturas de pirólise mais altas, o que favorece a decomposição térmica dos concomitantes da matriz, e conseqüentemente, consegue-se diminuir consideravelmente os sinais de fundo e se obter melhores limites de detecção.⁵⁷

A utilização do modificador permanente W-Rh acompanhada da co-injeção de solução contendo Rh, tem se mostrado como uma das mais eficientes, principalmente quando os analitos são elementos voláteis, como por exemplo, o selênio. O modificador permanente W-Rh, no caso, proporciona um aumento significativo na vida útil do tubo de grafite e a co-injeção de Rh permite se trabalhar com temperaturas pirólise acima de 1200 °C. Além disso, o Rh co-injetado permite repor possíveis perdas por volatilização, desse elemento depositado junto com o W na parede do tubo de grafite, que pode ocorrer na etapa de limpeza do programa de aquecimento.⁵⁸

1.4. Fundamentos do processo de extração por ultra-som

Ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 20 kHz. Os ultra-sons respondem por uma região do espectro acústico, o qual é subdividido em três regiões principais – a faixa do infra-sons ($v < 20$ Hz); a faixa sons ($20 \text{ Hz} < v < 20 \text{ kHz}$), perceptíveis aos humanos e a faixa dos ultra-sons ($v > 20 \text{ kHz}$). Para os ultra-sons pode ser assumida, ainda, uma subdivisão de faixas: a dos ultra-sons de baixa frequência ($20 \text{ kHz} < v < 1 \text{ MHz}$) e de alta frequência ($v > 1 \text{ MHz}$). As ondas ultra-sônicas de baixas frequências são aquelas que podem apresentar alta potência, enquanto que as ondas ultra-sônicas de alta frequência têm baixa potência, podendo ser aplicadas principalmente para fins de diagnóstico, tanto na medicina como na engenharia. Na extração de nutrientes metálicos são utilizadas ondas ultra-sônicas de baixa frequência

(portanto de alta potência), que levam a alterações químicas e físicas no meio líquido onde são aplicadas.⁵⁹⁻⁶¹

Geradores de ondas ultra-sônicas de baixa frequência são comumente empregados em laboratórios de química e de biologia, seja para a limpeza de materiais ou para o rompimento das paredes celulares. Esses equipamentos usualmente empregam a sonda ultra-sônica.⁶⁰

1.4.1. Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido

Em meio líquido, as ondas ultra-sônicas de alta potência produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação, no qual, dependendo da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação, as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso.⁶¹

Os resultados obtidos em diferentes ensaios realizados com sistemas heterogêneos (líquido-sólido) sob sonificação indicaram que os efeitos dessas ondas acústicas não deveriam ser considerados como um mero e eficaz sistema de agitação, mas sim, relacionados aos jatos de alta velocidade produzidos pela cavitação acústica nas proximidades das superfícies dos metais já que essas ondas mecânicas, ao interagirem com a superfície de sólidos, levam a alterações significativas na morfologia das superfícies dos sólidos. Caso os ultra-sons sejam aplicados em líquidos contendo material particulado em suspensão, as cavidades deixam de ser simétricas de forma que, quando de seu colapso, os microjatos são direcionados para o sólido.⁶²

Porém, a energia resultante da ação direta dos ultra-sons não seria capaz de provocar efeitos como aqueles observados durante a sonificação, como o rompimento de ligações inter e intramoleculares. Estudos realizados com líquidos puros e soluções aquosas demonstraram outras potencialidades da aplicação da energia acústica.⁶³ A influência dos ultra-sons no aumento da reatividade química é devido às evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas ondas em sistemas químicos. A principal causa desses efeitos é

a cavitação que pode ser considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonificação. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio, proporcionando o aumento da temperatura e da pressão na microrregião onde ocorreu o colapso.^{59, 61, 63}

As ondas de ultra-sons têm sido empregadas em diferentes etapas para diversos fins analíticos, como por exemplo: extração sólido-líquido; extração líquido-líquido; separação granulométrica; desgaseificação; degradação de matéria orgânica; co-precipitação e geração de reagentes.⁵⁹⁻⁷³

1.4.2. Ultra-som no preparo de amostras e tratamento de efluentes

A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras e para a descontaminação de efluentes. No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes. No tratamento de efluentes, as elevadas temperaturas e pressões proporcionam a degradação térmica de espécies orgânicas contaminantes, levando à completa mineralização das espécies para tempos prolongados de sonificação.^{64, 65}

As modificações físicas e químicas resultantes da cavitação acústica têm impulsionado novas estratégias de preparo de amostras e, em sistemas heterogêneos, o tratamento é favorecido por alguns fenômenos como: produção de emulsão nas interfaces de sistemas líquido-líquido; lixiviação na superfície em sistemas sólido-líquido; erosão, fragmentação e aumento da área superficial de partículas sólidas em decorrência das ondas de choque originadas da implosão das microbolhas e diminuição do gradiente de concentração pelo aumento do transporte de massa ocasionado pela turbulência e microjatos.^{66, 67}

A redução do tamanho de partícula é um dos benefícios mais notórios da sonificação nos procedimentos de lixiviação e dissolução. Isso porque, muitas reações são limitadas pela área superficial efetiva exposta aos reagentes, resultando em perdas de reprodutibilidade e rendimento da extração do analito. A ruptura das partículas e o conseqüente aumento da área superficial são provocados pelo colapso de microbolhas nos interstícios do sólido ou pelos

violentos choques entre partículas que chegam a alcançar velocidade superior a 500 m s^{-1} , promovendo até a fusão de fragmentos metálicos. Por outro lado, bolhas formadas nas proximidades das partículas tornam-se assimétricas e, ao implodirem, originam microjatos de líquido com velocidade superior a 100 m s^{-1} . Estes jatos são sempre direcionados para a superfície do sólido, resultando na erosão e, conseqüentemente, na renovação da superfície, aumentando a reatividade entre solvente e amostra.⁶⁸

A principal vantagem do ultra-som em extrações reside na diminuição do tempo de processamento e na utilização de soluções diluídas de ácidos minerais. Caso as determinações sejam conduzidas para a obtenção da quantidade total do analito, eventuais modificações na forma original do íon metálico não são consideradas, já que a eficiência de extração de íons metálicos depende da matriz, natureza e concentração da espécie extratora.^{67, 68}

Pérez-Cid et al. empregaram o ultra-som para extrair seqüencialmente Cu, Cr, Ni, Pb e Zn em diferentes frações de lodo obtidas de estações de tratamento de efluentes, conseguindo uma diminuição do tempo de extração de 51 h para 22 min.⁶⁹

Entre as várias outras aplicações dos ultra-sons para as determinações de metais, destacam-se a formação de suspensões para análise direta em sólidos, descontaminação de recipientes para armazenamento de amostras e favorecimento cinético de reações de complexação. Nestas situações, a integridade e identidade das espécies de interesse foram mantidas seguindo o critério de rastreabilidade.⁷⁰

No âmbito da proteção ambiental, a energia ultra-sônica apresenta efeitos interessantes para o tratamento de águas e efluentes aquosos, já que leva à destruição de microorganismos patogênicos e promove a degradação térmica de diferentes classes de poluentes. Adicionalmente, a eficácia do ultra-som na descontaminação de efluentes quanto à presença de microorganismos é atribuída à ruptura das células microbianas, ocasionando o escoamento do líquido citoplasmático.⁷¹

A aplicação de formas não usuais de energia, como as oriundas de ultra-sons de baixa frequência e alta potência, para assistir procedimentos de análise química devem ser consideradas como promissoras. A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo de amostras, bem como para algumas etapas

acessórias ao processamento analítico, como podem ser considerados a geração de reagentes e o tratamento de resíduos de análises químicas.^{72, 73}

Considerando as justificativas e o levantamento bibliográfico são apresentados no capítulo II desta monografia os resultados obtidos na determinação de fósforo por espectrometria no visível de amostras de rações e fezes de peixes utilizando-se o método de extração por ultra-som. No capítulo III são apresentados os resultados obtidos na determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de amostras de pepino, morango, casca de manga e semente de abóbora de cultura orgânica.

2. Referências Bibliográficas

1. MCDOWELL L.R. (1992) Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, New York.
2. SMITH R.M. (1987) Trace elements in human and animal nutrition, Academic Press, New York.
3. HILTON J.W. (1989) The interaction of vitamins, minerals and composition in the diet of fish. *Aquaculture* 79: 223-234.
4. WATANABE T., KIRON V., SATOH S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207.
5. HANLEY F. (1987) The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 66: 163-179.
6. NRC – National Research Council (1993) Nutrient requirements of fish. Washington, D. C.: National Academy Press.
7. HEPHER B. (1998) Nutrition of pond fishes. Cambridge University Press, New York.
8. SULLIVAN J.A., REIGH R.C. (1995) Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). *Aquaculture* 138: 313-322.

9. AUSTRENG E. (1978) Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13: 265-272.
10. RINGO E. (1993) The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal micro flora of sea water-reared Arctic char (*Salvinus alpinus*). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 31-34.
11. DE LA NOUE J., CHOUBERT G. (1986) Digestibility in rainbow trout: Comparison of the direct and indirect methods of measurement. *The Progressive Fish-Culturist*, Bethesda 48: 190-195.
12. SILVA S.S., PEREIRA K.M. (1984) Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry effect of dietary levels and salinity with further observation of variability digestibility. *Aquaculture* 38: 293-306.
13. SHAHAT T.M. (1993) Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. *Veterinary Medical, Journal Giza, Cairo* 41(3): 83-91.
14. SILVA F.A., PADILHA C.C.F., BARROS M.M., PEZZATO L.E., PADILHA P.M. (2006) Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69(4): 1025-1030.
15. SILVA F.A., NEVES R.C.F., QUINTERO-PINTO L.G., PADILHA C.C.F., JORGE S.M.A., BARROS M.M., PEZZATO L.E., PADILHA P.M. (2007) *Chemosphere* 68(8): 1542-1547.
16. MALAVOLTA E. (1976) *Manual de química agrícola: Nutrição de plantas e fertilidade do solo*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres.
17. KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. (1984) *Trace elements in soil and plants*. Boca Raton: CRC Press.
18. LESCHBER R., DAVIES R.D., L'HERMITE P. (1985) *Chemical methods for assessing bioavailability metals in sludge and soils*. London: Elsevier.
19. LINDSAY W.L., NORWEL W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421-428.

20. MALVOLTA E., VITTI G.C., OLIVEIRA S.A. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2ed. Piracicaba: Potafos.
21. OLIVEIRA F.C. (1995) Metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com lodo de esgoto. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
22. OLIVEIRA F.C. (2000) Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo num Latossolo Vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
23. VAN RAIJ B., QUAGGIO J.A. (2003) Métodos de análise de solo para fins de fertilidade. Instituto Agronômico, Campinas, Boletim Técnico.
24. ROCA J., POMARES F. (1991) Prediction of available heavy metals by six chemical extractants a sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 22: 2129-2136.
25. SARRUGE J.R., HAAG H.P. (1974) Análises químicas em plantas. Piracicaba: ESALQ.
26. WILLIAMS M.H. (2005) Nutrição para saúde, condicionamento físico e desempenho esportivo. 5ed. Manole.
27. KATCH F.I., MCARDLE W.D. (1996) Nutrição, exercício e saúde. 4ed. Medsi: RJ.
28. KRUG F.J., NÓBREGA J.A., OLIVEIRA P.V. (2004) Espectrometria de Absorção Atômica – Parte 1 – Fundamentos e Atomização com Chama. In: *Disciplina de Pós-Graduação Espectrometria de Absorção Atômica*, ESALQ.
29. RICHARD D.B., JACK D.K. (1993) Concepts, Instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry. The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA.
30. WELZ B., SPERLING M. (1999) Atomic Absorption Spectrometry. 3ed. VCH, Weinheim.
31. LAJUNEN L.H.J. (1992) Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
32. JENNISS S.W., KATZ S.A., LYNCH R.W. (1997) Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring. 2ed. Wiley-VCH, New York.

33. BUTCHER D.J., SNEDDON J. (1998) A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry. New York: John Wiley & Sons.
34. JACKSON K.W. (1999) Eletrothermal atomization for analytical atomic spectrometry. Chichester: John Wiley.
35. SAINT'PIERRE T.D. (2004) Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais traço em álcool combustível e gasolina por espectrometrias de absorção atômica e de massa com plasma indutivamente acoplado. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
36. SKOOG D.A., HOLLER F.J., NIEMAN T.A. (1998) Principles of instrumental analysis. 5 ed. New York: Saunders College.
37. PERKIN E. (1991) Recommended conditions for THGA furnaces. Uberlinguer.
38. OLIVEIRA A.P., GOMES NETO J.A., NÓBREGA J.A., CORREIA P.R.M., OLIVEIRA P.V. (2005) Determination of selenium in nutritionally relevant foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry using arsenic as internal standart. Food Chemistry 93(2): 355-360.
39. FERNANDES K.G., MORAES M., GOMES NETO J.A., NÓBREGA J.A., OLIVEIRA P.V. (2002) Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the determination of lead in wines by simultaneous eletrothermal atomic absorption spectrometry. Analyst 127(1): 157-162.
40. RADZIUK B., ROMANOVA N., THOMASSEN Y. (1999) Evaluation of internal standardization in eletrothermal atomic absorption spectrometry. Analytical Communication 36(1): 13-16.
41. TAKADA T., NAKANO K. (1979) Evaluation and application of internal standardization in atomic absorption spectrometry with eletrothermal atomization. Analytica Chimica Acta 107(1): 129-138.
42. OLIVEIRA A.P., GOMES NETO J.A., FERREIRA M.M.C. (2006) Uso da análise exploratória de dados na avaliação de modificadores químicos para determinação direta e simultânea de metais em álcool combustível por GFAAS. Eclética Química 31(1): 7-12.

43. VOLYNSKY A. (1998) Investigation of the mechanisms of the action of chemical modifiers for electrothermal atomic absorption spectrometry: what for and how? *Spectrochimica Acta, Part B* 53: 139-149.
44. TSALEV D.L., SLAVEYKOVA V.I., LAMPUGNANI L., D'ULIVO A., GEORGIEVA R. (2000) Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry – advances, anticipations and reality. *Spectrochimica Acta, Part B* 55: 473-490.
45. SHIUE M.Y., MIERZWA J., YANG M.H. (2001) Mechanism of the action of palladium and palladium–magnesium nitrate modifiers used in the determination of tellurium by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16: 1172-1179.
46. VOLYNSKY A.B. (2000) Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 55: 103-150.
47. VOLYNSKY A.B., TIKHOMIROV S., ELAGIN A. (1991) Proposed mechanism for the action of palladium and nickel modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* 116: 145-148.
48. STYRIS D.L., PRELL L.J., REDFIELD D.A. (1991) Mechanisms of palladium-induced stabilization of arsenic in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 63(5): 503-507.
49. STYRIS D.L., PRELL L.J., REDFIELD D.A., HOLCOMBE J.A., BASS D.A., MAJID V. (1991) Mechanisms of selenium vaporization with palladium modifiers using electrothermal atomization and mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* 63(5): 508-517.
50. VOLYNSKY A.B. (1998) Application of graphite tubes modified with high-melting carbides in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 53: 509-535.
51. MORENO R.G., OLIVEIRA E., OLIVEIRA P.V., PEDROTTI J.J. (2001) Uma célula eletroquímica de fluxo para modificação permanente de tubo de grafite empregado em absorção atômica. *Química Nova* 24(3): 404-407.

52. BULSKA E., THYBUSCH B., ORTNER H.M. (2001) Surface and subsurface examination of graphite furnace tubes after electrodeposition of noble metals for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 56: 363-373.
53. ORTNER H.M., BULSKA E., ROHR U., SCHLEMMER G., WEINBRUCH S., WELS B. (2002) Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry-mechanisms of action. *Spectrochimica Acta, Part B* 57: 1835-1853.
54. VOLYNSKY A.B. (2004) Chemical modifiers based on platinum-group metal compounds in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 59(6): 502-520.
55. VOLYNSKY A.B. (1996) Catalytic processes in graphite furnace for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 51: 1573-1589.
56. ALVAREZ M.A., CARRIÓN N., GUTIÉRREZ H. (1996) Effects of atomization surfaces and modifiers of the kinetics of copper atomization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 51: 1121-1132.
57. BARBOSA F., SOUZA S.S., SANTOS D., KRUG F.J. (2004) Evaluation of electrodeposited tungsten chemical modifier for direct determination of chromium in urine by ETAAS. *Microchemical Journal* 78(1): 7-13.
58. ZANÃO R.A., BARBOSA F., SOUZA S.S., KRUG F.J., ABDALA A.L. (2002) Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W-Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer. *Spectrochimica Acta, Part B* 57: 291-301.
59. MILLER-IHLI N.I. (1993) Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 345: 482-489.
60. KORN M., PEREIRA M.G., BORGES S.S. (2005) Algumas aplicações analíticas do ultra-som. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 96: 51-56.
61. MASON T.J., LORIMER J.P. (1988) *Sonochemistry: Theory, Applications and Users of Ultrasound in Chemistry*. Ellis Horwood Limited, Chichester, UK.

62. PÉREZ-CID B., LAVILLA I., BENDICHO C. (1998) Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Analytica Chimica Acta* 360: 35-41.
63. FRANCONY A., PÉTRIER C. (1996) Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry* 3: S77-S82.
64. NASCENTES C.C., KORN M., ARRUDA M.A.Z. (2001) A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* 69: 37-43.
65. RUIZ-JIMÉNEZ J., LUQUE-GARCÍA J.L., LUQUE DE CASTRO M.D. (2003) Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480: 231-237.
66. FILGUEIRAS A.V., CAPELO J.L., LAVILLA I., BENDICHO C. (2000) Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 53: 433-441.
67. SHIOWATANA J., TANTIDANAI N., NOOKABKAEW S., NACAPRICHA D. (2001) A flow system for the determination of metal speciation in soil by sequential extraction. *Environment International* 26(5): 381-387.
68. MEEGODA J.N., PERERA R. (2001) Ultrasound to decontaminate metals in dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials* 59: 1-17.
69. ASHLEY K. (1998) Ultrasonic extraction of heavy metals from environmental and industrial hygiene samples for their subsequent determination. *TrAC Trends Analytical Chemistry* 17(6): 366-372.
70. LUQUE-GARCÍA J.L., LUQUE DE CASTRO M.D. (2003) Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22(2): 90-98.
71. PINO V., AYALA J.H., AFONSO A.M., GONZÁLEZ V. (2001) Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments. *Talanta* 54: 15-23.

72. KRUG F.J. (2003) Methods of Sample Decomposition, In: IV Workshop on Sample Preparation, Salvador-Brazil.

73. SUSLICK K.S., DIDENKO Y., FANG M.M., HYEON T., KOLBECK K.J., MCNAMARA W.B., MDLELENI M.M., WONG M. (1999) Acoustic cavitation and its chemical consequences. Philosophical Transactions of the Royal Society A 357: 335-353.

Capítulo – II

DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO BIODISPONÍVEL EM RAÇÕES DE PEIXES UTILIZANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRA-SOM E ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e otimizar um método para determinação de fósforo biodisponível em amostras de fezes e rações de peixes utilizando extração por ultra-som e posterior quantificação por espectrofotometria visível. Utilizando como solução extratora HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, as condições ótimas de extração estabelecidas foram: massa da amostra - 100 mg; granulometria de amostras - $< 60 \mu\text{m}$; tempo de sonificação - cinco ciclos de 40 s; e potência de ultra-som - 136 W. O método proposto foi aplicado em estudos de digestibilidade desse nutriente em diferentes rações utilizadas nas dietas de juvenis de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: *extração por ultra-som; nutrição de peixes; absorção de fósforo.*

1. Introdução

Os tecidos corporais dos animais possuem elementos químicos em proporções e quantidades variáveis. Neste contexto, os minerais são componentes essenciais ao metabolismo, refletindo na maior ou menor produtividade do animal. ¹ Dois a cinco por cento do corpo do animal é constituído pela fração mineral, que varia em função da espécie, da raça e do próprio indivíduo.^{2,3} O fósforo é classificado como um macromineral, ou seja, mineral que o organismo necessita em grandes quantidades e ainda, apresenta função estrutural, porque é parte integrante dos ossos, dentes e de algumas proteínas musculares. ¹⁻³

Os minerais podem interagir entre si, com outros nutrientes e também com alguns fatores não nutritivos da dieta. A interação do tipo sinérgica ou antagônica poderá ocorrer na própria dieta e durante o metabolismo no trato digestivo. O conhecimento dessas interações assume importância fundamental para a correção das deficiências minerais causadas

principalmente pelos desequilíbrios entre os elementos constituintes da dieta. No aspecto sinérgico, o fósforo pode ser citado como participante do processo intermediário da formação da parede intestinal, na atividade das enzimas digestivas e na formação dos ossos.

⁴ Na interação do tipo antagônica, em nível gastrintestinal, o fósforo pode inibir a absorção de outros elementos devido à formação de complexos, como por exemplo, ferro-fitatos e desencadear efeitos opostos sobre os ciclos bioquímicos no organismo. ^{5,6}

Em decorrência à sua essencialidade para o crescimento e para o metabolismo dos lipídios, o fósforo é o mineral de maior importância na nutrição animal. A maior quantidade de fósforo a ser metabolizado vem da dieta, enquanto que nos alimentos de origem vegetal, este mineral se apresenta em grande parte na forma indisponível. Sua exigência na nutrição de peixes é dependente das características anatomofisiológicas do sistema digestório da espécie criada e da fonte desse mineral, sendo que na fonte alimentar, este elemento pode se apresentar na forma de fósforo orgânico como fitatos, fosfolipídios e fosfoproteínas e na forma inorgânica, como monofosfatos, bifosfatos e trifosfatos, solúveis ou não, no suco gástrico dos peixes. ⁷⁻¹⁰

A maior parte do fósforo presente nos ingredientes de origem vegetal, com destaque aos cereais, que são os principais componentes das formulações de rações, está na forma de fitato. Por isso, considera-se que apenas 30% do fósforo dos vegetais esteja disponível para não-ruminantes (monogástricos).⁷ A disponibilidade deve-se à quantidade de fósforo preso à molécula de ácido fítico ou simplesmente fitato. O fitato pode formar complexos do tipo quelato com íons metálicos como, por exemplo, ferro, cobre, zinco e manganês. O que além de deixar indisponível o fósforo e alguns nutrientes metálicos, interfere também na absorção de aminoácidos e pode inibir a atividade de várias enzimas digestivas endógenas, como a tripsina, pepsina e a amilase. ^{7, 11, 12}

Estudos da biodisponibilidade do fósforo na nutrição animal buscam interpretar dados que melhorem a absorção deste mineral em fontes alimentares que apresentem fósforo fítico. Com a melhor absorção desse nutriente, é possível eliminar efeitos negativos de fatores anti-nutricionais que resultam em crescimento reduzido, baixa conversão alimentar, alterações hormonais e, em casos extremos, lesões nos órgãos. Além disso, favorece a diminuição da poluição ambiental devido à excreção fecal de fosfatos não absorvidos que

permanecem na água de cultivo, cujo descarte é feito nos mananciais hídricos, o que contribui significativamente no processo de eutrofização do sistema aquático.¹³

Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a extração e a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos, para posterior determinação do coeficiente de biodisponibilidade aparente desses nutrientes nos estudos de nutrição animal, torna-se fundamental. Neste contexto, a extração do analito por ultra-sonificação, apresenta-se como técnica bastante robusta.¹⁴⁻¹⁸ Os efeitos químicos provocados pelos ultra-sons ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência (< 1 MHz). A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras.^{15,18} No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes ou completa mineralização no caso de compostos orgânicos.¹⁶⁻¹⁸ Assim, a utilização da extração de nutrientes metálicos de amostras biológicas por ultra-sonificação permite a eliminação da mineralização ácida, que pela metodologia clássica, constitui-se no principal problema.^{19,20}

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de fósforo biodisponível de amostras de rações de peixes utilizando extração por ultra-som e quantificação por espectrofotometria no visível, permitindo assim, a estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente desse nutriente em algumas fontes alimentares utilizadas na piscicultura.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic, ácido nítrico e clorídrico (Merck) de grau analítico foram utilizados no preparo das soluções extratoras. As soluções padrão de fósforo foram preparadas por diluições de padrão

titrisol Merck e dos concomitantes foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico, todos Merck. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e as cubetas do espectrofotômetro foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 h, em seguida, com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da utilização.

2.2. Coleta e preparo das amostras

As amostras de fezes de peixes foram coletadas após experimentos de digestibilidade envolvendo juvenis de tilápia do Nilo que foram submetidos a uma dieta com diferentes fontes alimentares. Esses experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Nutrição de Peixes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, Campus de Botucatu.

Depois de coletadas, as amostras de rações de peixes foram desidratadas em estufa de recirculação forçada de ar por 48 h e submetidas à moagem criogênica. Para isso, uma massa de aproximadamente 1,0 g da amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com a barra magnética, o qual devidamente fechado foi imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante ($20 \text{ impactos s}^{-1}$) a amostra foi pulverizada. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu uma primeira etapa de 2 min para o pré-congelamento, 1 min de pulverização, novamente 1 min de congelamento e uma segunda etapa que compreendeu dois ciclos com dois estágios de pulverização e congelamento, perfazendo um tempo total de 8 min. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que $60 \mu\text{m}$.²¹

2.3. Instrumentação

Estufa de circulação forçada de ar TECNAL modelo TE – 394/1.

A moagem das amostras foi feita em moinho criogênico SPEX – Freezer, modelo Mill 6750.

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE equipado com sonda de titânio de 3 mm foi utilizado no processo de extração o fósforo das amostras de fezes e rações de peixes.

Forno de Microondas Provecto Analítica (Campinas-SP) modelo DGT 100 plus foi utilizado para mineralização das amostras.

A determinação de fósforo foi feita utilizando espectrofotômetro “GENESYS”™ modelo 6.

2.4. Extração do fósforo

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostra e 20 mL de solução de ácido clorídrico e/ou nítrico foram transferidas para frascos de teflon de 50 mL. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som para extração do fósforo. Adotando este procedimento foram avaliados diferentes concentrações das soluções ácidas e diferentes tempos de sonificação e potências do ultra-som no processo de extração do analito. Os extratos ácidos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação, para posterior determinação da concentração de fósforo.

Outra parte das amostras foi também mineralizada em forno de microondas. Para isso, massas de 100 mg de amostras moídas criogenicamente foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,50 mL de ácido nítrico 14 mol L⁻¹, 0,50 mL de ácido perclórico 10 mol L⁻¹ e 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado foi o descrito no manual do fabricante do equipamento com algumas modificações.^{19, 20} Este procedimento foi utilizado também na digestão dos extratos ácidos obtidos no processo de extração por ultra-som, utilizando-se no caso volumes de 3,00 mL dos extratos, 1,50 mL de ácido nítrico concentrado 0,50 mL de ácido perclórico 12 mol L⁻¹ e 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m.

2.5. Determinação de fósforo nas amostras de ração e fezes de peixes

A determinação de fósforo foi feita utilizando-se o método espectrofotométrico do ácido vanadomolibdicofosfórico. Esse método fundamenta-se na reação de íons ortofosfato, em meio ácido, com íons molibdato e vanadato com conseqüente formação de um heteropoliácido complexo de cor amarela. Tal complexo absorve radiação visível em 420

nm, comprimento de onda correspondente à cor violeta, complementar da cor verde amarelado. A intensidade de radiação absorvida pelo heteropoliácido complexo é proporcional à quantidade de ortofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) e/ou fósforo presente nos extratos ácidos.²²

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização do tempo e da potência de sonificação no processo de extração dos analitos metálicos

A eficiência do processo de extração por ultra-som de fósforo das amostras de rações e fezes foi avaliada variando as concentrações das soluções ácidas extratoras, o tempo de extração e a potência ultra-sônica. Na etapa de moagem da amostra procurou-se obter a menor granulometria possível, o que favorece a homogeneidade do analito no material sólido e evita possíveis erros associados à representatividade da amostra. Nessa etapa também foi evitada a manipulação excessiva das amostras, procurando assim, evitar possíveis fontes de contaminação. A quantidade de material sólido pesado (100 mg) foi feita considerando a concentração do nutriente na formulação da ração. O efeito da concentração do ácido clorídrico e nítrico no processo de extração do fósforo foi avaliado na faixa de 0,10 a 1,00 mol L⁻¹, medindo o sinal de absorvância nos extratos ácidos obtidos com cada uma dessas soluções, após a reação com o agente cromogênico. Observou-se que o maior sinal de absorvância foi obtido utilizando ácido nítrico 0,50 mol L⁻¹ (Figura 1). Dessa forma, essa solução extratora foi utilizada em todos os demais experimentos.

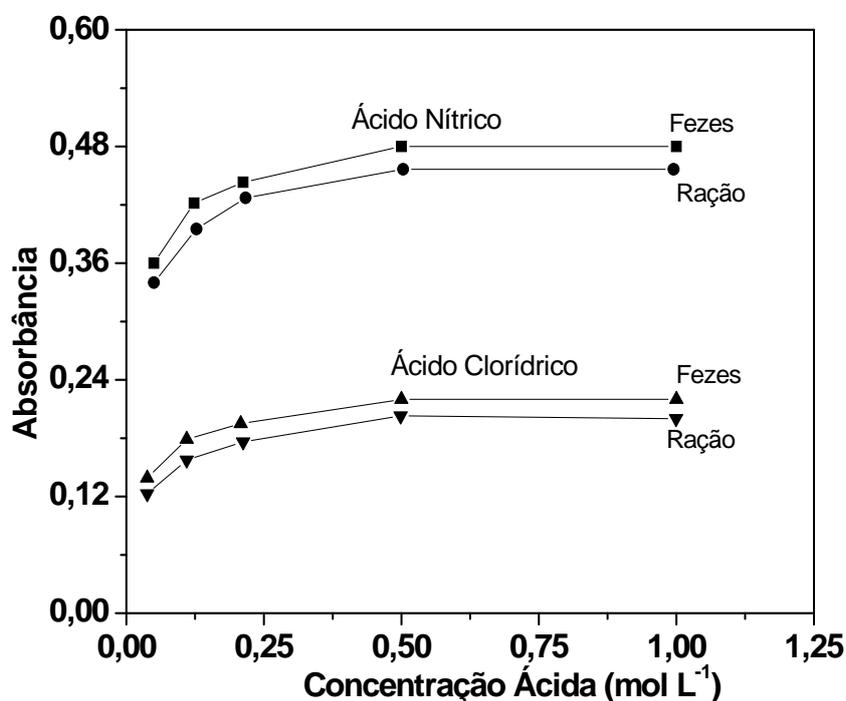


Figura 1. Influência da concentração das soluções de ácido clorídrico e nítrico no processo de extração de fósforo de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 40s; Potência utilizada – 136 W.

Conforme já discutido, as ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos da matriz devido à atuação dessas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, destruindo-as e provocando a quebra da ligação do analito com essas moléculas.¹⁴⁻¹⁸ Assim, foram feitos experimentos de otimização do tempo e da potência de sonificação no processo de extração do fósforo das amostras de frações e fezes, utilizando ácido nítrico 0,50 mol L⁻¹ como solução extratora. As Figuras 2 e 3 mostram os resultados obtidos nesses experimentos.

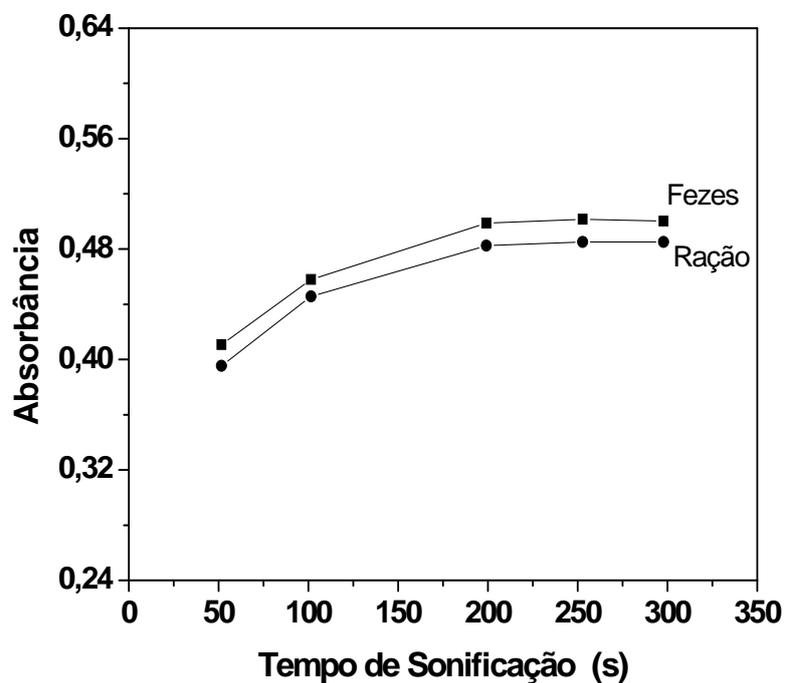


Figura 2. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de fósforo de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 40, 50 e 60 s; Potência utilizada – 136 W; Solução Extratora – Ácido nítrico 0,50 mol L⁻¹.

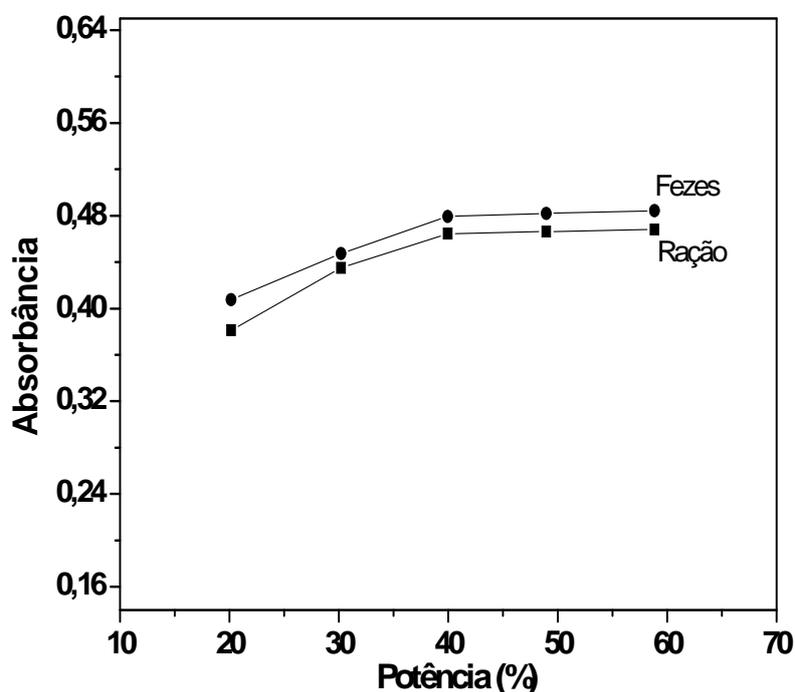


Figura 3. Influência da potência de sonificação no processo de extração de fósforo de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação - 5 ciclos de 40 s; Potência utilizada - 20, 30, 40, 50 e 60% da potência total do equipamento (340 W); Solução Extratora - Ácido nítrico $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

O aumento do tempo de sonificação provoca o aumento da temperatura do meio extrator. Normalmente, observa-se que numa temperatura em torno de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a eficiência de extração é favorecida devido ao aumento do número de núcleos de cavitação acústica formada nas proximidades da superfície da fase sólida da suspensão (sistema sólido-líquido).²³ No entanto, quando a temperatura do meio extrator se aproxima da temperatura de ebulição da fase líquida, ocorre um decréscimo na eficiência da sonificação devido à diminuição da tensão superficial do meio e aumento da pressão de vapor dentro das microbolhas, o que provoca uma diminuição nas ondas de choque.²⁴ Existe, dessa forma, um tempo considerado ótimo de sonificação no processo de extração do analito de uma amostra sólida. Nesse tempo ocorre a cavitação acústica ou o ciclo de formação, crescimento e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas. Após o colapso das bolhas de cavitação, ocorre a liberação de grande quantidade de energia na

microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando assim, a extração do analito e em alguns casos, até a dissolução do material sólido.²⁵ Analisando os gráficos apresentados na Figura 2, observa-se que a partir de 5 ciclos de 40 s de agitação ultra-sônica (200 s no total), os sinais de absorbância medidos permaneceram praticamente constantes, sendo que a temperatura medida no sistema sólido-líquido foi de 66 °C. Dessa forma, este tempo foi considerado eficiente no processo de extração dos analitos metálicos.

A intensidade do ultra-som transmitida ao meio está diretamente relacionada à amplitude da vibração da ponta do sonotrodo. Geralmente, um aumento na intensidade da potência favorecerá um aumento nos efeitos químicos provocados pela sonificação. Quando se utiliza amplitude vibracional muito elevada, um grande número de bolhas de cavitação são geradas na solução, o que pode desfavorecer o crescimento e o colapso dessas bolhas, tendo como consequência, uma diminuição da energia liberada através da fase líquida.^{17, 18, 24} A eficiência da extração do fósforo, conforme mostra a Figura 3, aumenta com amplitude crescente de 20 a 30% (68 a 102 W), permanecendo constante para os valores mais elevados de amplitude. Os resultados obtidos indicaram que a eficiência máxima do processo de extração foi conseguida na escala de amplitude 40 a 60% (136 a 204 W) de potência. Optou-se então por utilizar a amplitude de 136 W de potência em todos os demais experimentos, pelo fato dessa potência provocar um menor aumento de temperatura da solução extratora (66 °C) contra, respectivamente, 74 e 82 °C para as amplitudes de 170 W e 204 W de potência.

3.2. Figuras de mérito do método de extração proposto

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos (concentração da solução extratora, tempo e potência de agitação ultra-sônica), a exatidão e a precisão do método de extração foram testadas utilizando ensaios de recuperação de fósforo de amostras de rações e fezes de peixes. Também foram feitas determinações em amostra de padrão de ração certificado. Os resultados dessas determinações são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de fósforo em amostras de rações e fezes de peixes, utilizando-se extração por ultra-som e mineralização em forno de microondas (n = 5).

Rações	Extração por sonificação (mg kg ⁻¹)	Extração por mineralização (mg kg ⁻¹)	Extrato ultra-sônico digerido (mg kg ⁻¹)
Ração ₁	992±21	1091±25	1080±14
Ração ₂	997±23	1095±28	1073±12
Fezes ₁	1345±31	1896±42	1857±21
Fezes ₂	1482±35	2062±51	2015±25
Ração Certificada*	170±2,12	172±2,21	170±3,60

*Corn Bran, RM 8433 – National Institute of Standards and Technology. Valor certificado = 171±11 mg kg⁻¹.

Analisando-se os resultados obtidos utilizando a extração por ultra-som e a mineralização das amostras (Tabela 1), observa-se que em ambas as metodologias os desvios-padrão relativos calculados foram menores que 3%, mostrando que estas apresentaram boa precisão (repetibilidade entre as medidas). No entanto, os resultados obtidos utilizando a extração por ultra-som apresentaram valores cerca de 10% menores para as amostras de ração e cerca de 40% menores para as amostras de fezes, quando comparados com as porcentagens de fósforo determinadas utilizando a mineralização ácida no processo de extração. Essas diferenças possivelmente estão relacionadas ao fósforo fítico presente nas amostras de rações e fezes, que no processo de ultra-sonificação não é extraído na forma de dihidrogenofosfato para a reação com os íons vanadato e molibdato²² – reação utilizada na determinação do analito conforme descrito anteriormente. Para confirmar essa hipótese foram feitas determinações de fósforo nos extratos obtidos da extração por ultra-som procedendo-se a digestão ácida desses em forno de microondas. Os resultados obtidos (Tabela 1) indicam que após a digestão em forno de microondas dos extratos obtidos por sonificação, houve um aumento nas concentrações de fósforo, que apresentaram valores cerca de 2% menores em relação às concentrações determinadas nos extratos obtidos por digestão direta das amostras, o que reforça a hipótese da fração de fósforo fítico não ser mineralizada no processo de extração por ultra-som. Em relação aos resultados determinados para a ração certificada, mostrados na Tabela 1, observa-se que além dos valores apresentarem desvios-padrão relativos menores que 2%, o que caracteriza uma boa

repetibilidade entre os resultados, também estão bem próximos dos valores certificados, comprovando assim a exatidão do método de extração proposto.

3.3. Aplicação do método

O método de extração proposto foi aplicado em determinações de rotina de fósforo, para posterior cálculo dos coeficientes de digestibilidade desse nutriente em quatro fontes alimentares utilizadas na dieta de juvenis de tilápia do Nilo. Os resultados dessas determinações foram comparados com os resultados obtidos utilizando a mineralização ácida das amostras em forno de microondas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Concentração de fósforo em amostras de rações preparadas a partir de quatro fontes alimentares utilizadas na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (n = 5).

Fontes Alimentares	Concentração de Fósforo (mg kg ⁻¹)	
	Sonificado	Mineralizado
Ração ₁	1162±23	1289±25
Ração ₂	1140±21	1260±26
Ração ₃	1152±20	1267±27
Ração ₄	1090±19	1210±24

Ração₁ – preparada a partir de Levedura; Ração₂ – preparada a partir de Milho; Ração₃ – preparada a partir de Farelo de Soja; Ração₄ – preparada a partir de Farelo de Arroz.

Tabela 3. Concentração de fósforo em amostras de fezes de juvenis de tilápia do Nilo (n=5).

Amostras de Fezes	Concentração de Fósforo (mg kg ⁻¹)	
	Sonificado	Mineralizado
Amostra ₁	1417±29	2568±52
Amostra ₂	1400±27	2450±49
Amostra ₃	1405±25	2459±51
Amostra ₄	1370±23	2500±46

Amostra₁ – fezes de peixes alimentados com a Ração₁; Amostra₂ – fezes de peixes alimentados com a Ração₂; Amostra₃ – fezes de peixes alimentados com a Ração₃; Amostra₄ – fezes de peixes alimentados com a Ração₄.

Com base nos valores das porcentagens de fósforo determinados nas amostras de rações e fezes dos animais em estudo, após a conversão dos dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 e na determinação da porcentagem de óxido de crômio (marcador biológico utilizado em estudos de digestibilidade de nutrientes na nutrição animal, determinado conforme procedimento descrito por Silva et al.)¹⁹, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (*Da*) do fósforo na dieta, a qual foi fornecida a juvenis de tilápia do Nilo, utilizando a equação 1.²⁶⁻²⁸

$$Da = 100 - 100 \left[\left(\frac{\%Cr_2O_3r}{\%Cr_2O_3f} \right) \times \left(\frac{\%Nf}{\%Nr} \right) \right] \quad (1)$$

Onde, *Da* = Coeficiente de Digestibilidade Aparente; %Cr₂O₃r = Porcentagem de óxido de crômio na ração; %Cr₂O₃f = Porcentagem de óxido de crômio nas fezes; %Nr = Porcentagem do nutriente na ração e %Nf = Porcentagem do nutriente nas fezes.

Os valores dos *Da*, calculados a partir dos resultados das determinações de fósforo utilizando o método de extração por ultra-som e a mineralização das amostras em forno de microondas, estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Coeficiente de digestibilidade aparente do fósforo das quatro rações utilizadas na dieta de juvenis de Tilápia do Nilo.

Fontes Alimentares	Coeficiente de Digestibilidade Aparente – <i>Da</i> (%)	
	Sonificado	Mineralizado
Ração ₁	58,54±1,20	32,26±0,65
Ração ₂	58,24±1,12	33,88±0,71
Ração ₃	58,53±1,04	34,01±0,71
Ração ₄	57,27±0,96	29,75±0,55

Ração₁ – preparada a partir de Levedura; Ração₂ – preparada a partir de Milho; Ração₃ – preparada a partir de Farelo de Soja; Ração₄ – preparada a partir de Farelo de Arroz.

Comparando-se os valores dos *Da* do fósforo presentes nas quatro rações utilizadas na dieta de juvenis de tilápia do Nilo apresentados na Tabela 4, observa-se que os *Da* obtidos utilizando o teor de fósforo total (amostras mineralizadas), apresentaram valores entre 24-27% menores que os obtidos considerando as porcentagens de fósforo determinadas utilizando ultra-som no processo de extração do analito. As rações utilizadas na dieta dos peixes foram preparadas a partir de fontes alimentares de origem vegetal, essas fontes alimentares apresentam de 50 a 95% do teor total de fósforo na forma de ácido fítico (hexafosfato de inositol). Os peixes não apresentam a enzima fitase endógena que promove a hidrólise da ligação éster entre o fosfato e a molécula de inositol, disponibilizando assim o fósforo presente na molécula do ácido fítico.^{26, 29-32} Como o método de extração por ultra-som não mineraliza a fração fítica, os *Da* calculados utilizando esse método de extração são maiores porque na relação %Nf/%Nr foram computadas somente as frações de fósforo disponível nas rações, ou seja, as frações extraídas na forma de dihidrogefosfato. Dessa forma, pode-se inferir que a extração por ultra-som possibilita a obtenção de resultados de digestibilidade de fósforo mais coerentes com a necessidade de absorção deste nutriente pela espécie tilápia do Nilo, considerando que esses são concordantes com os resultados obtidos por pesquisadores que utilizaram a suplementação da enzima fitase em alimentos vegetais para disponibilizar o fósforo fítico.³³⁻³⁵

4. Conclusões

O método proposto de extração de fósforo por ultra-som permitiu calcular os coeficientes de digestibilidade (*Da*) desse nutriente em quatro amostras de rações utilizadas na dieta de juvenis de tilápia do Nilo. Como nesse processo de extração não ocorre a mineralização da fração de fósforo na forma de fitato, é possível obter o teor biodisponível desse nutriente, o que permite a estimativa de *Da* que caracterizam a absorção do fósforo da dieta a qual os peixes foram submetidos. De uma forma geral, deve-se destacar que a metodologia proposta diminuiu consideravelmente o tempo de análise, o que favoreceu a velocidade analítica. Outro fato a ser destacado, é que no método de extração por ultra-som o óxido crômico que é adicionado nas rações como indicador biológico inerte^{19, 20} não é

solubilizado e, conseqüentemente o crômio(III) não é oxidado a dicromato, espécie química extremamente tóxica, formada no processo de mineralização nítrica/perclórica das amostras.

Agradecimentos

À FAPESP (Processos 03/13362-6 e 06/51556-5) e ao CNPq (Processos 474371/2007-7 e 301123/2005-5), pelo suporte financeiro.

5. Referências Bibliográficas

1. MCDOWELL L.R. (1992) Minerals in Animal and Human Nutrition, Academic Press: London.
2. SOLOMONS N.W. (1992) Absorption and Malabsorption of Mineral Nutrients, Alan R. Liss: New York.
3. SMITH R.M. (1987) Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academic Press: New York.
4. TACON A.G.J. (1990) Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. The essential Nutrients, v.1, Argent Laboratories Press: Washington.
5. HILTON J.W. (1989) The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture* 79: 223-244.
6. LOVELL T. (1989) Nutrition and Feeding of Fish, Van Nostrand Reinhold: New York.
7. NRC (National Research Council) (1993) Nutrient Requirements of Fish, National Academy Press: Washington D.C.
8. STEFFENS W. (1987) Principios Fundamentales de la Alimentación de los Peces, Acribia: Zaragoza.

9. VIELMA J., LALL S.P., KOSKELA J., SCHONER F.J., MATTILA P. (1998) Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 163: 309-323.
10. PIZZOLANTE C.C. (2000) Estabilidade da fitase e sua utilização em frangos de corte. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Brasil.
11. KIES A.K. (1996) Phytase: Mode of Action. In: *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*, BASF Corporation: New Jersey.
12. SELLE P.H. (1997) The potential of Microbial Phytase for the Sustainable Production of Pigs and Poultry: an Australian Perspective. *Sevent Short Course on Feed Techonology*, Korean Society of Animal Nutrition and Feedstuffs: Ansong.
13. GONÇALVES G.S., PEZZATO L.E., BARROS M.M., HISANO H., FREIRE E.S., FERRARI J.E.C. (2004) Digestibilidade aparente e suplementação de fitase em alimentos vegetais para tilápia-do-nilo. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 26: 313-321.
14. MASON T.J., LORIMER J.P. (1988) *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry*, Ellis Horwood: New York.
15. FRANCONY A., PÉTRIER C. (1996) Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry* 3: S77-S82.
16. NASCENTES C.C., KORN M., ARRUDA M.A.Z. (2001) A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* 69: 37-43.
17. RUIZ-JIMÉNEZ J., LUQUE-GARCÍA J.L., LUQUE DE CASTRO M.D. (2003) Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480(2): 231-237.
18. KORN M., PEREIRA M.G., BORGES S.S. (2005) Algumas Aplicações Analíticas do Ultra-som. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 96: 51-56.
19. SILVA F.A., PADILHA C.C.F., PEZZATO L.E., BARROS M.M., PADILHA P.M. (2006) Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69: 1025-1030.

20. SILVA F.A., NEVES R.C.F., QUINTERO-PINTO L.G., PADILHA C.C.F., JORGE S.M.A., BARROS M.M., PEZZATO L.E., PADILHA P.M. (2007) Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68: 1542-1547.
21. ROSA C.R., MORAES M., NETO J.A.G., NÓBREGA J.A., NOGUEIRA A.R.A. (2002) Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 79: 517-523.
22. WILLIAMS W.J. (1979) *Handbook of Anion Determination*. Butterworths: London.
23. FILGUEIRAS A.V., CAPELO J.L., LAVILLA I., BENDICHO C. (2000) Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 53(2): 433-441.
24. ELIK A. (2005) Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta* 66: 882-888.
25. ELIK A. (2007) Ultrasound assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. *Talanta* 71(2): 790-794.
26. FURUYA W.M., PEZZATO L.E., PEZZATO A.C., BARROS M.M., MIRANDA E.C. (2001) Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 1143-1149.
27. PEZZATO L.E., MIRANDA E.C., BARROS M.M., QUINTERO-PINTO L.G., FURUYA W.M., PEZZATO A.C. (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1595-1604.
28. SÁ M.V.C., PEZZATO L.E., BARROS M.M., PADILHA P.M. (2004) Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* 238: 385-401.

29. NOLAN K.B., DUFAFIN P.A. (1987) Effects of phytate on mineral bioavailability *in vitro* studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40: 79-85.
30. RODEHUTSCORD M., PFEFFER E. (1995) Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Science Technology* 31(10): 143-147.
31. SHÄFER A., KOPPE W.M., MEYER-BURGDORFF K.H., GÜNTHER K.D (1995) Effects of microbial phytase on utilization of native phosphorus carp in a diet based on soybean meal. *Water Science Technology* 31(10): 149-155.
32. OLIVA-TELES A., PEREIRA J.P., GOUVEIA A., GOMES E. (1998) Utilization of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resource* 11: 255-259.
33. VIELMA J., LALL S.P., KOSKELA J., SCHÖNER F., MATTILA P. (1998) Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 63: 309-323.
34. FORSTER, I., HIGGS, D.A., DOSANJH, B.S., ROWSHANDELI M., PARR J. (1999) Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11°C fresh water. *Aquaculture* 179: 109-125.
35. GONÇALVES G.S., PEZZATO L.E., PADILHA P.M., BARROS M.M. (2007) Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36(5S): 1473-1480.

Capítulo – III

PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS BASEADOS EM AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE VEGETAIS ORGÂNICOS POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE

Resumo

No presente trabalho é proposta uma metodologia simples, rápida e de alta sensibilidade para determinação de selênio em amostras de vegetais por espectrometria atômica em forno de grafite utilizando amostragem em suspensão. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados em relação a 20 vinte leituras do branco das suspensões padrão (5 mg mL^{-1} de celulose microcristalina) foram de 0,33 e $1,10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação de selênio em amostras de vegetais de cultura orgânica e os resultados obtidos foram concordantes com os resultados obtidos utilizando mineralização ácida das amostras em forno de microondas.

Palavras-chave: *determinação de selênio; GFAAS; slurry; extração de selênio; cultura orgânica.*

1. Introdução

O consumo de vegetais obtidos do cultivo orgânico pela população teve um aumento significativo. Esses alimentos são considerados mais saudáveis porque, conforme descrito na literatura, apresentam maior teor de nutrientes e total ausência de agrotóxicos. Estudos sobre o teor dos microminerais nesses alimentos, principalmente em relação ao selênio, elemento este em que o teor considerado essencial à saúde humana é bem próximo da sua toxicidade, são poucos. A toxicidade e a essencialidade do selênio para os seres humanos e animais depende da concentração na qual é administrada. Sua deficiência é responsável por cardiomiopatias, distrofia muscular e desordens na reprodução em várias espécies de animais. A concentração desse micronutriente nos vegetais depende das condições do solo e

do método de preparação dos alimentos. Frutos e vegetais são fontes que apresentam baixas concentrações de selênio e, além disso, uma fração significativa do elemento é perdida durante o processo de cozimento em água (Mayland, 1994; Solomons, 1992; Underwood, 1973; Rosa et al., 2002).

Na determinação de selênio em amostras biológicas, um problema freqüentemente em encontrado é a baixa concentração desse elemento. Normalmente sua quantificação exige a utilização de técnicas com alta sensibilidade e seletividade, como por exemplo, a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) ou por geração de hidreto (HGAAS). A principal dificuldade encontrada na determinação do selênio é o procedimento de preparação da amostra, etapa na qual se podem perder os compostos de selênio por volatilização durante a mineralização da amostra (Styris et al., 1991; Grammelgaard and Jons, 1997; Chen et al., 1998; Fisher & Rademeyer, 1998; Aleixo et al., 2000; Rosa et al., 2002).

Neste contexto, a determinação de analitos metálicos em suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), apresenta-se como uma técnica promissora (Minami et al., 2004). Essa técnica proporciona diversas vantagens, como alta sensibilidade, limites de detecção em níveis de ng kg^{-1} , utilização de pequenos volumes de amostra, determinação de uma ampla variedade de elementos traços e considerando-se que o atomizador pode agir como um reator químico tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de decomposição prévia total da amostra (Volynsky, 1996; Lima et al., 1999; Bulska et al., 2001; Tsalev et al., 2000; Rosa et al., 2002; Ortner et al., 2002; Minami et al., 2004; Silva et al., 2006).

Considerando o exposto, neste trabalho um método simples, rápido e sensível é proposto para determinação de selênio em amostras de vegetais orgânicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizando-se a introdução direta de suspensões das amostras no tubo de grafite do espectrômetro.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes, soluções padrão e amostras

Água deionizada de alta pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida por sistema Elga Ionic (PURELAB Option, USA), ácidos nítrico suprapuro (Merck), peróxido de hidrogênio (Merck) e Triton X-100 (Merck) foram utilizados em todo o trabalho. A solução de trabalho contendo tungstênio, empregada no recobrimento interno do tubo de grafite e utilizada como modificador permanente, foi preparado pela diluição apropriada com água ultrapura de uma solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de tungstato de sódio (Merck). Solução de Pd(II), utilizada também como modificador químico, foi preparada nas mesmas condições, utilizando no entanto nitrato de paládio (Merck).

Solução estoque de selênio foi preparada a partir de reagente de pureza espectroscópica (Johnson & Matthey, Royston, Hertfordshire, UK). As demais soluções utilizadas, incluindo as soluções ácidas concentradas utilizadas nas mineralizações das amostras, foram todas de grau analítico. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno. Os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por agitação antes da utilização.

As amostras de vegetais após secas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa de circulação forçada de ar por 48 horas, foram submetidas à moagem criogênica. Para isso, uma massa de aproximadamente 1,0 g da amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com a barra magnética, o qual devidamente fechado foi imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante ($20 \text{ impactos s}^{-1}$) a amostra foi pulverizada. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu uma primeira etapa de 2 minutos para o pré-congelamento, 1 minuto de pulverização, novamente 1 minuto de congelamento, e uma segunda etapa que compreendeu dois ciclos com dois estágios de pulverização e congelamento, perfazendo um tempo total de 8 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que $60 \text{ }\mu\text{m}$ (Silva et al., 2006).

Parte das amostras foram também mineralizadas em forno de microondas. Para isso, massas de 100 mg de amostras moídas criogenicamente, foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,5 mL de ácido

nítrico suprapuro 14 mol L^{-1} mais $0,50 \text{ mL}$ de peróxido de hidrogênio 30% m/m. Posteriormente, o seguinte programa de aquecimento (tempo/potência) foi utilizado: passo 1, $300\text{W}/3 \text{ min}$; passo 2, $0 \text{ W}/2 \text{ min}$ (ventilação); passo 3, $450 \text{ W}/5 \text{ min}$, passo 4, $550 \text{ w}/5 \text{ min}$; passo 5, $650 \text{ W}/5 \text{ min}$; passo 6, $0 \text{ W}/5 \text{ min}$ (ventilação). Após o resfriamento, os extratos ácidos obtidos foram diluídos para 10 mL com água ultra-pura (Gallego et al., 1996).

2.2. Preparo das suspensões das amostras

Após a moagem criogênica, 5 mg de amostras dos tecidos vegetais foram transferidas diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados $5 \mu\text{L}$ de ácido nítrico suprapuro 14 mol L^{-1} , $50 \mu\text{L}$ de Triton X-100 a 1% v/v, $100 \mu\text{L}$ de solução 1000 mg L^{-1} de Pd(II) e $845 \mu\text{L}$ de água ultrapura. As amostras de suspensão dos materiais biológicos foram em seguida agitadas por sonificação durante 40 segundos diretamente nos copos do autoamostrador.

2.3. Equipamentos

Forno de Microondas Provecto Analítica (Campinas-SP) modelo DGT 100 plus foi utilizado para mineralização das amostras, quando necessária.

Para determinação de selênio foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADSU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de selênio SHIMADSU, operada com 23 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de $196,0 \text{ nm}$ e a resolução espectral foi de $0,5 \text{ nm}$. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min^{-1} durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em de área de pico.

A moagem criogênica das amostras foi feita em moinho criogênico SPEX – Freezer, modelo Mill 6750.

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE, foi utilizado para agitação das suspensões das amostras de tecido vegetal.

2.4. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio

Os tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada utilizados nas determinações de selênio tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio metálico. Para isso, alíquotas de 25 μL de solução contendo 1000 mg L^{-1} do modificador tungstato de sódio foi injetada dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido às etapas do programa de aquecimento descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da parede interna do tubo de grafite com tungstênio metálico (W^0).

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min^{-1})
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	110	10	25	0,30
Secagem	150	10	25	0,30
Redução	600	10	20	0,30
Redução	1200	10	20	0,30
Limpeza	2600	0	5	0,30

Esse procedimento foi repetido 20 vezes. Com aquecimento até 500 $^{\circ}\text{C}$ íons tungstênio são depositados sobre a plataforma do tubo de grafite, formando uma camada de carbeto de tungstênio que atua como modificador químico (Lima et al., 1999). A massa de tungstênio depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 500 μg . Com esse tratamento foi possível utilizar o tubo de grafite em 610 queimas de amostras.

2.5. Preparo das suspensões padrão

Curvas analíticas foram preparadas utilizando-se celulose microcristalina (Merck) contendo 2, 4, 8, 16 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selênio (Merck), sendo as leituras das absorvâncias feitas

por GFAAS. Essas suspensões padrões foram preparadas nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões de amostras de tecido vegetal, utilizando, no entanto, 5 mg de celulose microcristalina. Desta forma, no preparo das curvas analíticas, volumes de 4, 6, 8, 16, 32 e 20 μL de solução padrão contendo $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de selênio foram transferidos para os frascos do autoamostrador do espectrômetro antes do volume final ser acertado para 1000 μL com água ultra pura, de modo que a concentração final selênio nas suspensões ficassem na faixa de 2 to $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Soluções padrão contendo 2 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de selênio em meio de HNO_3 10% v/v, foram também utilizadas no preparo de curvas analíticas para determinação de selênio nas amostras de tecido vegetal mineralizadas por digestão ácida utilizando forno de microondas.

2.6. Procedimentos analíticos

Após a etapa de sonificação da amostra de suspensão e/ou suspensão padrão, feita diretamente nos copos do autoamostrador, um volume de 10 μL de padrão ou amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite (recoberto internamente com tungstênio metálico) pela micro pipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com cinco repetições. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de selênio encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de selênio em suspensões de amostras de fezes e rações.

Etapas	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min^{-1})
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	10	0	1
Secagem	150	10	5	1
Secagem	250	10	5	1
Pirólise	1400	10	20	1
Pirólise	1400	5	10	1
Atomização	2400	1	5	0
Limpeza	2800	5	0	1

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização das condições instrumentais

A otimização das temperaturas de pirólise da amostras e de atomização do analito é de fundamental importância para obtenção de resultados analíticos exatos e reprodutivos em determinações de metais por GFAAS utilizando-se a técnica de amostragem em suspensão (Alvarez et al., 1996; Lima et al., 1999; Zanão et al., 2002). Dessa forma, curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do selênio em suspensões padrão de celulose que continham $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de selênio e 10mg L^{-1} de Pd(II), utilizando-se tubo de grafite recoberto internamente com W^0 , que atuou como modificador permanente e as condições de preparo das amostras descritas no item 2.2.

As curvas a e b da Figura 1 mostram a influência das temperaturas de pirólise sobre o sinal de absorvância do selênio nas suspensões padrão de celulose. A temperatura de pirólise de $1600 \text{ }^\circ\text{C}$ foi escolhida porque, como a curva a da Figura 1 indica, os sinais de absorvância obtidos para o selênio mantiveram-se constantes na faixa de $1400\text{-}1600 \text{ }^\circ\text{C}$, diminuindo rapidamente após atingir $1600 \text{ }^\circ\text{C}$.

Em relação à temperatura de atomização (Figura 1, curvas c e d), os sinais de absorvância do selênio mantiveram-se constantes a partir de $2400 \text{ }^\circ\text{C}$, dessa forma, essa temperatura de atomização foi selecionada para todos os demais experimentos.

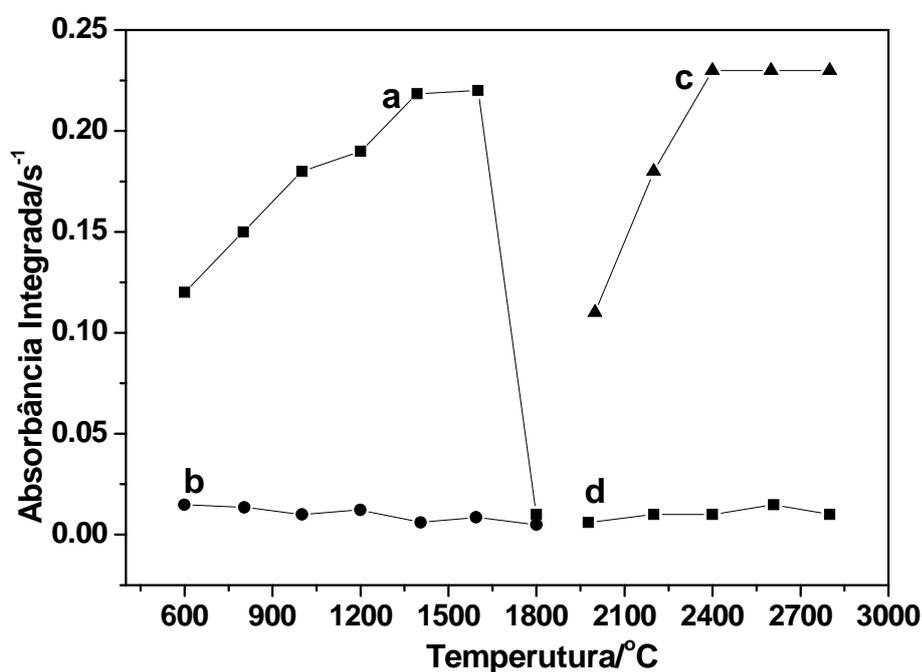


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise e atomização obtidas para suspensões padrão de celulose contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se. Curva de Pirólise (Temperatura de atomização, $2400 \text{ }^\circ\text{C}$): a – Sinal de absorção atômica (AA); b – Background (BG); Curvas de atomização (Temperatura de pirólise, $1600 \text{ }^\circ\text{C}$): c – Sinal de absorção atômica (AA); d – Background (BG).

Na Figura 2 são indicados os sinais de absorbância do selênio (AA) e de absorção de fundo (BG) para as suspensões padrão dos materiais biológicos. Analisando-se a Figura 1, um sinal de absorção de fundo relativamente baixo pode ser observado. O baixo sinal de BG demonstra a eficiência do modificador químico Pd(II) co-injetado junto com a amostra e do W^0 que atuou como modificador químico permanente no estágio de pirólise da suspensão e na estabilização térmica do selênio

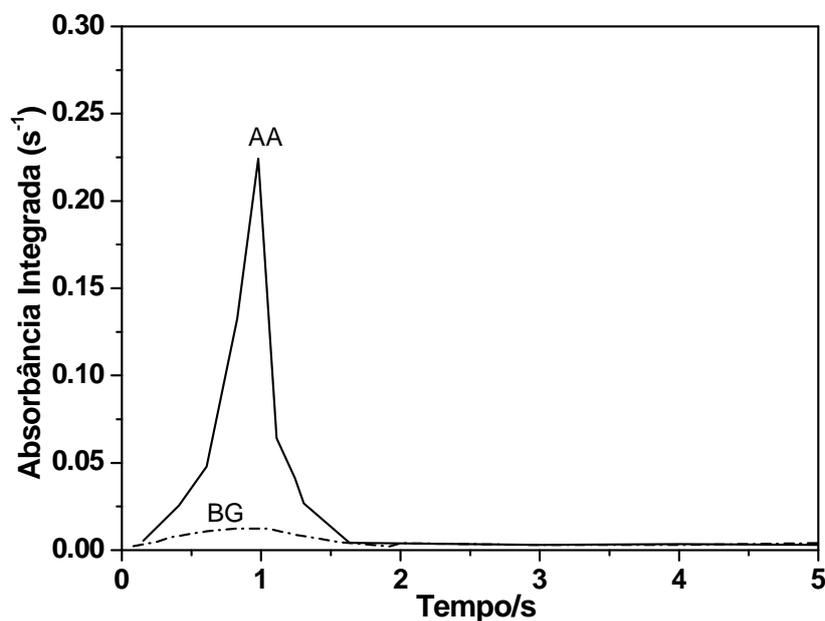


Figura 2. Sinais transientes de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) na atomização do selênio nas suspensões padrão de celulose contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se.

3.2. Determinação do tempo ótimo de sonificação das suspensões das amostras

Na análise de suspensões de materiais sólidos, a agitação ultra-sônica garante uma boa homogeneização da amostra, permitindo uma melhor reprodutibilidade entre as medidas dos sinais de absorbância por GFAAS. Assim, o tempo de agitação por ultra-som foi avaliada no intervalo de 10 a 60 segundos. A Figura 3 mostra a influência do tempo de sonificação da suspensão padrão de celulose sobre os sinais de absorbância medidos para o selênio e os desvios padrão relativos (RSD) para cada tempo de agitação por ultra-som.

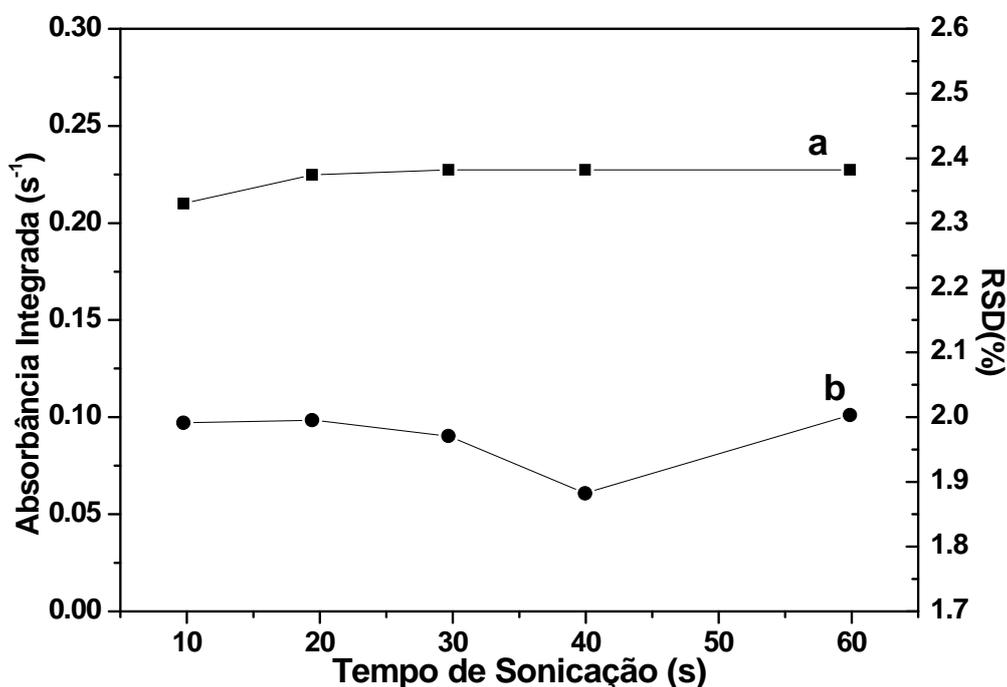


Figure 3. Influência do tempo de sonicação sobre os sinais de absorvância medidos por GFAAS para o selênio e dos desvios padrão relativos (RSD) na suspensão padrão cellulose contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se. Curva a – Tempo de sonicação versus Absorbância integrada; Curva b – Tempo de sonificação versus RSD.

A análise da Figura 3 indica que os sinais de absorvância mantiveram-se constantes a partir de 20 s de sonicação. O tempo de sonicação de 40 s foi considerado ótimo, proporcionando não só um bom sinal de absorvância, mas também, um RSD relativamente baixa entre as medidas (1,9%) (Millerihli, 1993; Rosa et al, 2002).

3.3. Obtenção das curvas analíticas

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados (temperatura de pirólise e atomização e o perfil de sinal de absorção atômica), curvas analíticas foram construídas utilizando-se suspensões padrão de cellulose contendo selênio na faixa de concentração de 2 – $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (conforme descrito no item Preparação de suspensões padrão). A Figura 4

mostra as curvas analíticas obtidas para as suspensões padrão de para soluções padrão aquosas com as suas respectivas equações das retas.

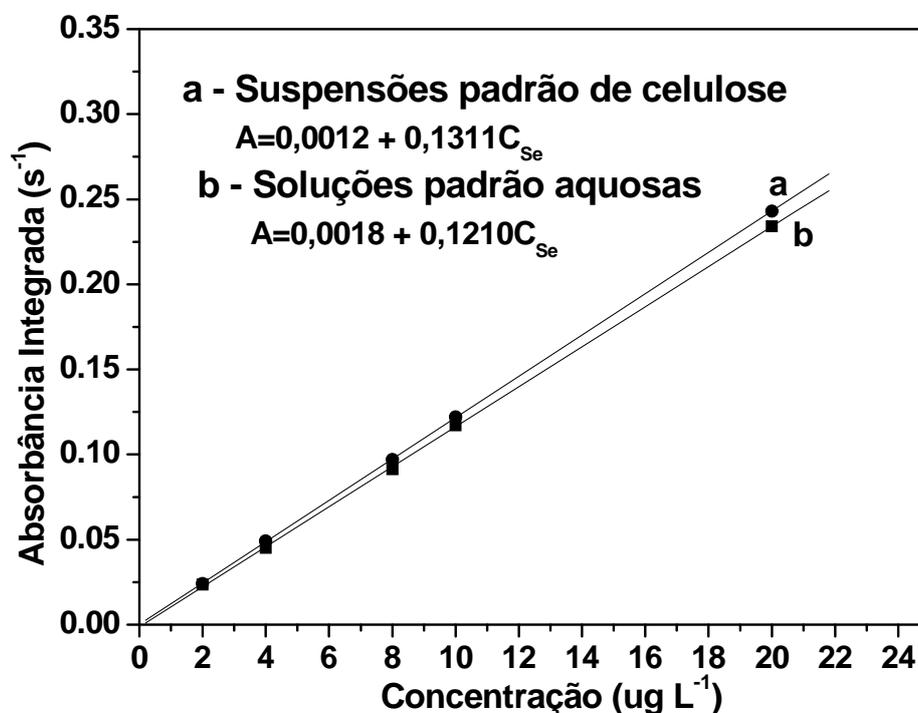


Figure 4. Curvas analíticas obtidas para suspensões padrão de celulose e soluções padrão aquosas contendo 2, 4, 8, 10 and 20 µg L⁻¹ de Se.

A comparação das curvas analíticas indica que suas inclinações não apresentaram diferenças significativas ($k = 0,1311$ para as suspensões padrão de celulose, curva “a”, e $k = 0,1210$ para soluções padrão aquosas, curva “b”), indicando que a sensibilidade do método proposto é aceitável e comprova a eficiência da etapa de pirólise e temperatura de atomização do cronograma de aquecimento empregado. A acumulação de resíduos de carbono no interior do tubo de grafite, causando obstrução parcial da radiação da lâmpada de cátodo oco, pode prejudicar medidas de absorbância (Aleixo et al., 2000). No entanto, os baixos sinais de background (BG), obtidos na etapa de otimização de selênio do procedimento proposto, indicaram que o resíduo de carbono deixado pela etapa de pirólise não prejudicou as medidas de absorbância. As massas características calculadas foram de 32 e 29 pg para a suspensão padrão de celulose e solução padrão de Se (ambos contendo 15 µg

L⁻¹ de Se) (Currie, 1999). O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio-padrão de 20 leituras obtidas para os brancos da curva analítica e suas inclinações (LOD = 3 σ /inclinação, LOQ = 10 σ /inclinação). Seus valores foram 0,33 e 1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (correspondendo a 66 e 220 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de Se para as suspensões padrão de celulose e 0,28 e 0,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se para as soluções padrão aquosas, respectivamente (Currie, 1999). Esses resultados demonstram que o método proposto oferece um aceitável nível de precisão.

Após a otimização, a precisão do método proposto para a determinação de selênio foi investigada em suspensões de material de referência certificado RM 8433 (farelo de milho) e os resultados são listados na Tabela 3. O método proposto foi aplicado na determinação de selênio em quatro amostras de vegetais de cultivo orgânico. Os resultados foram confrontados com os das amostras mineralizadas em forno de microondas (resultados também apresentados na Tabela 3), não apresentando diferença estatística ao nível de confiança de 95% (teste t pareado). A vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 610 queimas. Considerando a complexidade das matrizes biológicas, o tempo de vida útil do tubo com o método proposto é aceitável quando comparado com outros métodos descritos na literatura (Liang et al., 1996; Aleixo et al., 2000; Rosa et al., 2002; Silva et al., 2006).

Tabela 3. Resultados obtidos para o selênio em amostras vegetais utilizando o procedimento proposto com amostragem em suspensão e o procedimento com mineralização em forno de microondas.

Amostras Vegetais	Suspensões ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mineralizadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Pepino	242 \pm 3,4	245 \pm 3,8
Morango	284 \pm 4,1	287 \pm 4,7
Casca de Manga	251 \pm 3,5	255 \pm 3,9
Semente de Abóbora	235 \pm 3,2	238 \pm 3,6
Padrão Certificado*	45 \pm 1,6	44 \pm 1,8

Resultados expressos como valor médio \pm desvio-padrão (n=5).

Intervalo de Confiança a um nível de confiança de 99% (t = 5,70).

*Material de referência certificado - RM 8433 – National Institute of Standards and Technology (45 \pm 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

4. Conclusões

O método proposto para quantificação de selênio em amostras de suspensões vegetais apresentou resultados equivalentes aos obtidos pelo método de quantificação por GFAAS cuja primeira etapa envolve a mineralização das amostras em forno de microondas. A principal vantagem do método proposto é que não gera resíduos tóxicos, que podem ser prejudiciais para a saúde do analista e contaminam o ambiente. Além disso, uma vez que este novo método não requer mineralização das amostras, reduz consideravelmente o tempo gasto nas determinações analíticas em análises vegetais. Além disso, oferece limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) na ordem de $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, utilizando somente $10 \mu\text{L}$ de amostras em suspensão para cada determinação analítica. Uma comparação dos valores dos limites de detecção calculados pelo método proposto com os obtidos por GFAAS ($0,28 \mu\text{g L}^{-1}$) usando soluções padrão aquosas demonstraram a sensibilidade aceitável do método proposto.

5. Referências

- ALEIXO P.C., NÓBREGA J.A., SANTOS D.J., MULLER R.C.S. (2000) Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. *Química Nova* 23: 310-312.
- ALVAREZ M.A., CARRIÓN N., GUTIÉRREZ H. (1996) Effects of atomization surfaces and modifiers of the kinetics of copper atomization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* 51: 1121-1132.
- BULSKA E., THYBUSCH B., ORTNER H.M. (2001) Surface and subsurface examination of graphite furnace tubes after electrodeposition of noble metals for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* 56: 363-373.
- CHEN G.R., YEN C., WEI B., HU C., YU J., CHUNG C., KUO S. (1998) Direct determination of selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry using automated ultrasonic slurry sampling. *Spectrochimica Acta Part B* 53: 131-138.

CURRIE L.A. (1999) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta* 391: 105-126.

FISHER J., RADEMEYER C.J. (1998) Kinetic of selenium atomization in electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS). Part 2: Selenium with palladium modifiers. *Spectrochimica Acta Part B* 53: 549-567.

GRAMMELGAARD B., JONS O. (1997) Comparison of palladium chemical modifiers for determination of selenium in plasma by zeeman-effect background corrected electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12: 465-671.

LIANG Y.Z., LI M., RAO Z. (1996) Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences* 12: 629-633.

LIMA E.C., BARBOSA F., KRUG F.J. (1999) Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in fish slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14: 269-274.

LIMA E.C., BARBOSA F., KRUG F.J. (1999) Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for lead determination in sediments slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14: 1913-1918.

MAYLAND H.F. (1994) Selenium in plant and animal nutrition. In: *Selenium in the environment*, New York: Marcel Dekker.

MINAMI H., YADA M., YOSHIDA T., ZHANG Q., INOUE S., ATSUYA I. (2004) Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. *Analytical Sciences* 20: 455-459.

MILLER-IHLI N.J. (1993) Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 345: 482-489.

ORTNER H.M., BULSKA E., ROHR U., SCHLEMMER G., WEINBRUCH S., WELS B. (2002) Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry-mechanisms of action. *Spectrochimica Acta, Part B* 57: 1835-1853.

ROSA C.R., MORAES M., NETO J.A.G., NÓBREGA J.A., NOGUEIRA A.R.A. (2002) Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 79: 517-523.

SILVA F.A., PADILHA C.C.F., PEZZATO L.E., BARROS M.M., PADILHA P.M. (2006) Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 30: 1025-1030.

SOLOMONS N.W. (1992) Absorption and malabsorption of mineral nutrients, Alan R. Liss, New York, 125pp.

TSALEV D.L., SLAVEYKOVA V.I., LAMPUGNANI L., D'ULIVO A., GEORGIEVA R. (2000) Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry – advances, anticipations and reality. *Spectrochimica Acta, Part B* 55: 473-490.

STYRIS D.L., PRELL L.J., REDFIELD D.A., HOLCOMBE J.A., BASS D.A., MAJID V. (1991) Mechanisms of selenium vaporization with palladium modifiers using electrothermal atomic and mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* 63: 508-517.

UNDERWOOD E.J. (1973) Trace elements: toxicants occurring naturally in foods. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington D.C.*

VOLYNSKY A.B. (1996) Catalytic processes in graphite furnace for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 51: 1573-1589.

ZANÃO R.A., BARBOSA F., SOUZA S.S., KRUG F.J., ABDALA A.L. (2002) Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W-Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer. *Spectrochimica Acta, Part B* 57: 291-301.