

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE APARENTE DE SELÊNIO
PELA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO-SE
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE
GRAFITE**

FÁBIO ARLINDO SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Zootecnia.

Botucatu – SP

Agosto - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE APARENTE DE SELÊNIO
PELA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO-SE
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE
GRAFITE**

FÁBIO ARLINDO SILVA

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Zootecnia.

Botucatu – SP

Agosto - 2006

DEDICATÓRIA

“À minha esposa, Lucía, sem o seu apoio eu jamais conseguiria realizar este trabalho.

Muito obrigado. Eu te amo muito;

Aos meus pais, Arlindo e Quitéria e aos meus irmãos, Álvaro, Ariane e Lúcia;

Aos meus grandes amigos, Alessandro, Clayton, Tuca, Paraná, Renato, Gabriel,

Blanca, Sandro e Carla;

À Tia Ná, Vó Benedicta, Egle, Paula e Alex;

À Maria, do Departamento de Química, que por inúmeras vezes foi muito solícita

comigo;

Ao meu orientador e amigo Pedro de Magalhães Padilha, realmente não há palavras

para explicar o quanto eu lhe sou grato. Muitíssimo obrigado.”

AGRADECIMENTOS

“Agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente;

Aos amigos da Pós-graduação da Zootecnia, Gabriel, Blanca, André, Altevir, Igo, Xuxa, Dario;

Aos Professores e amigos do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da UNESP/Botucatu, Prof. Pezzato, Prof^a Margarida;

Aos amigos do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP/Botucatu, Maria, Vânia, Fabinho, Lurdinha, Elaine, Prof. Ariovaldo, Prof. Júlio, Prof^a Sônia, Prof. Zé Pedro;

Aos companheiros de Pós-graduação do Departamento de Química, Jorge, Adriana, Jomílson, Sílvio, Alberto, Renato;

E a Deus. Pois ele está acima de tudo.”

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. Considerações iniciais e justificativas.....	2
1.1.1. Estudo da digestibilidade dos alimentos na nutrição de peixes.....	2 4
1.1.2. Os nutrientes metálicos e suas funções na nutrição animal.....	5
1.1.3. Interação entre minerais e outros nutrientes.....	7
1.1.4. Espectrometria de absorção atômica por chama – FAAS.....	7
1.1.4.1. Conceitos básicos em Espectrometria Atômica.....	12
1.1.4.2. Análises Quantitativas em Absorção Atômica.....	14
1.1.5. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite – GFAAS.....	
1.1.6. Determinação de nutrientes metálicos em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	18 18
1.1.7. Outras aplicações da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	18 21
2. Referências Bibliográficas.....	27
Anexo I: Lista de abreviações.....	
	28
CAPÍTULO II.....	
Determinação de Cr em suspensões de fezes de peixes por GFAAS para estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes em rações utilizadas em piscicultura.....	29 29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução	32
2. Experimental.....	32
2.1. Reagentes, soluções padrão e vidrarias.....	33
2.2. Preparo das amostras.....	34
2.2.1. Preparo das suspensões das amostras.....	34
2.3. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com paládio metálico.....	35
2.4. Preparo das curvas analíticas.....	35
2.5. Procedimentos analíticos.....	

3. Resultados e discussão.....	36
3.1. Otimização das condições experimentais.....	36
3.2. Determinação do tempo ótimo de sonificação das suspensões das amostras.....	39
3.3. Obtenção das curvas analíticas.....	40
3.4. Aplicação do método proposto	42
4. Conclusões.....	44
5. Referências Bibliográficas.....	44
Anexo I: Lista de abreviações.....	48
 CAPITULO III.....	 49
Determinação de selênio por GFAAS em suspensões de amostras de fezes de peixes para estimativa da biodisponibilidade deste micronutriente em rações utilizadas em piscicultura.....	50
Resumo.....	50
Abstract.....	51
1. Introdução.....	52
2. Experimental.....	53
2.1. Reagentes, soluções padrão e vidrarias.....	53
2.2. Preparo das amostras.....	54
2.2.1. Preparo das suspensões das amostras	55
2.3. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com tungstênio metálico.....	55
2.4. Preparo das curvas analíticas	56
2.5. Procedimentos analíticos.....	56
3. Resultados e discussão.....	57
3.1.Otimização das condições experimentais.....	57
3.2. Determinação do tempo ótimo de sonificação das suspensões das amostras.....	61
3.3. Obtenção das curvas analíticas.....	61
3.4. Aplicação do método proposto.....	63
4. Conclusões.....	65
5. Referências Bibliográficas.....	69
Anexo III: Lista de abreviações.....	70
 CAPITULO IV.....	 71
Implicações.....	

I. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais e justificativas

1.1.1. Estudo da digestibilidade dos alimentos na nutrição de peixes

A determinação química e os testes alimentares são os primeiros procedimentos para se determinar o valor nutritivo de um alimento. Entretanto, após a ingestão, sua efetiva assimilação depende da digestibilidade pelo organismo animal, ou seja, da habilidade com que o animal irá digerir e absorver os nutrientes e a energia contidos no alimento.^{1,2}

No estudo de nutrição de peixes, a determinação da digestibilidade dos nutrientes das rações utilizadas na alimentação desses animais, é o primeiro cuidado quando se pretende avaliar o potencial de inclusão da dieta.³ Conhecendo-se o grau de digestibilidade do alimento, pode-se descrever a fração do nutriente ou da energia do alimento que não é excretada nas fezes do animal.⁴ A substituição de determinados produtos e subprodutos da agroindústria, empregados como ingredientes das dietas de peixes, por produtos sucedâneos, tem sido feita com base em estudos de digestibilidade dos nutrientes desses alimentos e tem se apresentado como prática econômica alternativa.^{5,6}

Independentemente do método utilizado para determinação do coeficiente de digestibilidade de uma dieta ou ingrediente, os resultados finais podem ser afetados por fatores dependentes do meio ambiente, do estado de saúde do animal, dos hábitos alimentares e da composição e processamento da dieta.⁷

Na determinação da digestibilidade de alimentos por 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 ou administrados por outra via ao animal.⁸ Os marcadores externos são os mais utilizados nos estudos de digestibilidades com peixes, sendo o óxido de cromo III (Cr_2O_3) o marcador que apresenta melhor aceitação por ser completamente indigerível e não absorvível, por não ter ação farmacológica no aparelho digestório, passando, dessa forma, uniformemente através do aparelho digestório.⁹⁻¹¹

A determinação da porcentagem de Cr_2O_3 nas fezes dos peixes permite estimar o coeficiente de digestibilidade total ou parcial dos nutrientes metabolizados, comparando-se com a porcentagem desse óxido que é misturado inicialmente na ração.¹² Para isso, os peixes são mantidos em aquários onde são alimentados com rações marcadas com 0,1% de Cr_2O_3 . Decorrido o período de alimentação, os peixes são transferidos para aquários de coleta de fezes, com fundo cônico para favorecer a decantação das fezes. As fezes são coletadas após decantação e retiradas da água sobrenadante, sendo em seguida centrifugadas, secas em estufa, moídas e conservadas a -20°C .¹³ Após determinação da composição química-bromatológica e da porcentagem de Cr_2O_3 nas rações e fezes, o coeficiente de digestibilidade pode ser calculado utilizando-se a equação 1:¹⁴

$$\text{Da} = 100 - 100 \left[\left(\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3r}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3f}} \right) \times \left(\frac{\% \text{Nf}}{\% \text{Nr}} \right) \right] \quad \text{Equação 1}$$

onde:

Da = Digestibilidade aparente;

$\% \text{Cr}_2\text{O}_{3r}$ = Porcentagem de óxido de cromo na ração;

$\% \text{Cr}_2\text{O}_{3f}$ = Porcentagem de óxido de cromo nas fezes;

$\% \text{Nr}$ = Porcentagem de nutriente na ração;

$\% \text{Nf}$ = Porcentagem de nutriente nas fezes.

A determinação da porcentagem de óxido de cromo tanto nas fezes como nas rações, apresenta dificuldades nos procedimentos de preparo das amostras. Normalmente a mineralização das amostras são feitas por aquecimento lento ($60-80^\circ\text{C}$) em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica (5 mL de HNO_3 concentrado + 2 mL de HClO_4 concentrado).¹⁵ Os extratos resultantes são soluções ácidas de dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), que normalmente é quantificado pelo método colorimétrico da difenilcarbazida.¹⁶ Este procedimento além de demorado, apresenta o inconveniente de oxidar o cromo (III) a cromo (VI), espécie altamente tóxica. A quantificação de alguns nutrientes metálicos, colocados nas rações em baixas concentrações, como o cobre e o selênio, por exemplo, apresenta a mesma dificuldade nas suas determinações.

Considerando-se o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes metálicos e do óxido de cromo (III),

utilizado como marcador de rações, para determinação da digestibilidade nutricional aparente nos estudos de nutrição animal, particularmente nutrição de peixes, torna-se fundamental. Neste contexto, a determinação de analitos metálicos em suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, apresenta-se como uma técnica bastante promissora, principalmente porque permite a eliminação da etapa de mineralização das amostras e também a produção de crômio (VI), que pela metodologia clássica utilizada nos estudos de nutrição animal, constitui o principal problema.

1.1.2. Os nutrientes metálicos e suas funções na nutrição animal

Todos os tecidos possuem elementos químicos (minerais) em proporções e quantidades variáveis. Assim, são componentes essenciais ao metabolismo, refletindo na maior ou menor produtividade do animal.¹⁷ Dois a cinco por cento do corpo do animal é constituído pela fração mineral, ocorrendo variação em função da espécie, da raça e do próprio indivíduo.^{17,18} Os minerais são classificados como macrominerais (minerais que o organismo necessita em grandes quantidades) e microminerais (minerais 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, podemos classificar os elementos essenciais em:

- Macroelementos: cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre.
- Microelementos: ferro, iodo, selênio, cobalto, manganês, zinco e cobre.

A evolução da ciência animal, aliada à modernização dos sistemas de análises nos últimos anos, tem levado a descobertas de outras espécies metálicas que participam de ciclos metabólicos importantes no organismo de diversos animais. Assim, já existem evidências da necessidade do molibdênio, do níquel, do crômio, do silício, do vanádio, do flúor e até do arsênio. Por outro lado, alguns desses elementos, preocupam mais pela sua toxicidade e antagonismo, como flúor, níquel e arsênio, que se não forem bem controladas suas dosagens, tornam-se nocivos ao animal.¹⁹

Genericamente, as funções dos sais minerais podem ser classificadas em:²⁰

- Função estrutural – minerais com participação nos órgãos e tecidos, como o cálcio, o fósforo e o magnésio, integrantes dos ossos e dos dentes. Os minerais que participam da constituição das proteínas musculares, como fósforo e enxofre, também se enquadram dentro dessa função.

- Função eletrolítica – minerais que participam como constituintes dos fluídos e dos tecidos orgânicos, como o sódio, o potássio, o cálcio e o magnésio, sendo responsáveis pela manutenção da pressão osmótica, pelo equilíbrio ácido-base e pela permeabilidade da membrana e dos tecidos, enquadram-se dentro dessa função.
- Função catalisadora – minerais que atuam como catalisadores nos sistemas enzimáticos e hormonais, como integrantes específicos das metaloenzimas. São representantes nessa função os microelementos minerais. Dentre eles, podemos destacar o iodo, pela sua função na tiroxina. A Tabela 1 mostra os principais microelementos que participam dessa função e seus respectivos sistemas enzimáticos.

Tabela 1 – Microelementos e seus respectivos sistemas enzimáticos.

Minerais	Sistemas enzimáticos
Ferro	Citocromos, catalases e desidrogenase do ácido fumárico.
Cobre	Citocromo-oxidase, oxidase do ácido ascórbico, catalases e aminoxidase.
Mangânês	Hidrolases, tiaminases, descarboxilases e quinases.
Molibdênio	Xantino-oxidase e aldeído-oxidase.
Selênio	Glutationa-peroxidase
Zinco	Anidrase-carbônica, fosfatase-alcalina e carboxipeptidase.

1.1.3. Interação entre minerais e outros nutrientes

Os minerais podem interagir entre si, com outros nutrientes e também com alguns fatores não nutritivos da dieta. As interações do tipo sinérgica ou antagônica podem ocorrer na própria dieta ou durante o metabolismo no trato gastrointestinal. O conhecimento dessas interações assume importância fundamental para a correção das deficiências minerais causadas principalmente pelos desequilíbrios entre os elementos constituintes da dieta.²¹

O conceito de sinergismo e antagonismo dos minerais não está bem esclarecido. No aspecto sinérgico, parece que ocorre uma melhoria na absorção de um elemento em função de outro, desempenhando alguma função metabólica em nível do tecido ou em nível celular.²²

O sinergismo dos minerais no trato gastrointestinal segue os possíveis mecanismos de interação:²²

- Interação direta entre os elementos, sendo que os níveis de absorção são determinados por suas proporções na dieta;
- Interação através de processo intermediário da fosforilação na parede intestinal e a atividade das enzimas digestivas. Um exemplo é o efeito do fósforo, do zinco e do cobalto na liberação do alimento e na absorção de outros minerais;
- Interação indireta pelo estímulo do crescimento e atividade da flora microbiana do rúmen. Um exemplo é o cobalto, que estimula a flora, intensificando o processo biossintético.

Em nível de tecido e metabolismo celular, o sinergismo pode ocorrer devido à:²³

- Interação indireta de elementos na função estrutural (cálcio e fósforo na formação dos ossos, cobre e ferro na formação da hemoglobina, manganês e zinco na conformação do DNA);
- Participação simultânea no centro ativo de algumas enzimas (ferro e molibdênio na xantinoxidase, cobre e ferro na citocromoxidase);
- Ativação de sistemas enzimáticos e intensificação de processos sintéticos que requerem a presença de outros minerais (magnésio nas sintetases, com subsequente participação do fósforo, enxofre e outros elementos);
- Ativação das funções endócrinas e efeito sobre o metabolismo de outros minerais (iodo → tiroxina → aumento do anabolismo → maior retenção de potássio e magnésio no corpo).

A interação do tipo antagônica pode ser definida como um elemento inibindo a absorção de outro no trato gastrointestinal e produz efeito oposto sobre uma função bioquímica no organismo.²⁴ O mecanismo poderá ocorrer em nível gastrointestinal ou em nível de tecido muscular.

Em nível gastrointestinal, temos:

- Reação química entre elementos (formação de fosfato de magnésio na presença de excesso de magnésio na dieta; formação de complexos entre cobre ou zinco, com fósforo, sulfato ou amônio);
- Adsorção sobre a superfície das partículas coloidais (fixação de magnésio e ferro em partículas de sais insolúveis);

- Efeito inibidor com função antimetabólica. Ação do boro ou do titânio sobre a fosforização oxidativa;
- Competição entre íons. Agindo como material carregador na parede intestinal (cobalto com ferro).

Em nível de tecido muscular, a interação antagônica pode ocorrer:

- Diretamente entre íons simples e complexos orgânicos;
- Por competição entre íons no centro ativo de sistemas enzimáticos (magnésio e manganês nas metaloenzimas);
- Por competição para ligação com substâncias carregadoras no sangue (ferro com zinco);
- Interferências de diferentes íons sobre uma dada enzima (ativação da ATPase pelo magnésio e inibição pelo cálcio);
- Por abrandamento do nível tóxico dos metais pesados como chumbo e vanádio por íons ou elementos bióticos (redução da concentração de chumbo no corpo pela absorção de cobre, zinco e manganês).

1.1.4. Espectrometria de absorção atômica por chama – FAAS²⁵⁻²⁷

1.1.4.1. Conceitos básicos em Espectrometria Atômica

O átomo é constituído de um núcleo rodeado de elétrons. Todos os elementos possuem um número de elétrons que está associado com o núcleo atômico dentro da estrutura orbital que é única de cada elemento. Os elétrons ocupam posições nos orbitais em uma ordem e em caminhos definidos. A energia mais baixa, que corresponde a configuração eletrônica estável do átomo, conhecida como “estado fundamental”, é a configuração normal para os átomos.

Se alguma energia de grande magnitude é aplicada ao átomo, a energia será absorvida pelo átomo, e os elétrons mais externos (elétrons de valência) serão promovidos para configurações menos estáveis, denominadas “estados excitados”. Como este estado é instável, o átomo tende imediatamente e espontaneamente a retornar para a configuração do estado fundamental. O elétron irá retornar para o estado inicial, posição estável no orbital, e a energia radiante equivalente à quantidade absorvida no processo inicial de excitação será emitida.

O processo descrito acima é representado pela Figura 1. Na primeira etapa ocorre a excitação forçada proporcionada por fonte externa de energia, e na segunda etapa ocorre o processo espontâneo de decaimento, envolvendo emissão de luz.

O comprimento de onda da energia radiante emitida está diretamente relacionado com a transição eletrônica ocorrida. Sabendo-se que todos os elementos possuem uma estrutura eletrônica única, e que o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade individual de cada elemento, é possível determinar qualitativamente qual é o elemento, por este comprimento de onda ser característico de cada elemento, algo como uma “impressão digital do elemento”.

Primeira Etapa



Segunda Etapa

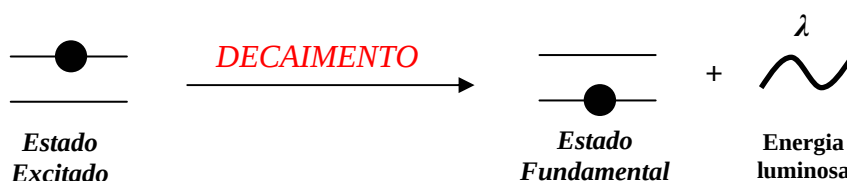


Figura 1 - Processos de excitação e decaimento dos elétrons de valência.

Como a configuração do orbital dos átomos pode ser complexa, podem ocorrer algumas transições eletrônicas, estas transições resultam na emissão de comprimentos de onda característicos da luz, como é ilustrado pela Figura 2.

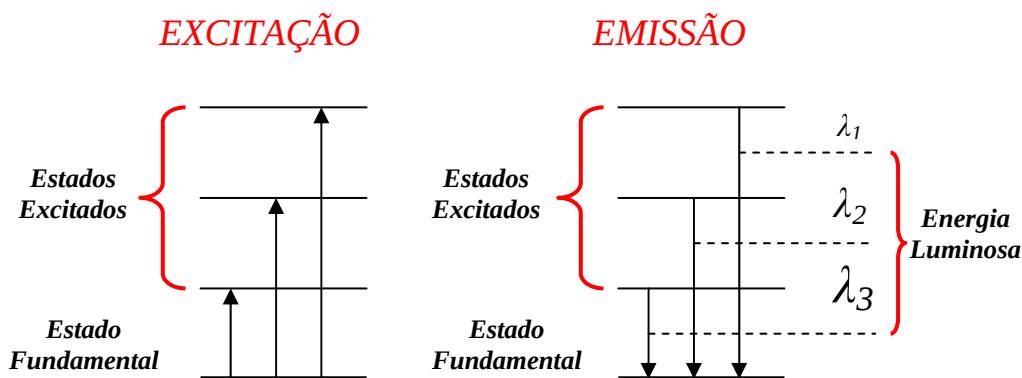


Figura 2 - Transições de energia.

O processo de excitação e decaimento para o estado fundamental está envolvido nas 3 linhas de espectroscopia atômica (emissão, absorção e fluorescência atômica). Essa energia absorvida no processo de excitação e essa energia emitida no processo de decaimento é quantificada e utilizada para propósitos analíticos.

Em emissão atômica, a amostra é submetida à alta energia, de natureza térmica, para produzir átomos no estado excitado, capazes de emitir luz (Figura 3). A fonte de energia pode ser um arco elétrico, uma chama, ou mais recentemente, um plasma. O espectro de emissão de um elemento exposto à fonte consiste em uma coleção dos comprimentos de onda emitidos, comumente denominados “linhas de emissão”, devido à natureza discreta dos comprimentos de onda emitidos. O espectro de emissão pode ser utilizado como uma característica única do elemento para identificação qualitativa. A emissão atômica utilizando arco elétrico vem sendo amplamente utilizada em análises qualitativas.

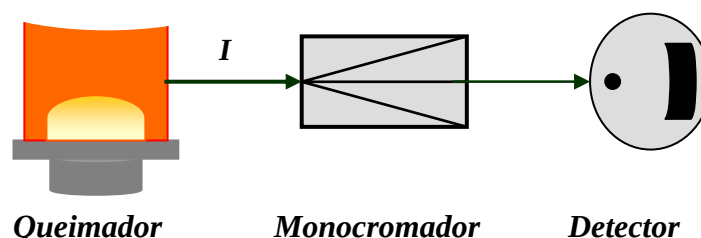


Figura 3: Espectroscopia de emissão atômica

Técnicas de emissão também podem ser utilizadas para determinações quantitativas. A intensidade da luz emitida no comprimento de onda característico do elemento a ser determinado é quantificada, e esta emissão será maior de acordo com o número de átomos do analito presente na amostra. A técnica de Fotometria de Chama é uma aplicação da emissão atômica para análises quantitativas.

Quando a luz de um único e exato comprimento de onda incidir em átomos no estado fundamental, os átomos podem absorver esta luz e atingirem um estado excitado, e este é o princípio fundamental da Absorção Atômica, processo ilustrado na Figura 4. A quantidade de interesse em determinações por absorção atômica é a quantidade de luz que é absorvida durante a passagem pelo interior da nuvem de átomos. Quando o número de átomos no caminho do feixe de luz aumenta, a quantidade de luz absorvida aumenta proporcionalmente. A quantificação da diferença entre a quantidade de luz emitida pela fonte e a quantidade de luz que passou pelo interior da nuvem de átomos corresponde à concentração de átomos do analito na amostra.

O uso de fontes especiais de radiação em comprimentos de onda cuidadosamente selecionados permite determinações individuais de elementos em presença de outros.

A nuvem atômica necessária para as determinações por absorção atômica é produzida por suplemento suficiente de energia térmica, que promove a dissociação dos componentes químicos em átomos livres. Estes átomos livres, em contato com a radiação proveniente da fonte externa, são então promovidos para estados excitados, e esta energia absorvida para promover a mudança é o fator que possibilita a quantificação dos elementos na amostra. Todo o processo de quantificação do analito está diretamente relacionado com a eficiência da etapa de atomização, se esta for eficiente, a maioria dos átomos estará na forma do estado fundamental e serão capazes de absorver a radiação proveniente da fonte.

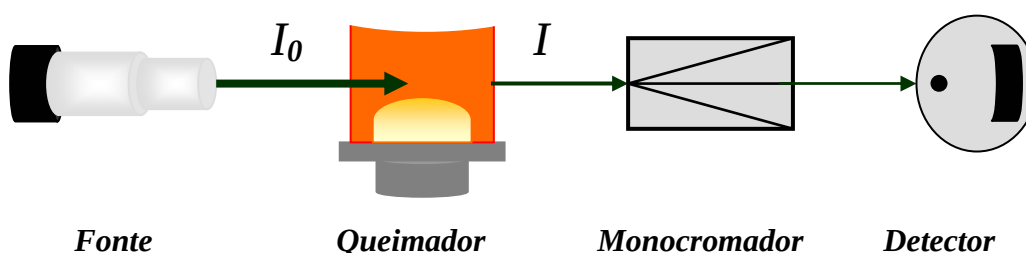


Figura 4 - Espectroscopia de Absorção Atômica.

A facilidade, a velocidade, a exatidão e a precisão das determinações fazem da absorção atômica um dos mais populares métodos para determinação de metais nos mais variados tipos de amostras.

O último campo em Espectroscopia Atômica é a fluorescência atômica (Figura 5), técnica que incorpora fundamentos da absorção atômica e da emissão atômica. Como em absorção atômica, os átomos no estado fundamental são introduzidos na chama e excitados pela radiação que atravessa a nuvem atômica pelo processo de atomização. A quantidade de radiação absorvida durante o processo assemelha-se ao que é observado na absorção atômica, no entanto, a emissão resultante do decaimento de energia dos átomos excitados, é quantificada como é observado no processo de emissão atômica. A intensidade desta "fluorescência" aumenta com o aumento da concentração de átomos, proporcionando as bases para as análises quantitativas.

Outra diferença básica da fluorescência está no posicionamento da fonte de radiação, que se encontra formando um ângulo com o resto do sistema óptico. Desta maneira, o detector de radiação recebe somente a fluorescência criada dentro da chama, e não diretamente a radiação proveniente da fonte. Este fato é uma vantagem, pois minimiza o efeito da intensidade da fonte, aumentando a sensibilidade do equipamento devido a maior facilidade de quantificação da energia emitida pelos átomos excitados sem a interferência da emissão proveniente da fonte.

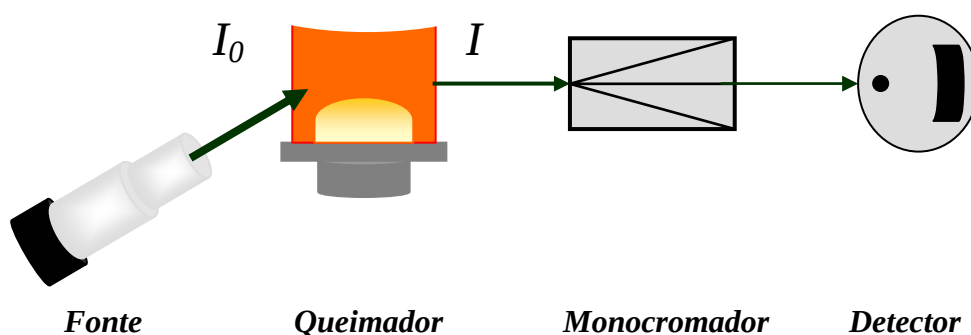


Figura 5. Espectroscopia de Fluorescência Atômica.

A técnica de emissão atômica é a mais adequada na determinação dos metais alcalinos, dentre eles o sódio, o potássio e o lítio, devido ao fato de eles emitirem no visível e não necessitarem de uma fonte térmica muito potente para promover os elétrons de valência ao estado excitado.

Dentre as aplicações da técnica de fluorescência atômica estão as suas análises de metais, principalmente alumínio, em materiais como óleos lubrificantes, substâncias biológicas, etc.

A técnica de absorção atômica é uma forma mais sensível para a determinação quantitativa de mais de 60 metais e metalóides. A absorção atômica é a mais utilizada entre as três técnicas e normalmente oferece inúmeras vantagens sobre as demais, mas dependendo do tipo de amostra e do analito em questão, benefícios particulares podem ser obtidos pelo uso da emissão atômica ou pelo uso da fluorescência atômica.

1.1.4.2. Análises Quantitativas em Absorção Atômica

Uma fonte, geralmente uma lâmpada de cátodo oco (HCL), emite radiação em um comprimento de onda determinado, e com intensidade inicial I_0 . Esta radiação está direcionada para a chama que contém os átomos no estado fundamental. A intensidade inicial de radiação (I_0) sofre decréscimo devido à absorção de parte desta energia pelos átomos que passaram do estado fundamental para o estado excitado. A radiação que chega até o sistema detector com diminuição de intensidade, é denominada I , e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de I e I_0 . A diferença de intensidade entre I e I_0 corresponde à concentração do analito dentro da amostra, como será detalhado a seguir.

Relação entre I_0 , I e concentração:

Diversos termos são utilizados para definir a quantidade de radiação que sofreu variação. A “transmitância”, que é um desses termos, é definida como a razão entre a intensidade final e inicial de radiação (Equação 2).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 2}$$

A transmitância indica uma fração inicial da radiação que passa pelo caminho da chama e chega até o sistema detector. A porcentagem de transmitância é simplesmente a transmitância expressa em termos de porcentagem (Equação 3).

$$\% T = 100 \times \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad \text{Equação 3}$$

A porcentagem de absorção é um complemento da porcentagem de transmitância definida como a porcentagem da intensidade de radiação que é absorvida dentro da chama pelos átomos (Equação 4).

$$\% A = 100 - \% T \quad \text{Equação 4}$$

O termo absorbância é puramente uma quantidade matemática que pode ser representado pela Equação 5:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad \text{Equação 5}$$

A absorbância também é o termo mais conveniente para caracterizar a radiação em espectrometria de absorção, principalmente porque a absorbância segue uma relação linear com a concentração, definida pela "Lei de Beer" (Equação 6).

$$A = abc \quad \text{Equação 6}$$

onde:

A = absorbância;

a = coeficiente de absorção (uma constante que é característica da espécie absorvendo em um comprimento de onda específico);

b = comprimento do caminho percorrido pela radiação dentro da chama;

c = concentração das espécies.

Esta equação representa, simplificada, que a concentração é diretamente proporcional à concentração dos átomos que absorvem dentro dos parâmetros pré-estabelecidos de análise.

A proporção direta entre concentração e absorbância é claramente evidenciada quando soluções com concentrações conhecidas são utilizadas na construção das curvas analíticas. Quando a absorbância é "plotada" em função da concentração, uma relação de linearidade é observada para certos intervalos de concentração (Figura 6). Dentro

destas regiões aonde a Lei de Beer é mantida, o crescimento da absorbância é diretamente proporcional ao crescimento da concentração.

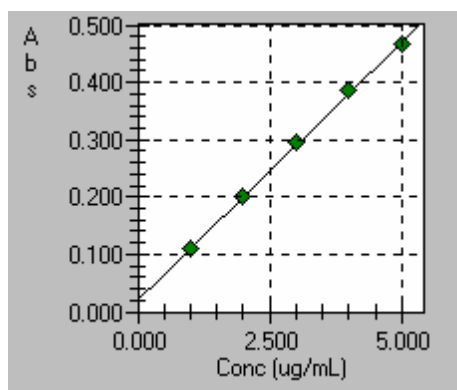


Figura 6. Curva analítica para o íon metálico cobre.

Quando a concentração e a absorbância aumentam, observa-se um comportamento não ideal no processo de absorção em função da concentração, o que acarreta desvios da linearidade (não representado na Figura 6).

O comportamento linear apresentado entre concentração e absorbância em determinados intervalos de concentração é a base para a construção das “curvas de calibração” (ou curvas analíticas). Com o uso das curvas de calibração é possível determinar a concentração dos analitos nas amostras por interpolação, ou por extrapolação dos valores obtidos nestas curvas.

1.1.5. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite – GFAAS²⁵⁻²⁷

O conceito de atomização eletrotérmica foi introduzido por L'vov em 1959, mas tornou-se bem conhecido a partir de uma publicação de 1961. Neste trabalho, a amostra era depositada na superfície de um eletrodo móvel de grafite e, em seguida, introduzida em um tubo de grafite revestido com uma folha de tântalo, o qual era aquecido eletricamente. Este sistema possibilitava a atomização da amostra numa única etapa, fornecendo uma nuvem atômica mais concentrada e, dessa maneira, uma melhor sensibilidade era alcançada, com menor consumo da amostra.²⁶

A técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), apesar de ser geralmente monoelementar, é adequada para a determinação de

baixas concentrações de metais e semimetais, apresentando alta sensibilidade, uma vez que a alíquota da amostra colocada dentro de tubo de grafite (forno) é atomizada em um curto período de tempo, e o tempo de residência média dos átomos no caminho óptico é de aproximadamente 1 segundo (Figuras 7 e 8). Além disso, a técnica apresenta boa seletividade, requer pequenos volumes de amostra e possui limites de detecção, para a maioria dos elementos, em concentrações da ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.²⁷

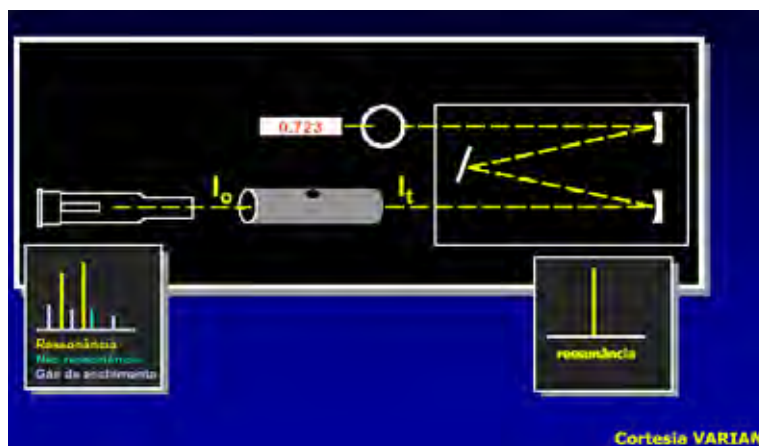


Figura 7. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.

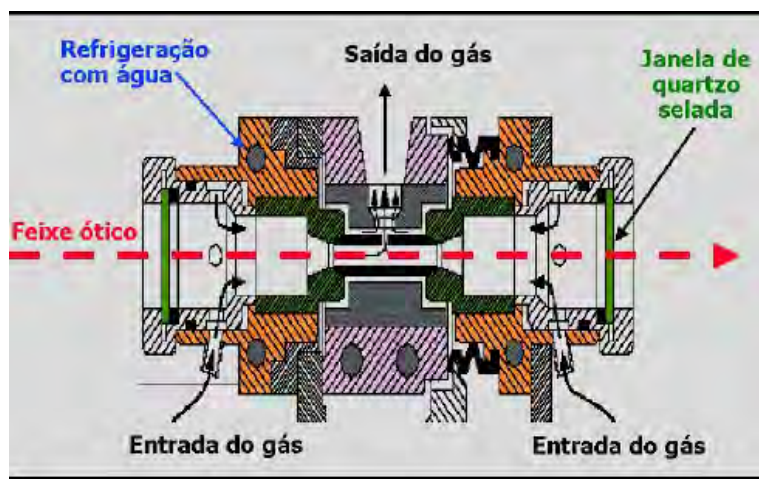


Figura 8. Representação de corte de forno de grafite com aquecimento longitudinal Varian.

Na atomização eletrotérmica em forno de grafite, o solvente, o ácido ou a mistura azeotrópica da amostra é evaporada em temperaturas da ordem de 200-250 °C, etapa denominada de secagem (Figura 9).

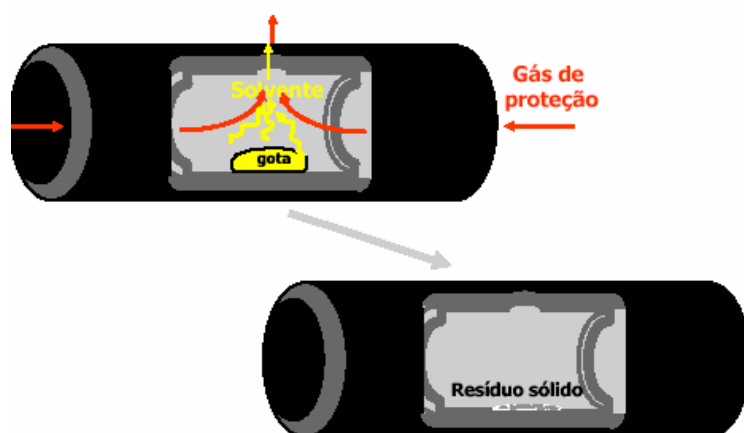


Figura 9. Etapa de secagem da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.

Após a etapa de secagem, a matéria orgânica e outros concomitantes da amostras são incinerados em temperaturas da ordem de 450-1600 °C, separando assim o analito (metal, semimetal) dos outros componentes da matriz sólida. Esta etapa do processo é denominada de pirólise (Figura 10). Após a etapa de pirólise, a corrente elétrica responsável pelo aquecimento do tubo de grafite é aumentada rapidamente até uma amperagem que eleve a temperatura na ordem de 2000 °C a 3.000 °C, provocando formação de uma nuvem atômica dos analitos metálicos. Esta etapa é denominada de atomização (Figura 11) e ocorre em um período de milissegundos até segundos. Nesta etapa a medida de absorção da radiação é feita na região imediatamente acima da superfície do tubo.

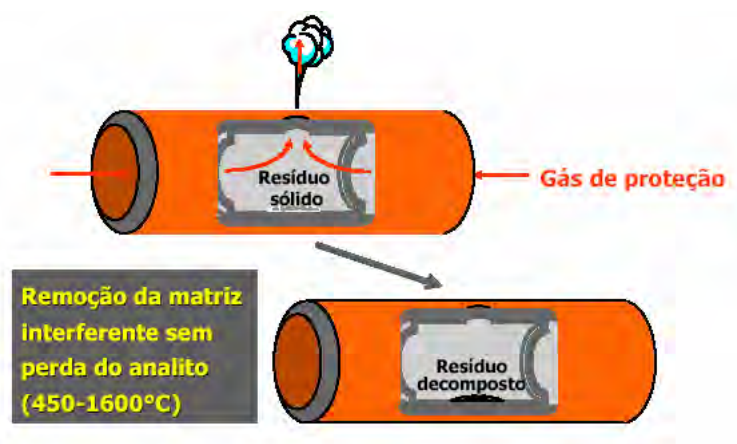


Figura 10. Etapa de pirólise da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.

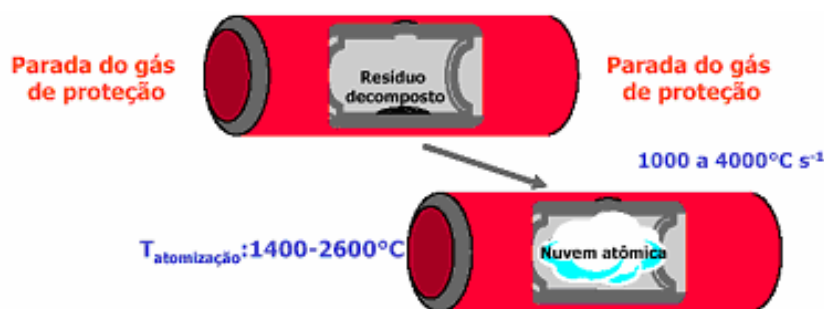


Figura 11. Etapa de atomização da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.

Após a medida da absorbância da analito, é feita então uma etapa de limpeza, para remoção de traços do analito metálico evitando assim o chamado “efeito de memória”. As etapas de secagem, pirólise e limpeza, são assistidas por uma corrente de argônio (fluxo de $\cong 1 \text{ L min}^{-1}$) para remover os componentes da matriz volatilizados em cada etapa. As quatro etapas envolvidas no processo de atomização para determinação de um analito por GFAAS estão sumarizadas no gráfico da Figura 12.

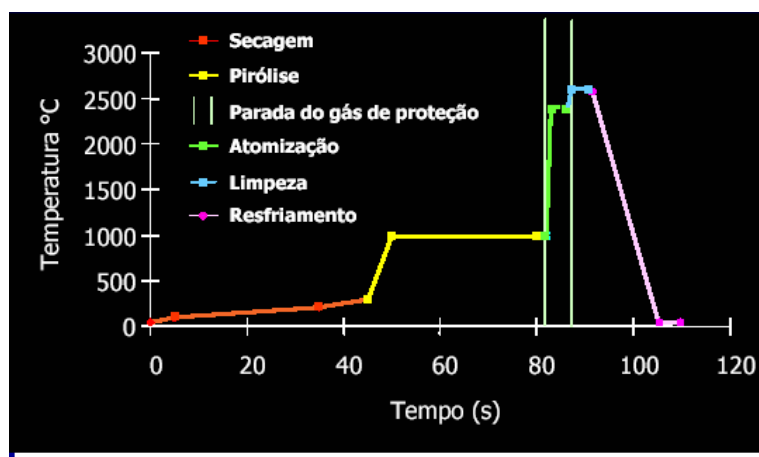


Figura 12. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

1.1.6. Determinação de nutrientes metálicos em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A determinação de nutrientes metálicos em amostras biológicas (vegetais, sangue, fezes de animais, alimentos, etc.) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) proporciona diversas vantagens. Dentre elas podemos citar a alta sensibilidade da técnica, com limites de detecção em níveis de ng kg^{-1} , a utilização de pequenos volumes de amostra, a 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.²⁸

A amostragem de sólidos na forma de suspensão apresenta vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito, por manipulação excessiva ou retenção sobre produtos insolúveis, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista.^{29, 30}

A pré-concentração da amostra por evaporação do solvente, utilizando-se a queima da matriz em mufla a 600 °C, é uma das formas utilizadas para aumentar a sensibilidade da técnica de quantificação do analito, quando fatores de pré-concentração de 10 a 40 podem ser obtidos. Este procedimento de pré-concentração é utilizado principalmente na determinação de elementos traço em amostras de sangue.³¹

Quando se trabalha com amostragem de sólidos na forma de suspensões, a homogeneidade da suspensão, a utilização de agentes protetores e antiaglutinantes, o tamanho das partículas, a utilização de modificadores químicos e de corretor de fundo adequados, são os principais fatores para se conseguir uma boa exatidão e precisão nas medidas analíticas.³²

1.1.7. Outras aplicações da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A determinação de elementos voláteis em amostras de solos e sedimentos tem sido feita utilizando-se suspensões dessas matrizes. Suspensões da ordem de 0,5 a 3 % (m/v) em ácido fluorídrico (HF), com injeção de 1% (m/v) de níquel (Ni) como modificador químico, possibilita a determinação de selênio (Se) nessas amostras,

eliminando-se assim a etapa de extração/digestão manual que envolve a utilização de reagentes perigosos.³³

Determinações de chumbo, selênio e cádmio em suspensões de alimentos para bebês por GFAAS, podem ser feitas em meio de Triton X-100 0,1 % (m/v), H₂O₂ 30% (v/v) e HNO₃ 1 % (v/v). Os modificadores de matriz mais eficientes neste método são: Ni 0,5 % (m/v) para selênio, Ni + NH₄H₂PO₄ 1 % (m/v) para cádmio e NH₄H₂PO₄ 1 % (m/v) para chumbo. A calibração do equipamento pode ser feita utilizando-se padrões aquosos para selênio e chumbo, para cádmio deve-se utilizar o método da adição de analito.³⁴

Nas últimas décadas diversos trabalhos têm destacado a importância da utilização de modificadores químicos adequados nas determinações de metais traços por GFAAS, tanto em amostras líquidas quanto em suspensão.³⁵⁻⁴⁶ O uso do modificador nessas determinações, visa obter uma temperatura de pirólise o mais elevada possível ao analito, para garantir a remoção da matriz com eficiência. De uma maneira geral, temperaturas a partir de 1000 °C têm se mostrados suficientes para a pirólise total da matriz.

Modificadores químicos como níquel e paládio estão entre os mais utilizados em determinações de elementos traços por GFAAS. A mistura desses modificadores estabiliza elementos voláteis, como o selênio, permitindo a utilização de temperaturas de pirólise da ordem de 1000°C, permitindo assim a eliminação quase que total dos componentes da matriz.³⁵

A utilizações de níquel e cobre e a mistura de cobre com nitratos de ferro e magnésio tem se mostrado eficiente na estabilização de diferentes espécies químicas de selênio para posterior determinação desse analito por GFAAS. A mistura de cobre com nitrato de magnésio apresenta-se como melhor modificador, quando comparado ao níquel. Essa mistura de modificadores, proporciona melhor sensibilidade e estabilização do selênio em seus três estados de oxidação até 1100 °C.³⁶

O paládio, quando misturado com nitrato de magnésio, proporciona a estabilidade térmica de cerca de 21 elementos a altas temperaturas, eliminando a maior parte dos componentes de várias matrizes. Essa mistura é considerada como modificador químico universal.³⁷ Essa mistura de modificadores, destaca-se principalmente na determinação de elementos voláteis (Ex. arsênio, selênio), presentes na forma de traços em amostras de água mineralizadas utilizadas na medicina. O uso desses modificadores elimina principalmente a alta absorção de fundo, causada pela

grande concentração de sódio presente nessas amostras, e a contaminação do tubo de grafite devido à alta concentração de sulfato.³⁸

A mistura de cloreto de paládio com cloreto de cádmio permite a determinação de elementos voláteis, como selênio, em amostras de aerodispersóides (Ex. fuligem de carvão) por GFAAS. Essa mistura de modificadores, permite a remoção dos concomitantes da matriz, e elimina a interferência do ferro, elemento comum presente nesse tipo de amostra.³⁹

A utilização de compostos orgânicos como modificadores químicos, como a glicose, tem sido proposta para determinação de antimônio e selênio em suspensões de amostras biológicas por GFAAS. Misturas da amostra com a glicose nas proporções 0,001 % (m/v) e 2% (m/v), permite a estabilização térmica do selênio e antimônio até 1300 °C. A interferência espectral causada pela presença de fosfato, principalmente em relação ao selênio, é bastante minimizada.⁴⁰ Outra mistura alternativa de modificadores utilizada na determinação de selênio, é a de platina com níquel. O uso desse modificador na determinação direta de selênio em amostras de sucos de frutas silvestres por GFAAS, permite a eliminação de interferências espectrais causadas principalmente por potássio, fosfato e cálcio.⁴¹

Um método alternativo para determinação direta de elementos voláteis em amostras biológicas por GFAAS, consiste na diluição da amostra em solução a 10% de aminas terciárias e a adição de nitrato de paládio como modificador químico. Nessas condições, consegue-se diminuir o tempo de análise, o consumo de reagentes, o risco de contaminação, além disso, a sensibilidade aumenta significativamente, principalmente para elementos como o selênio.⁴²

De uma maneira geral, a utilização de paládio como modificador de matriz, mais especificamente de nitrato de paládio, tem se mostrado mais eficiente. Mesmo em determinações de suspensões de amostras biológicas, esse modificador proporciona a quantificação de diversos elementos, principalmente os voláteis como selênio, arsênio e antimônio, uma melhoria da estabilidade térmica e do perfil do sinal transiente, uma melhoria da exatidão e da precisão do método, além é claro de proporcionar o aumento significativo da sensibilidade.⁴³⁻⁴⁵ A capacidade do paládio em estabilizar elementos, como o selênio, em elevadas temperaturas de pirólise, está relacionada à formação de um composto intermetálico, que mantém o elemento estável termicamente em temperaturas superiores a 900 °C.⁴⁶

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K. **Nutrição animal**. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 550p.
2. ANDRIGUETO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMING, J.S.; SOUZA, G.A.; BONA-FILHO, A. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1982. v.1, 395p.
3. CHO, C.Y. La energia en la nutrición de los peces. In: MONTEROS, J.A.E.; PINA, I.; KREVSKY, B. (Eds). **Nutrición en acuicultura II**. Madrid: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, 1987, p. 197-237.
4. HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.66, n.2, p.163-179, nov. 1987.
5. HIGUERA, M. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. In: MONTEROS, J.A.E., LABARTA, M. (Eds). **Nutrición en acuicultura II**. Madrid: Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, 1987. p. 291-318.
6. NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academy Press, 1993. 124p.
7. HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. New York: Cambridge University Press, 1988. 388p.
8. SULLIVAN, J.A.; REIGH, R.C. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Aquaculture**, v.138, n.1-4, p.313-322, dez. 1995.

9. AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal tract. **Aquaculture**, v.13, n.3, p. 265-272, mar. 1978.

10. KANE, E.A.; JACOBSON, W.C.; DAMEWOOD, P.M. Jr. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **Journal of Dairy Science**, v.42, n.8, p. 1359-1366, 1959.

11. RINGO, E. The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water-reared Arctic char (*Salvinus alpinus*). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.24, p.31-34, 1993.

12. DELANOUE, J.; CHOUBERT, G. Digestibility in rainbow trout: Comparison of the direct and indirect methods of measurement. **Progressive Fish-Culturist**, v.48, n.3, p.190-195, jul. 1986.

13. SILVA, S.S.; PERERA, K.M. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry effect of dietary levels and salinity with further observation of variability digestibility. **Aquaculture**, v.38, n.4, p.293-306, jun. 1984.

14. SHAHAT, T.M., Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. **Veterinary Medical, Journal Giza**, v.41, n.3, p.83-91, 1993.

15. BELCHIER, R.; FORSTER, H. **The destruction of organic matter**. New York: Pergamon Press, 1970. p.19-26.

16. MARCZENKO, Z. **Spectrophotometric determination of elements**. Chichester: Ellis Horwood, Halsted Press, 1976. p.211-215.

17. MCDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. New York: Academic Press, 1992. p.1-18.

18. SOLOMONS, N.W. **Absorption and malabsorption of mineral nutrients**. New York: Alan R. Liss, New York, 1992. 125p.

19. SMITH, R.M. **Trace elements in human and animal nutrition**. New York: Academic Press, 1987. 480p.
20. UNDERWOOD, E.J. **Trace elements: toxicants occurring naturally foods**. Washington: National Academy Science, 1973.
21. PULS, R. **Veterinary trace mineral deficiency and toxicity information**. Publication n°5139. Information Services Agriculture. Ottawa, 1981.
22. TACON. A.G.J. **Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. The essential nutrients**. Washington: Argent Laboratories Press-Redmond, 1990. v.1, p.95.
23. HILTON, J. W. The interaction of vitamins, minerals and composition in the diet of fish. **Aquaculture**, v.79, n.1-4, p. 223-244, jul.1989.
24. LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 260p.
25. RICHARD, D.B.; JACK, D.K. **Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry**. The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA, 1993.
26. VOLYNSKY, A.B. Terminology for the modification of graphite tubes with high-melting carbides used in electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.50, n.11, p.1417-1419, sep.1995.
27. VOLYNSKY, A.B.; SEDYKH, E.M. Principal processes in graphite atomizers modified by high-melting carbides. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.4, n.1, p.71-76, 1989.

28. MILLER-IHLI, N.I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.345, n.7, p.482-489, mar. 1993.
29. BENDICHO. C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.6, n.5, p.353-374, aug. 1991.
30. LIANG, Y.Z.; LI, M.; RAO, Z. Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Science**, v.12, n.4, p.629-633, aug.1996.
31. MINAMI, H.; INOUE, Y.; SAKATA, K.; ATSUIA, I. Determination of traces levels of selenium in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with a solid sampling technique. Application of pre-ashing concentration technique. **Analytical Science**, v.13, n.3, p.397-402, mar.1997.
32. CHEM W.K.; YEN, C.C.; WEI, B.L.; HU, C.C.; YU, J.J.; CHUNG, C.; KUO, S.C. Direct determination of selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry using automated ultrasonic slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, n.1, p.131-138, jan.1998.
33. LOPES-GARCIA, I.; SANCHES-MERLOS, M.; HERNANDES-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium in soil and sediments using slurry sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.11, n.10, p.1003-1006, oct. 1996.
34. VINAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, v.412, n.1-2, p.121-128, may 2000.
35. GRAMMELGAARD, B.; JONS, O. 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**, v.12, n.4, p.465-470, apr.1997.

36. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPE, U. Influence of the valence state on the determination of selenium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.39, n.1-2, p.501-510, 1984.

37. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J.R. Palladium nitrate - magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry .5. Performance for the determination of 21 elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, n.8, p.1257-1271, dec. 1992.

38. FISCHER; J.L., RADEMEYER, C.J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) Part 2: selenium with palladium modifiers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, n.4, p.549-567, apr.1998.

39. ALLER, A., J. Atomization characteristics of selenium from graphite tube in the presence of calcium and chemical modifier. **Analytical Science**, v.13, n.2, p.183-194, feb.1997.

40. GARCIA-OLALLA, C.; ROBLES, L.C.; ALEMANY, M.T.; ALLER, A.J. Determination of selenium in coal fly ashes by graphite atomic absorption spectrometry using a cadmium-palladium chemical modifier. **Analytica Chimica Acta**, v.247, n.1, p.19-25, jun.1991.

41. LIU, Y.; GONG, B.; LI, Z.; XU, Y.; LIN, T. Direct determination of selenium in a wild fruit juice by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.43, n.7, p.985-989, jul.1996.

42. BOZSAI, G. Determination of arsenic, cadmium, lead, and selenium in highly mineralized waters by graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.37, n.6, p.545-549, jun.1990.

43. ALEIXO, P.C.; NOBREGA, J.A.; SANTOS JR., D.; MULLER, R.C.S. Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. **Química Nova**, v.23, n.3, p. 310-312, jun.2000.
44. PEREZ-CORONA, M.T. DELACALLEGUNTINAS, M.B.; MADRID, Y.; CAMARA, C. Glucose as a chemical modifier for the determination of antimony and selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.10, n.4, p.321-324, apr.1995.
45. STYRIS, D.L.; PRELL, L.J.; REDFIELD, D.A.; HOLCOMBE, J.A.; BASS, D.A.; MAJIDI, V. Mechanisms of selenium vaporization with palladium using electrothermal atomization and mass-spectrometric detection. **Analytical Chemistry**, v.63, n.5, p.508-517, mar.1991.
46. QUIAO, H.; JAKSON, K.W. Modification by by palladium in the analysis of slurries by graphite furnace atomic absorption spectrometry: a physical mechanism. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.47, n.11, p.1267-1276, oct.1992.

Anexo I

Lista de abreviações

Cr_2O_3 : Óxido de Crômio (III)

HNO_3 : Ácido Nítrico

HClO_4 : Ácido Perclórico

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$: Íons Dicromato

H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio

HF : Ácido Fluorídrico

Ni: Níquel

Ni + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: Níquel + Fosfato diácido de amônio

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: Fosfato diácido de amônio

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

λ : Comprimento de onda

HCL: “Hollow cathode lamp” ou Lâmpada de catodo oco

I_0 : Intensidade de radiação que chega à chama

I: Intensidade de radiação que não foi absorvida na chama

T: Transmitância

%T: porcentagem de Transmitância

A: Absorbância

%A: porcentagem de Absorbância

Determinação de Cr em suspensões de fezes de peixes por GFAAS para estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes em rações utilizadas em piscicultura

Resumo

No presente trabalho um método simples, rápido e sensível é proposto para determinação de cromo (utilizado como marcador biológico de rações de peixes) em amostras de fezes de peixes por GFAAS utilizando-se a introdução direta de suspensões das amostras no tubo de grafite do espectrômetro. Amostras de fezes e de rações contendo de 0,10 a 1,00 mg kg⁻¹ de Cr₂O₃ (isentas de minerais) foram moídas em moinho criogênico. Após este procedimento as amostras apresentaram granulometria menor que 60 µm. As suspensões foram preparadas misturando-se, diretamente no copo do amostrador automático do espectrômetro, 20 mg de amostras de ração, ou fezes, com 1 mL de solução contendo 0,005% v/v de Triton X-100 e 0,50% v/v de HNO₃ suprapuro. Após sonificação durante 20 segundos, 10 µL de suspensão foram injetados para dentro do tubo de grafite que continha, na sua parede interna, uma película de paládio metálico que atuou como modificador químico permanente. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados em relação a 20 leituras do branco das suspensões (2% m/v de fezes ou ração isentas de minerais), foram de 0,81 e 2,70 µg L⁻¹ de Cr₂O₃ para as suspensões padrão de fezes, 0,84 e 2,83 µg L⁻¹ de Cr₂O₃ para as suspensões padrão de ração. O método proposto foi aplicado em estudos de digestibilidade/disponibilidade de nutrientes em diferentes rações de peixes e mostraram-se de acordo com os resultados obtidos, utilizando-se amostras previamente mineralizadas por digestões ácidas.

Palavras-chave: Suspensões de rações e fezes de peixe; GFAAS; Modificador químico; Paládio metálico.

Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture

Abstract

This paper presents a simple, fast and sensitive method to determine chromic oxide (used as a biological marker of fish feed) in samples of fish feces by GFAAS through the direct introduction of slurries of the samples into the spectrometer's graphite tube. The standard samples of feces and of fish feed containing 0.10 to 1.00 mg kg⁻¹ of Cr₂O₃ were pre-frozen for 1 minute in liquid nitrogen and then ground a cryogenic mill for 2 minutes, which reduced the samples' grain size to less than 60 µm. The standard slurries were prepared by mixing 20 mg of standard samples of fish feed or feces with 1 mL of a solution containing 0.05 % v/v of Triton X-100 and 0.50 % v/v of suprapure HNO₃ directly in the spectrometer's automatic sampling glass. The final concentrations of Cr₂O₃ present in the standard slurries were 2, 4, 8, 16 and 20 µg L⁻¹. After sonicating the mixture for 20 seconds, 10 µL of standard slurries were injected into the graphite tube, whose internal wall was lined with a metallic palladium film that acted as a permanent chemical modifier. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) calculated for 20 readings of the blank of the standard slurries (2% m/v of feces or feed devoid of minerals) were 0.81 and 2.70 µg L⁻¹ of Cr₂O₃ for the standard feces slurries, 0.84 and 2.83 µg L⁻¹ of Cr₂O₃ for the standard feed slurries. The proposed method was applied in studies of nutrient digestibility of different fish feeds and its results proved compatible with the results obtained from samples pre-mineralized by acid digestion.

Keywords: Slurries samples; GFAAS; Metallic palladium; chromic oxide.

1. INTRODUÇÃO

No estudo de nutrição de peixes, a determinação da digestibilidade dos nutrientes das rações utilizadas na alimentação desses animais, é o primeiro cuidado quando se pretende avaliar o potencial de inclusão da dieta.¹ Conhecendo-se o grau de digestibilidade do alimento, pode-se descrever a fração do nutriente ou da energia do alimento que não é excretado nas fezes do animal.² A substituição de determinados produtos e subprodutos da agroindústria, empregados como ingredientes das dietas de peixes, por produtos sucedâneos, tem sido feita com bases em estudos de digestibilidade dos nutrientes desses alimentos e tem-se apresentado como prática econômica alternativa.³

Na determinação da digestibilidade de alimentos por 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 ou administrados por outra via ao animal.⁴ Os marcadores externos são os mais utilizados nos estudos de digestibilidade com peixes, sendo o Cr_2O_3 o marcador que apresenta melhor aceitação por ser completamente indigestível e não absorvível, não ter ação farmacológica no aparelho digestório e passar uniformemente através do aparelho digestório.⁵⁻⁷

A determinação da porcentagem de Cr_2O_3 nas fezes dos peixes permite estimar o coeficiente de digestibilidade total ou parcial dos nutrientes metabolizados, comparando-se com a porcentagem desse óxido que é misturado inicialmente na ração.⁸ Para isso, os peixes são mantidos em aquários circulares com volume de 250 L onde são alimentados com rações marcadas com 0,1% de Cr_2O_3 . Decorrido o período de alimentação, os peixes são transferidos para aquários de coleta de fezes (também com volume de 250 L), que possuem o fundo cônico para favorecer a decantação das fezes. As fezes são coletadas após decantação e retirada da água sobrenadante, sendo em seguida centrifugadas, secas em estufa, moídas e conservadas a -20°C .⁹ A determinação da composição química-bromatológica e da porcentagem de Cr_2O_3 nas rações e fezes, permite estimar o coeficiente de digestibilidade total ou parcial dos nutrientes metabolizados pelo animal.¹⁰

A determinação da porcentagem de óxido tanto nas fezes como nas rações, apresenta dificuldades nos procedimentos de preparo das amostras. Normalmente a

mineralização das amostras é feita por aquecimento lento (60-80°C) em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica (5mL de HNO₃ conc. + 2 mL de HClO₄ conc.).¹¹ Os extratos resultantes são soluções ácidas de dicromato (Cr₂O₇²⁻), que normalmente é quantificado pelo método espectrofotométrico da difenilcarbazida.¹² Este procedimento além de demorado, apresenta o inconveniente de oxidar o crômio (III) a crômio (VI), espécie altamente tóxica.

A determinação de nutrientes metálicos em amostras biológicas (vegetais, sangue, fezes de animais, alimentos, etc.) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) proporciona diversas vantagens, como alta sensibilidade, limites de detecção em níveis de $\eta\text{g kg}^{-1}$, 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.¹³ Considerando a etapa de tratamento da amostra, procedimentos utilizando amostragem de sólidos na forma de suspensão permitem obter vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito por manipulação excessiva ou retenção sobre produtos insolúveis, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista.^{14,15}

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de crômio, em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes por GFAAS, de modo a eliminar a etapa de mineralização das amostras e permitir a estimativa da digestibilidade de nutrientes em amostras de rações utilizadas na nutrição de peixes.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes, soluções padrão e vidrarias

Água deionizada de alta pureza (18,2 M Ω cm⁻¹) obtida por sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, EUA), HNO₃ suprapuro (Merck), HClO₄ (Merck) e Triton X-100 (Merck) foram utilizados em todo o trabalho. A solução de trabalho contendo Pd, 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 50 g L^{-1} de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck).

Soluções estoque dos analitos e dos concomitantes foram preparadas a partir de reagentes 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.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com HNO_3 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por agitação antes da utilização.

2.2. Preparo das amostras

As amostras de fezes e rações de peixes após secagem a 50°C em estufa de circulação forçada de ar por 48 horas, foram submetidas à moagem criogênica, em moinho criogênico (SPEX – Freezer, modelo Mill 6750). Para isso, uma massa de aproximadamente 1,0 g da amostra foi colocada em frasco de polycarbonato 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 $60 \mu\text{m}$.¹⁶

Uma parte das amostras foi também mineralizada em forno de microondas (Provecto Analítica – Campinas/SP, modelo DGT plus). 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 HNO_3 suprapuro concentrado mais 0,50 mL de HClO_4 concentrado. O programa de aquecimento utilizado foi o proposto no manual do equipamento.

2.2.1. Preparo das suspensões das amostras

Após a moagem criogênica, 20 mg de amostras do material biológico (ração ou fezes de peixes), foram transferidas diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 5 μL de HNO_3 suprapuro 14 mol L^{-1} , 50 μL de Triton X-100 a 1% v/v e 945 μL de água ultrapura. As amostras de suspensão dos materiais biológicos foram em seguida agitadas por sonificação durante 20 segundos diretamente nos copos do autoamostrador, empregando-se um Desruptor de células ultra-sônico (UNIQUE).

2.3. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com paládio metálico

Os tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada utilizados nas determinações de cromo tiveram suas paredes internas recobertas com paládio metálico. Para isso, alíquotas de 10 μL de solução contendo 10 g L^{-1} do modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ foi injetada dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido às etapas do programa de aquecimento descrito na Tabela 1. Com aquecimento até 500 $^{\circ}\text{C}$ o $\text{Pd}(\text{II})$ depositado sobre a parede do tubo de grafite, forma uma camada de Pd^0 que atua como modificador químico.¹⁷ A massa de Pd^0 depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 506 mg. Com esse tratamento foi possível utilizar o tubo de grafite em 260 queimas de amostras.

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

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa (s)	Aquecimento (s)	Fluxo de Argônio (L min^{-1})
Secagem	95	40	0	0,30
Secagem	120	10	0	0,30
Redução	500	10	5	0,30
Redução	550	5	1	0,30

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius; s: segundo; L min^{-1} : litros por minuto.

2.4. Preparo das curvas analíticas

Curvas analíticas foram preparadas utilizando-se suspensões de rações e de fezes de peixes contendo 2, 4, 8, 16 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3 (Merck), sendo as leituras das absorbâncias feitas por GFAAS. Essas suspensões padrão foram preparadas nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões de amostras de ração e fezes. Também foram preparadas curvas analíticas solubilizando-se 20 mg de cada uma das misturas padrões descritas acima, em solução nítrica/perclórica 1:3 sob aquecimento em forno de microondas, de modo a obter soluções padrão que contivessem 1, 2, 4, 8 e 10 mg L^{-1} de Cr_2O_3 , sendo que as leituras de absorbâncias dessas soluções foram feitas por FAAS.

2.5. 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 no tubo de grafite (recoberto internamente com paládio metálico) pela micropipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com cinco repetições. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de cromo encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de Cr_2O_3 em suspensões de amostras de fezes e rações

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa (s)	Aquecimento (s)	Fluxo de Argônio (L min^{-1})
Secagem	120	10	0	1
Secagem	250	10	0	1
Pirólise	1400	10	20	1
Pirólise	1400	5	10	1
Atomização	2500	1	5	0
Limpeza	2800	5	0	1

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius; s: segundo; L min^{-1} : litros por minuto.

Para determinação de cromo foi utilizado espectrômetro de absorção atômica (SHIMADZU 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 catodo oco de cromo SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 357,9 nm e a resolução espectral foi de 0,5 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 área de pico. Nas leituras de absorbância pelo modulo de chama (FAAS), o gás combustível utilizado foi acetileno, com fluxo constante de 2 L min⁻¹ e ar como gás oxidante, com fluxo constante de 2 L min⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização das condições instrumentais

Nas determinações de metais por GFAAS utilizando-se a técnica de amostragem em suspensão, a obtenção de resultados analíticos exatos e reprodutivos, depende da otimização das temperaturas de pirólise e atomização do analito presente na amostra em suspensão. Dessa forma curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do Cr em suspensões padrão de rações e fezes de peixes que continham 16 µg L⁻¹ de Cr₂O₃, utilizando-se tubo de grafite recoberto internamente com Pd⁰, que atuou como modificador permanente, e as condições de preparo das amostras descritas no item 2.2. As Figuras 1 e 2 mostram a influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre sinal de absorbância obtido para o cromo nas suspensões padrão dos materiais biológicos.

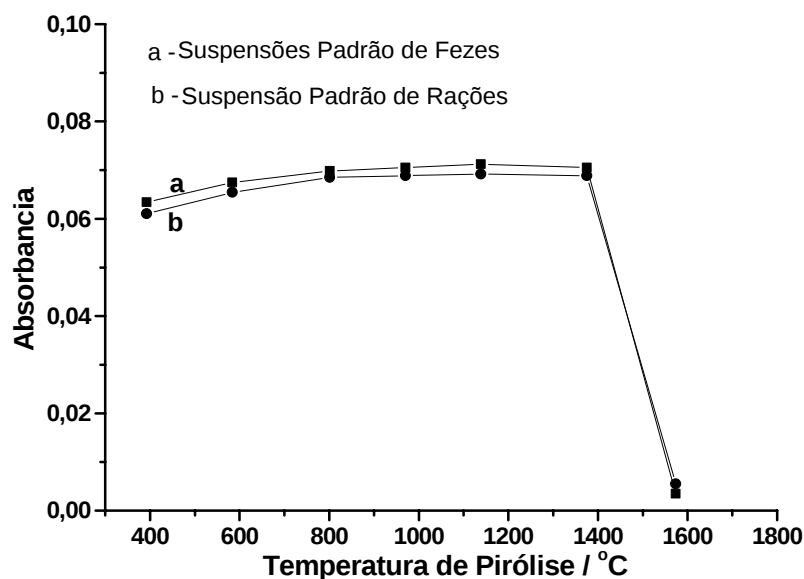


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise das suspensões de amostras de fezes e ração contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3 .

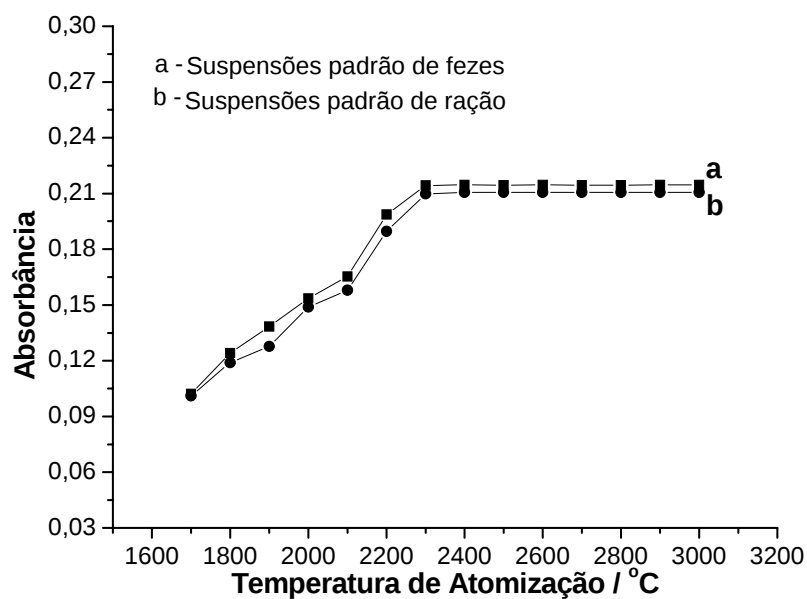


Figura 2. Curvas de temperatura de atomização do Cr nas suspensões de amostras de fezes e ração contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3 .

A temperatura de pirólise de 1400°C foi escolhida, porque conforme mostra a Figura 1, os sinais de absorbância obtidos para o Cr permanecem constantes a partir de 800°C , sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1400°C . Em relação à temperatura de

atomização (Figura 2), observa-se que os sinais de absorbância obtidos para o Cr são constantes a partir de 2300 °C para ambas as suspensões padrão, dessa forma, a temperatura de atomização de 2500°C foi selecionada para todos os demais experimentos.

Os sinais de absorbância do analito (AA) e de absorção de fundo (BG) para as suspensões padrão dos materiais biológicos estão ilustrados nas Figuras 3 e 4. Observa-se em ambas as Figuras uma absorção de fundo relativamente baixa, demonstrando a eficiência do Pd⁰ como modificador químico. Como os materiais biológicos em estudo apresentam teores de magnésio em torno de 0,12 %, esse elemento presente na matriz pode auxiliar na estabilização térmica do crômio.^{16,18}

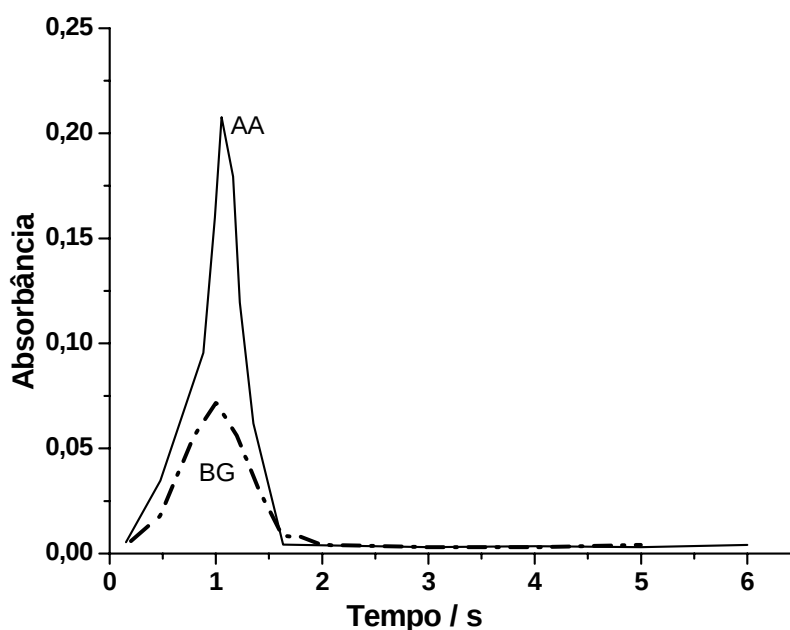


Figura 3. Sinais transientes de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) na atomização de Cr nas suspensões de amostras de fezes contendo 16 µg L⁻¹ de Cr₂O₃.

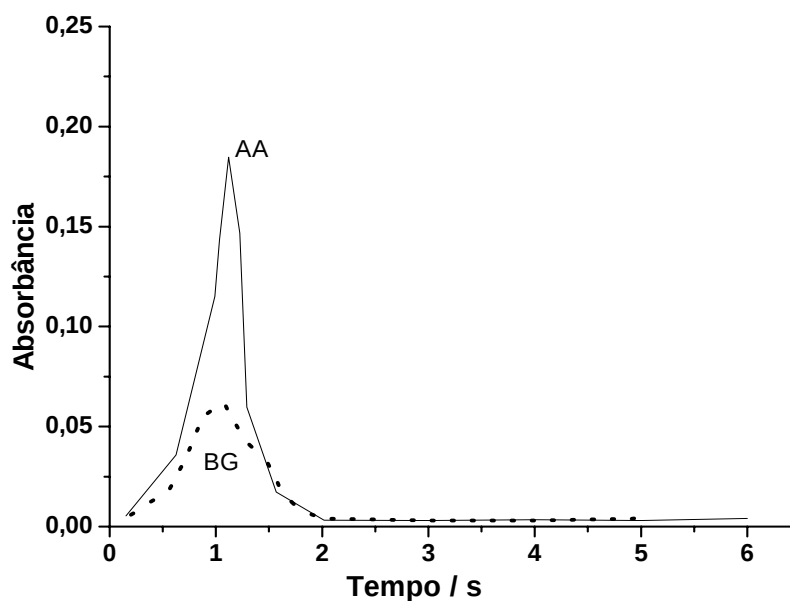


Figura 4. Sinais transientes de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) na atomização de Cr nas suspensões de amostras de ração contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3

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

A agitação ultra-sônica para análise de suspensões de materiais sólidos garante uma boa homogeneização da amostra, o que permite obter melhor reprodutibilidade entre as medidas.¹⁹ Dessa forma, o tempo de sonificação das amostras foi avaliado no intervalo de 5 a 60 s de agitação. Na Figura 5 é mostrada a influência do tempo de sonificação das amostras sobre os sinais de absorbância obtidos para o Cr. Analisando-se a Figura 5, observa-se que os sinais de absorbância permanecem constantes a partir de 20 s de sonificação. Esse tempo de sonificação foi considerado ótimo, pois além de se obter um bom sinal de absorbância, o RSD entre as medidas foi relativamente baixo (3,4%).

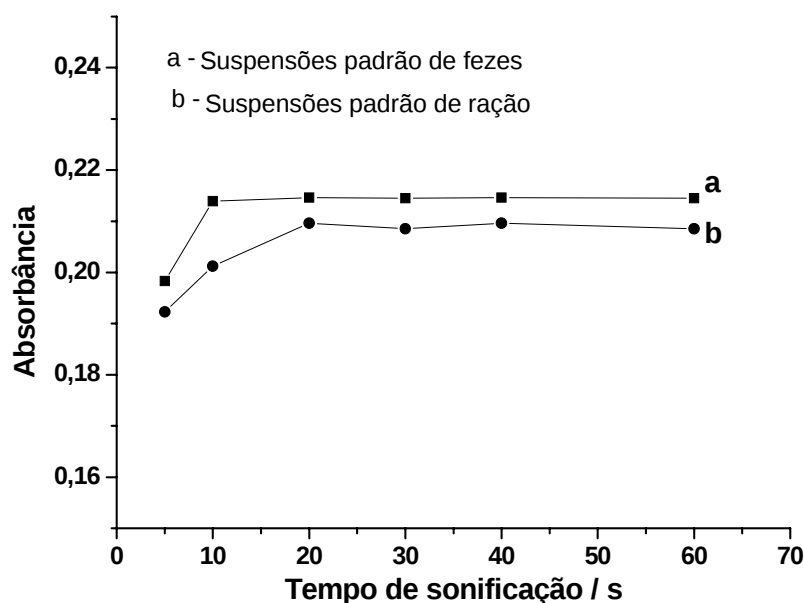


Figura 5. Influência do tempo de ultrasonificação sobre o sinal de absorbância do Cr nas suspensões padrão de fezes e ração de peixe contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3

3.3. Obtenção das curvas analíticas

Considerando-se os parâmetros como temperatura de pirólise e atomização e o perfil de sinal de absorção atômica otimizados, foram construídas curvas analíticas utilizando-se suspensões padrão de fezes e ração de peixes contendo Cr_2O_3 na faixa de $2 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$ (conforme descrito no item 2.5). A Figura 6 mostra as curvas analíticas obtidas com as suas respectivas equações das retas. Comparando-se a curva analítica preparada com fezes de peixes (curva a) com a preparada com rações de peixe (curva b), observa-se que estas não apresentam diferenças significativas nas inclinações ($k = 0,0145$ para curva a e $k = 0,0135$ para a curva b).

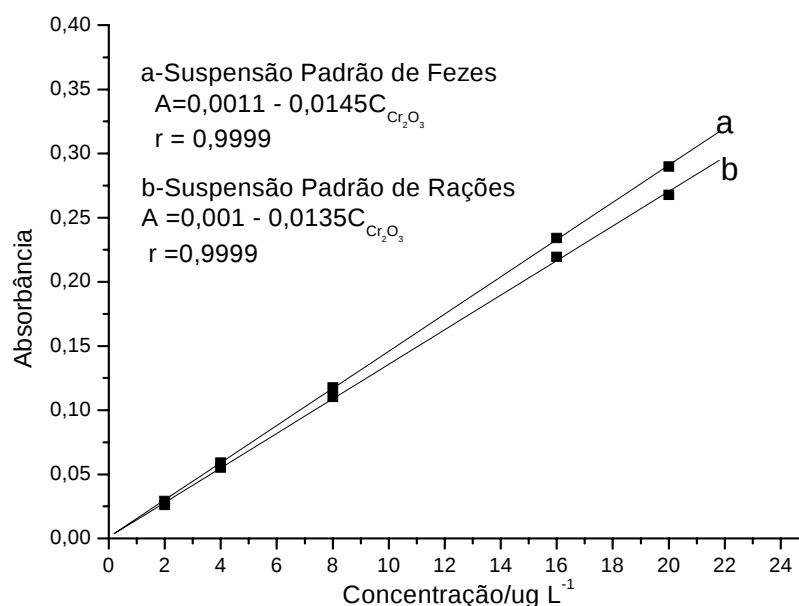


Figura 6. Curvas analíticas obtidas a partir de suspensões padrão de fezes e rações de peixes contendo 2, 4, 8, 16, e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3 .

Ambas as curvas analíticas, apresentaram valores de absorbância cerca de 10 - 15 % menores que os valores da curva analítica obtida a partir das soluções padrão preparadas na faixa de concentração de 1 – 10 mg L^{-1} de Cr_2O_3 , cujas leituras de absorbância foram feitas no módulo FAAS (Equação da reta obtida; $A = 0,0038 + 0,0291K$). No entanto as inclinações das retas obtidas para as suspensões padrão são maiores cerca de 5 vezes, logo a sensibilidade do método proposto também é maior, o que comprova a eficiência da temperatura nas etapas de pirólise e atomização do programa de aquecimento utilizado. O acúmulo de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite, que provoca a obstrução parcial da radiação proveniente da lâmpada de catodo oco, pode prejudicar as medidas de absorbância.¹⁸ No entanto, os baixos sinais de fundo (BG) obtidos na etapa de otimização do cromo no procedimento proposto, indicam que o resíduo de carvão remanescente da etapa de pirólise não comprometeu as medidas de absorbância. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das suspensões padrão e as inclinações das curvas analíticas ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ e $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$). Esses valores foram de 0,80 e 2,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3 , o que corresponde a 40 e 135 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para as suspensões padrão de fezes e de 0,85 e 2,80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as suspensões padrão de rações.

L^{-1} de Cr_2O_3 , o que corresponde a 42,50 e 140 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para as suspensões padrão de ração.¹⁶ A comparação entre os valores do limite de detecção obtido pelo método proposto com os valores obtidos por FAAS (76 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr_2O_3), demonstram que é possível detectar concentrações aproximadamente 95 vezes menores utilizando o método proposto. A porcentagem de recuperação obtida foi de 98 ± 3 para o padrão de suspensão de fezes e 97 ± 2 para o padrão de suspensão de ração. Os resultados obtidos demonstram que o método proposto apresenta precisão aceitável. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 260 queimas. Considerando-se a complexidade das matrizes biológicas, a vida útil do tubo obtida para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura.^{16,18}

3.4. Aplicação do método proposto

Depois dos procedimentos de otimização, determinação do LOD e LOQ, a aplicabilidade do método desenvolvido foi testada na determinação de Cr_2O_3 em quatro amostras de diferentes suplementos alimentares utilizados na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo e em amostras de fezes dessa espécie de peixe. Com os valores da porcentagem de Cr_2O_3 e da análise bromatológica dessas amostras, foi calculada a estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das frações de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB), utilizando-se a equação 1:¹⁰

$$\text{CDA} = 100 - 100 \left[\left(\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3r}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3f}} \right) \times \left(\frac{\% \text{Nf}}{\% \text{Nr}} \right) \right] \quad \text{Equação I}$$

onde:

CDA = Coeficiente de digestibilidade aparente;

$\% \text{Cr}_2\text{O}_{3r}$ = Porcentagem de óxido de cromo na ração;

$\% \text{Cr}_2\text{O}_{3f}$ = Porcentagem de óxido de cromo nas fezes;

$\% \text{Nr}$ = Porcentagem de nutriente na ração;

$\% \text{Nf}$ = Porcentagem de nutriente nas fezes.

A Tabela 3 mostra os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente calculados utilizando-se as porcentagens de Cr_2O_3 determinados pelo método proposto e por FAAS após mineralização das amostras em forno de microondas.

Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da Matéria Seca (MS), Proteína Bruta (PB), Extrato Etéreo (EE) e Energia Bruta (EB) de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes suplementos alimentares.

Ingredientes	CDA (%)							
	MS		PB		EE		EB	
	GFAAS	FAAS	GFAAS	FAAS	GFAAS	FAAS	GFAAS	FAAS
Levedura	67±2	65±2	89±4	87±3	84±3	83±3	69±2	68±3
Milho	69±2	67±2	91±4	89±3	85±2	86±2	73±3	74±3
Farelo de soja	68±2	69±2	91±3	90±2	87±3	89±4	71±3	70±3
Farelo de arroz	69±2	68±2	77±2	78±2	78±2	76±2	73±2	72±2
Média (%)	68,25	67,25	87,00	86,00	83,50	83,50	71,50	71,00
Índice de Comparação (%)	101,50	100,00	101,20	100,00	100,00	100,00	100,70	100,00

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Cálculo baseado na % Cr_2O_3 determinado pelo método proposto.
 FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama. Cálculo baseado na % Cr_2O_3 determinado por FAAS após mineralização das amostras de rações e fezes de peixes

Comparando-se os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes presentes nos quatro tipos de ingredientes utilizados na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo, mostrados na Tabela 3, observa-se que os valores determinados utilizando-se determinações da porcentagem de Cr_2O_3 feitas pelo método proposto, estão de acordo com os valores obtidos utilizando-se o método por FAAS após mineralização das amostras de rações e fezes, método utilizado normalmente nos estudos de digestibilidade em nutrição de peixes.²⁰⁻²² A média geral calculada, para os quatro tipos de ingredientes, considerando-se o método por GFAAS apresenta-se de acordo média geral calculada para esses ingredientes, em relação ao método por FAAS. O índice médio de comparação do método proposto (GFAAS) com o método por

mineralização prévia das amostras (FAAS) foi de 100,85 %, o que reforça a aplicabilidade do método proposto nesses estudos.

4. CONCLUSÕES

O método proposto de quantificação de Cr_2O_3 utilizando-se amostras de rações e fezes de peixes na forma de suspensões, para se estimar a disponibilidade aparente de nutrientes de rações utilizadas em nutrição de peixes, obteve resultados equivalentes ao método de quantificação por FAAS, método este que exige a mineralização das amostras como etapa inicial. No entanto apresenta a vantagem de não gerar resíduos tóxicos de dicromato, que podem comprometer a saúde da analista e contaminar o meio ambiente. Além disso, como não exige a necessidade da mineralização das amostras, o tempo das determinações analíticas em análises dentro da área de nutrição de peixes, é reduzido consideravelmente, obtendo-se também limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) da ordem de $0.80 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2.80 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, o que corresponde a $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $140 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando-se somente $10 \mu\text{L}$ das suspensões de amostras por determinação analítica. Os valores dos limites de detecção calculados para o método proposto apresentaram-se cerca de 95 vezes menores do que os limites de detecção calculada para a técnica FAAS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHO, C.Y. La energia en la nutrición de los peces. In: MONTEROS, J.A.E.; PINA, I.; KREVSKY, B. (Eds). **Nutrición en acuicultura II**. Madrid: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, 1987, p. 197-237.
2. HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.66, n.2, p.163-179, nov. 1987.
3. HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. New York: Cambridge University Press, 1988. 388p.

4. SULLIVAN, J.A.; REIGH, R.C. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Aquaculture**, v.138, n.1-4, p.313-322, dez. 1995.

5. AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal tract. **Aquaculture**, v.13, n.3, p. 265-272, mar. 1978.

6. KANE, E.A.; JACOBSON, W.C.; DAMEWOOD, P.M. Jr. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **Journal of Dairy Science**, v.42, n.8, p. 1359-1366, 1959.

7. RINGO, E. The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water-reared Arctic char (*Salvinus alpinus*). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.24, p.31-34, 1993.

8. DELANOUE, J.; CHOUBERT, G. Digestibility in rainbow trout: Comparison of the direct and indirect methods of measurement. **Progressive Fish-Culturist**, v.48, n.3, p.190-195, jul. 1986.

9. SILVA, S.S.; PERERA, K.M. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry effect of dietary levels and salinity with further observation of variability digestibility. **Aquaculture**, v.38, n.4, p.293-306, jun. 1984.

10. SHAHAT, T.M., Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. **Veterinary Medical, Journal Giza**, v.41, n.3, p.83-91, 1993.

11. BELCHIER, R.; FORSTER, H. **The destruction of organic matter**. New York: Pergamon Press, 1970. p.19-26.

12. MARCZENKO, Z. **Spectrophotometric determination of elements**. Chichester: Ellis Horwood, Halsted Press, 1976. p.211-215.

13. MILLER-IHLI, N.I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.345, n.7, p.482-489, mar. 1993.
14. BENDICHO. C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.6, n.5, p.353-374, aug. 1991.
15. LOPES-GARCIA, I.; SANCHES-MERLOS, M.; HERNANDES-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium in soil and sediments using slurry sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.11, n.10, p.1003-1006, oct. 1996.
16. ROSA, C.R.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NOBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, n.4, p.517-523. 2002.
17. FISCHER; J.L., RADEMEYER, C.J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) Part 2: selenium with palladium modifiers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, n.4, p.549-567, apr.1998.
18. ALEIXO, P.C.; NOBREGA, J.A.; SANTOS JR., D.; MULLER, R.C.S. Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. **Química Nova**, v.23, n.3, p. 310-312, jun.2000.
19. MINAMI, H.; YADA, M.; YOSHIDA, T.; ZHANG, Q.; INOUE, S.; ATSUYA, I. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. **Analytical Sciences**, v.20, n.3, p.455-459, 2004.

20. FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; BARROS, M.M.; MIRANDA, E.C. Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1143-1149, 2001.
21. PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, W.M.; PEZZATO, A.C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.
22. SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles diets. **Aquaculture**, v.238, n.1-4, p.385-401, 2004.

Anexo II

Lista de abreviações

Cr_2O_3 : Óxido de Crômio (III);

HNO_3 : Ácido Nítrico;

HClO_4 : Ácido Perclórico;

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$: Íons Dicromato;

$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$: Nitrato de Paládio;

Pd^0 : Paládio Metálico;

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama;

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite;

RSD: Desvio padrão médio

LOD: Limite de Detecção do método; Definido por: $\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$

LOQ: Limite de Quantificação do método; Definido por: $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$

Determinação de selênio por GFAAS em suspensões de amostras de fezes de peixes para estimativa da biodisponibilidade deste micronutriente em rações utilizadas em piscicultura

Resumo

Neste presente trabalho um método simples, rápido e sensível é proposto para determinação de selênio em amostras de fezes e rações de peixes por GFAAS utilizando-se a introdução direta de suspensões das amostras no tubo de grafite do espectrômetro. Os limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados em relação a 20 leituras do branco das suspensões (0,50 % m/v de fezes ou ração isentas de selênio) foram de 0,63 e 2,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as suspensões padrão de fezes e de 0,72 e 2,71 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as suspensões padrão de ração. O método proposto foi aplicado em estudos de biodisponibilidade de selênio em diferentes amostras de rações de peixes e mostraram-se de acordo com os resultados obtidos utilizando-se amostras previamente mineralizadas por digestões ácidas utilizando-se forno de microondas.

Palavras-chave: Suspensões de rações e fezes de peixe; GFAAS; Modificador químico; Paládio metálico.

Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture

Abstract

This paper presents a simple, fast and sensitive method to determine selenium in samples of feces and of fish feed by GFAAS through the direct introduction of slurries of the samples into the spectrometer's graphite tube. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) calculated for 20 readings of the blank of the standard slurries (0.50 % m/v of feces or feed devoid of selenium) were 0.63 and 2.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the standard feces slurries and 0.72 and 2.71 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the standard feed slurries. The proposed method was applied in studies of bioavailability of selenium in different fish feeds and their results proved compatible with that obtained from samples mineralized by acid digestion using microwave oven.

Keywords: Slurries samples; GFAAS; Metallic tungsten; Selenium determination.

1. INTRODUÇÃO

Os tecidos dos animais possuem elementos químicos em proporções e quantidades variáveis. Assim, 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.^{1,2} Os minerais são classificados como macrominerais (minerais que o organismo necessita em grandes quantidades) e microminerais (minerais 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, podemos classificar os elementos essenciais em macroelementos, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre, e microelementos, ferro, iodo, selênio, cobalto, manganês, zinco e cobre.³

O selênio é um micronutriente essencial presente nos tecidos do corpo. É parte integrante da enzima glutathiona peroxidase que atua no citosol celular convertendo peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos, o nível de atividade dessa enzima no fígado ou plasma é indicativo do suprimento de selênio do organismo.^{4,5} Em peixes o indicador bioquímico principal da deficiência do Se é similar ao observado nos mamíferos e inclui a redução da atividade da glutathiona peroxidase.⁶⁻⁸ A glutathiona peroxidase atua junto com a vitamina E como antioxidante biológico, protegendo os fosfolipídios insaturados de membranas celulares e subcelulares contra a ação danosa dos peróxidos, e são capazes de prevenir a distrofia muscular nutricional.⁹ A proliferação de células B e a produção de anticorpos também são reduzidas na deficiência de selênio.¹⁰ Combinações de selênio também são capazes de proteger da toxicidade de metais pesados como cádmio e mercúrio.⁶

Na nutrição de peixes, o animal pode ingerir selênio da água e da dieta. Níveis altos de selênio na água são tóxicos ao peixe, e podem acarretar em diminuição do crescimento e levar à morte do peixe. Normalmente a concentração em água é menor que $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, conseqüentemente a captação por brânquias é muito efetiva e o elemento é armazenado em vários tecidos, na sua forma inorgânica, com exceção do fígado. Selênio como selenito é capturado eficazmente pelas brânquias. Para selênio dietético que é armazenado na forma orgânica, a margem entre a exigência nutricional e o limite tóxico é muito estreito, o que dificulta a quantidade exata desse micronutriente a ser

adicionada na dieta do animal.⁶ Vários fatores associados à quantidade de selênio dos alimentos ou com outros alimentos em dietas misturadas podem afetar a biodisponibilidade do elemento da dieta, influenciando a utilização da sua quantidade ingerida nas fases de digestão/absorção, ou metabolismo/excreção.⁵ A comparação de dietas com composições fundamentalmente diferentes mostraram influência significativa na utilização de suplementação com selenito de sódio.^{11,12}

O desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes metálicos que são colocados nas rações em baixas concentrações, como por exemplo, o selênio, nos estudos de nutrição de peixes, torna-se fundamental. 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.¹³⁻¹⁵ 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.¹⁵ Além disso, a amostragem de sólidos na forma de suspensão apresenta vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito por manipulação excessiva ou retenção sobre produtos insolúveis, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista.¹³⁻¹⁵

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de selênio, em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes por GFAAS, de modo a eliminar a etapa de mineralização das amostras e permitir a estimativa da disponibilidade desse micronutriente em amostras de rações utilizadas na nutrição de peixes.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes, soluções padrão e vidrarias

Água deionizada de alta pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida por sistema Elga Ionic (PURELAB Option, USA), HNO_3 suprapuro (Merck), H_2O_2 (Merck) e Triton X-100

(Merck) foram utilizados em todo o trabalho. A solução de trabalho contendo W, 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 Na_2WO_4 (Merck). Solução de Pd(II), utilizada também como modificador químico, foi preparada nas mesmas condições, utilizando no entanto $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck).

Soluções estoque dos analitos foram preparadas a partir de reagentes 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.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com HNO_3 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por agitação antes da utilização.

2.2. Preparo das amostras

As amostras de fezes e rações de peixes após secagem a 50°C em estufa de circulação forçada de ar por 48 horas, foram submetidas à moagem criogênica, em moinho criogênico (SPEX – Freezer, modelo Mill 6750). Para isso, uma massa de aproximadamente 1,0 g da amostra foi colocada em frasco de polycarbonato 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 $60 \mu\text{m}$.¹⁶

Uma parte das amostras foi também mineralizada em forno de microondas (Provecto Analítica – Campinas/SP, modelo DGT plus). 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 HNO_3 suprapuro

14 mol L⁻¹ mais 0,50 mL de H₂O₂ 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado foi o proposto no manual do equipamento.

2.2.1. Preparo das suspensões das amostras

Após a moagem criogênica, 5 mg de amostras do material biológico (ração ou fezes de peixes), foram transferidas diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 5 µL HNO₃ suprapuro 14 mol L⁻¹, 50 µL de Triton X-100 a 1% v/v, 100 µL de solução 1000 mg L⁻¹ de Pd(II) e 845 µL de água ultrapura. As amostras de suspensão dos materiais biológicos foram em seguida agitadas por sonificação durante 40 segundos diretamente nos copos do autoamostrador, empregando-se um Desruptor de células ultra-sônico (UNIQUE).

2.3. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com tungstênio metálico

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. Esse procedimento foi repetido 20 vezes. Com aquecimento até 500 °C o tungstênio depositado sobre a parede do tubo de grafite, forma uma camada de W⁰ que atua como modificador químico.¹⁷ A massa de W⁰ depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 500 µg. Com esse tratamento foi possível utilizar o tubo de grafite em 572 queimas de amostras.

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

Etapa	Temperatura	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
	(°C)	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

°C: graus Celsius; s: segundo; L min⁻¹: litros por minuto.

2.4. Preparo das curvas analíticas

Curvas analíticas foram preparadas utilizando-se suspensões de rações e de fezes de peixes contendo 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selênio (Merck), sendo as leituras das absorbâncias feitas por GFAAS. Essas suspensões padrão foram preparadas nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões de amostras de ração e fezes, utilizando, no entanto, 5 mg de amostra do material biológico isento de selênio. Desta forma, no preparo das curvas analíticas, volumes de 10, 20, 30, 40 e 50 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 ultrapura, de modo que a concentração final selênio nas suspensões ficassem na faixa de 5 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Soluções padrão contendo de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selênio em meio de HNO_3 suprapuro 10% v/v, foram também utilizadas no preparo de curvas analíticas para determinação de selênio nas amostras de fezes e rações mineralizadas por digestão ácida utilizando forno de microondas.

2.5. Procedimentos analíticos

Após a etapa de sonificação da amostra de suspensão e/ou suspensão padrão, feita diretamente nos copos do autoamostrador, um volume de 20 μL de padrão ou amostra foi injetado no tubo de grafite (recoberto internamente com tungstênio metálico) pela micropipeta 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	Temperatura	Estágios		Fluxo de Argônio
	(°C)	Rampa (s)	Aquecimento (s)	(L min ⁻¹)
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

^{°C}: graus Celsius; s: segundo; L min⁻¹: litros por minuto.

Para determinação de selênio foi utilizado espectrômetro de absorção atômica (SHIMADZU 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 SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 196,0 nm e a resolução espectral foi de 0,5 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 área de pico.

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. Dessa forma, curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do Se em suspensões padrão de rações e fezes de peixes que continham $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se e 100 mg 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. A influência da temperaturas de pirólise e atomização sobre sinal de absorbância obtido para o Se nas suspensões padrão dos materiais biológicos, são mostradas nas Figuras 1 e 2.

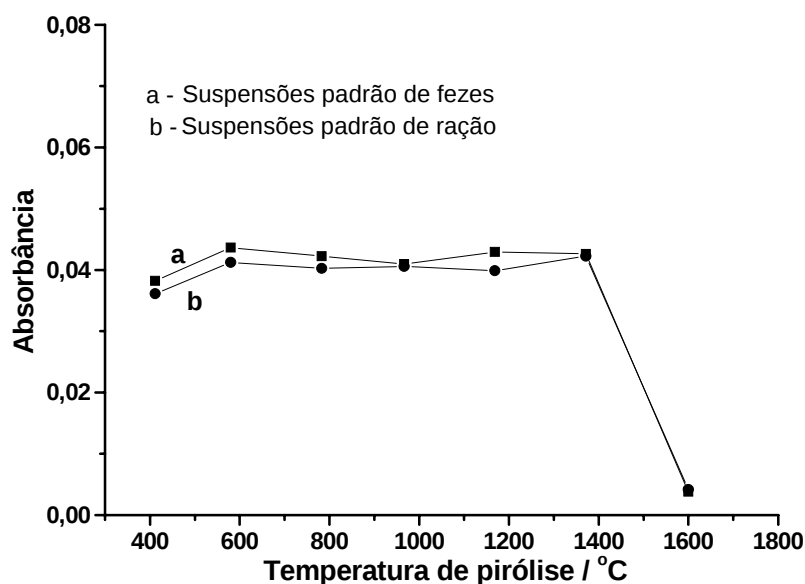


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise das suspensões de amostras de fezes e ração contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito.

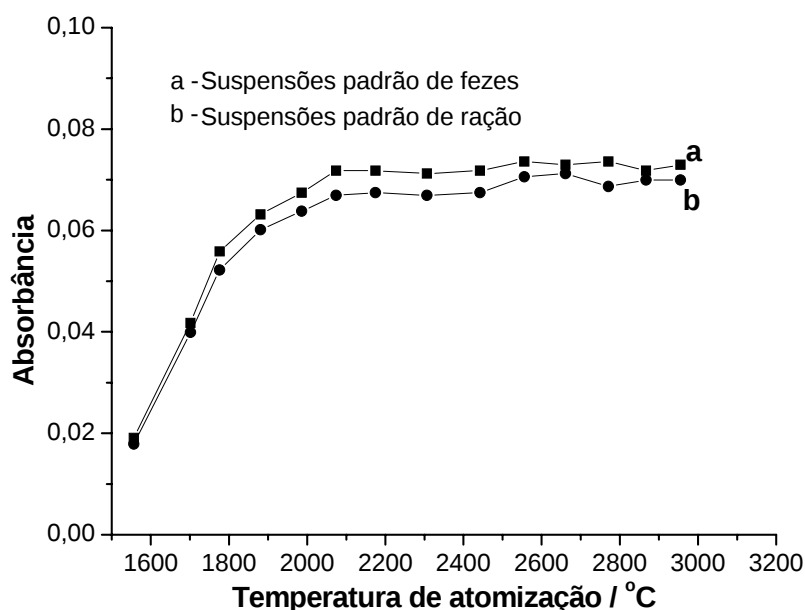


Figura 2. Curvas de temperatura de atomização do Se nas suspensões de amostras de fezes e ração contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito.

A temperatura de pirólise de 1400°C foi escolhida, conforme mostra a Figura 1, porque os sinais de absorbância obtidos para o Se permanecem constantes a partir de 600°C , sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1400°C , dessa forma, todos os demais experimentos foram feitos utilizando-se essa temperatura na etapa de pirólise. Em relação à temperatura de atomização (Figura 2), observa-se que os sinais de absorbância obtidos para o Se são constantes a partir de 2100°C para ambas as suspensões padrão, dessa forma, a temperatura de atomização de 2400°C foi selecionada para todos os demais experimentos.

Nas Figuras 3 e 4, são mostrados os sinais de absorbância do analito (AA) e de absorção de fundo (BG) para as suspensões padrão dos materiais biológicos. Um sinal de absorção de fundo relativamente baixo pode ser observado em ambas as Figuras. Estes baixos sinais de absorção de fundo demonstram a eficiência do modificador químico Pd(II) co-injetado junto com a amostra e do W^0 que atuou como modificador químico permanente. Como os materiais biológicos em estudo apresentam teores de magnésio em torno de $0,12\%$, esse elemento presente na matriz pode também auxiliar na estabilização térmica do selênio.^{16,18}

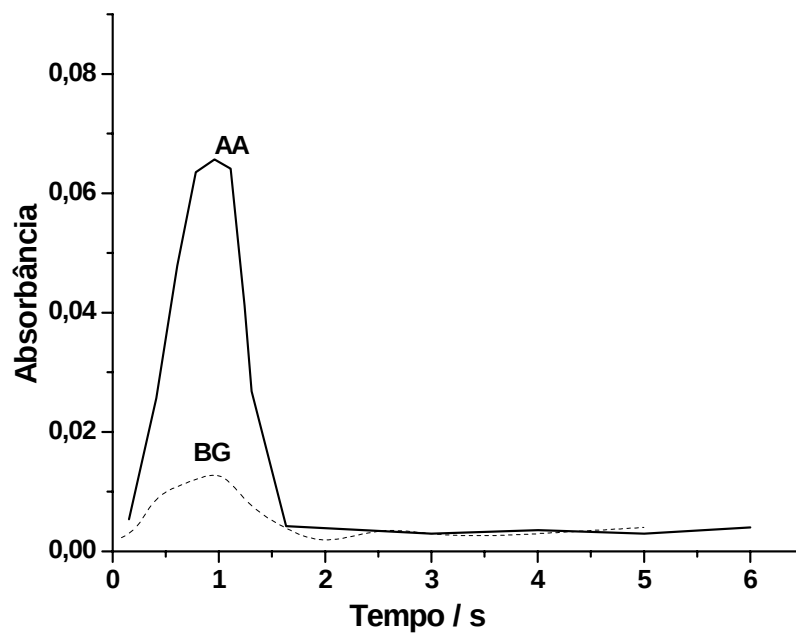


Figura 3. Sinais transientes de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) na atomização de Se nas suspensões de amostras de fezes contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito.

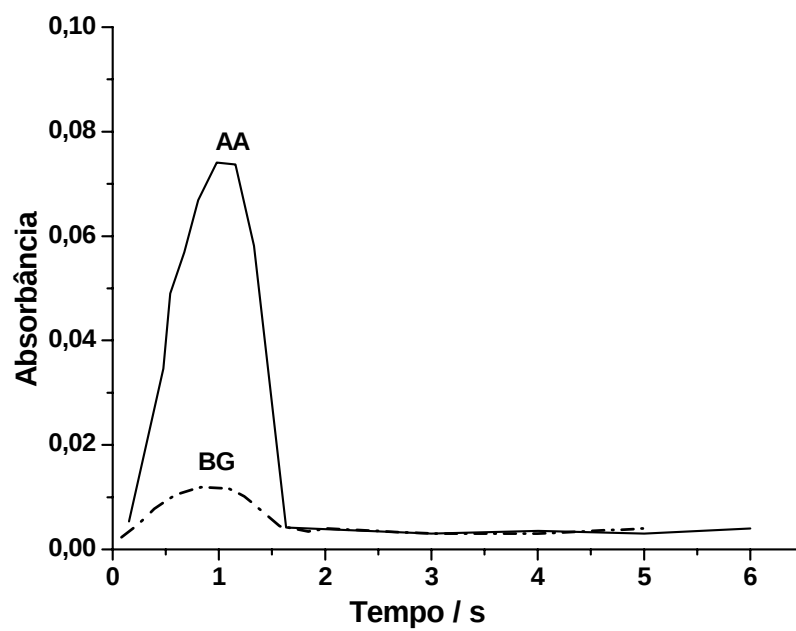


Figura 4. Sinais transientes de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) na atomização de Se nas suspensões de amostras de ração contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito.

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

A agitação ultra-sônica para análise de suspensões de materiais sólidos garante uma boa homogeneização da amostra, o que permite obter melhor reprodutibilidade entre as medidas.¹⁹ Dessa forma, o tempo de sonificação das amostras foi avaliado no intervalo de 5 a 60 s de agitação. Na Figura 5 é mostrada a influência do tempo de sonificação das amostras sobre os sinais de absorbância obtidos para o Se. Analisando-se a Figura 5, observa-se que os sinais de absorbância permanecem constantes a partir de 20 s de sonificação. O tempo de sonificação de 40 s considerado ótimo, pois além de se obter um bom sinal de absorbância, o RSD entre as medidas foi relativamente baixo (2,7%).

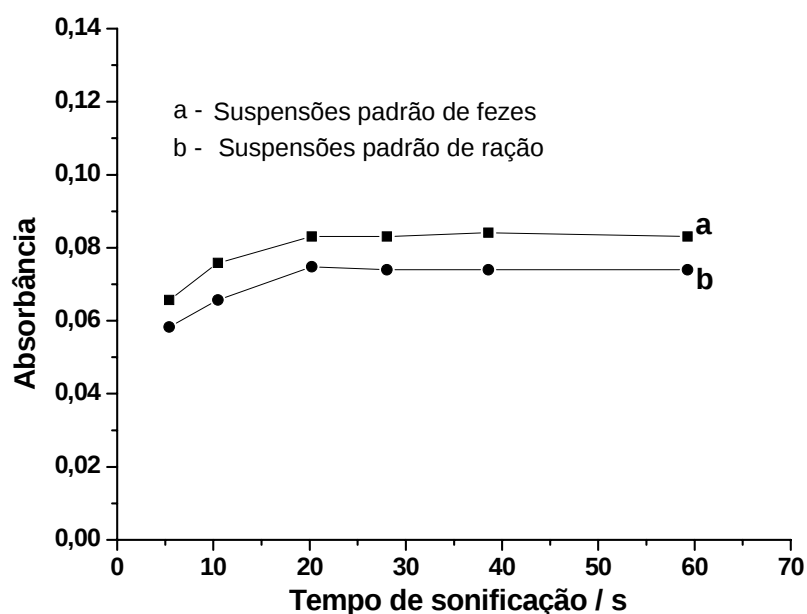


Figura 5. Influência do tempo de ultrasonificação sobre o sinal de absorbância do Se nas suspensões padrão de fezes e ração de peixe contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito.

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 fezes e ração de peixe contendo Se na

faixa de concentração de 5 - 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (conforme descrito no item 2.5). A Figura 6 mostra as curvas analíticas obtidas com as suas respectivas equações das retas. Comparando-se a curva analítica preparada com fezes de peixes com a preparada com rações de peixe, observa-se que estas não apresentam diferenças significativas nas inclinações ($k = 0.0052$ para a curva de fezes e $k = 0.0042$ para a curva de ração).

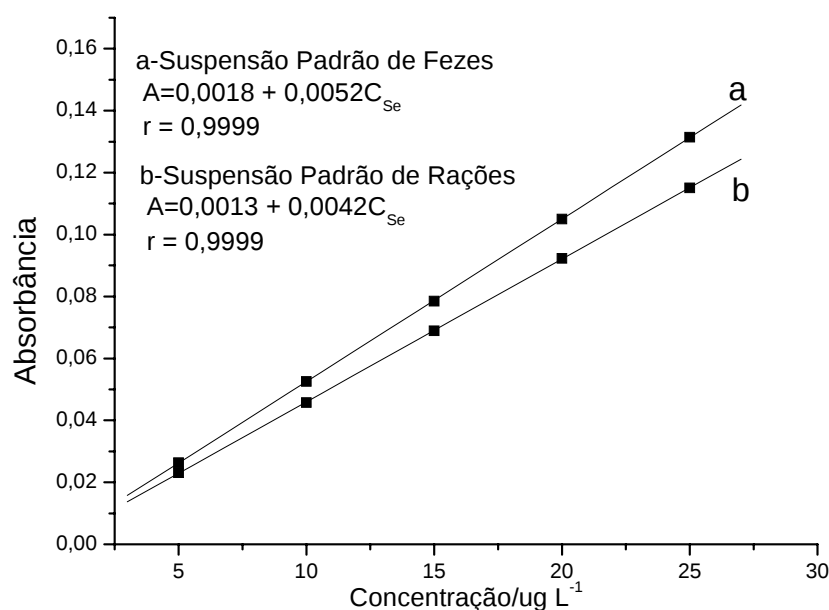


Figura 6. Curvas analíticas obtidas a partir de suspensões padrão de fezes e rações de peixes contendo 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se.

Ambas as curvas analíticas, apresentaram valores de absorbância cerca de 5-10 % menores que os valores da curva analítica obtida a partir das soluções padrão preparadas na faixa de concentração de 1 – 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se em meio de HNO_3 suprapuro a 10% v/v (Equação da reta: $A = 0,0038 + 0,0017k$). Entretanto, a sensibilidade do método proposto é maior, porque as inclinações das retas obtidas para as suspensões padrão são cerca de 5 vezes maiores que as inclinações das curvas obtidas em meio de HNO_3 a 5 % v/v. Este fato que reforça a eficiência da temperatura nas etapas de pirólise e atomização do programa de aquecimento utilizado. Um dos problemas que pode ocorrer na etapa de pirólise, quando se utiliza suspensão de amostras, é o acúmulo de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite, que

provoca a obstrução parcial da radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco, o que pode prejudicar as medidas de absorvância.¹⁸ No entanto, os possíveis resíduos de carvão remanescente da etapa de pirólise não comprometeram as medidas de absorvância, considerando os baixos sinais de fundo (BG) obtidos na etapa de otimização do selênio no procedimento proposto.

As massas características calculadas em relação à suspensão padrão de $8 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se foram de 34 e 53 pg para a suspensão padrão de fezes e ração, respectivamente. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das suspensões padrão e as inclinações das curvas analíticas ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ e $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$). Esses valores foram de 0,63 e $2,20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, o que corresponde a 2,52 e $8,80 \mu\text{g kg}^{-1}$, para as suspensões padrão de fezes e de 0,72 e $2,71 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, o que corresponde a 2,90 e $10,84 \mu\text{g kg}^{-1}$, para as suspensões padrão de ração.¹⁶ A comparação entre os valores dos limites de detecção obtidos pelo método proposto com os valores obtidos por GFAAS utilizando padrões aquosos ($0,70 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se), mostraram-se equivalentes. A porcentagem de recuperação obtida foi de 97 ± 4 para o padrão de suspensão de fezes e 98 ± 3 para o padrão de suspensão de ração. Os resultados obtidos demonstram que o método proposto apresenta precisão aceitável. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 572 queimas. Considerando-se a complexidade das matrizes biológicas, a vida útil do tubo obtida para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura.^{16,18}

3.4. Aplicação do método proposto

Após os procedimentos de otimização, determinação do LOD e LOQ, a aplicabilidade do método desenvolvido foi testada na determinação de selênio de quatro amostras de rações contendo diferentes suplementos alimentares utilizadas na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo e em amostras de fezes dessa espécie de peixe. Com base nos valores da determinação da porcentagem de Cr_2O_3 ²⁰ (marcador biológico utilizado em estudos de digestibilidade/biodisponibilidade de nutriente na nutrição animal) e de Se nas amostras de rações e fezes dos animais em estudo, foi calculada a estimativa do coeficiente de biodisponibilidade aparente deste micronutriente na dieta dos alevinos de tilápia do Nilo, utilizando-se a equação 1:¹⁰

$$Da = 100 - 100 \left[\left(\frac{\%Cr_2O_{3r}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) \times \left(\frac{\%Sef}{\%Ser} \right) \right] \quad \text{Equação 1}$$

onde:

Da = Biodisponibilidade aparente de Selênio;

$\%Cr_2O_{3r}$ = Porcentagem de óxido de cromo na ração;

$\%Cr_2O_{3f}$ = Porcentagem de óxido de cromo nas fezes;

$\%Ser$ = Porcentagem de Se na ração;

$\%Sef$ = Porcentagem de Se nas fezes.

A Tabela 3 mostra os valores dos coeficientes de biodisponibilidade aparente calculados utilizando-se os resultados das determinações de selênio pelo método proposto e por GFAAS após mineralização prévia das amostras em forno de microondas.

Tabela 3. Coeficiente de biodisponibilidade de Se de alevinos de Tilápia do Nilo alimentados com diferentes suplementos alimentares.

Ingredientes	Coeficiente de Biodisponibilidade de Selênio (%)	
	GFAAS*	GFAAS [#]
Levedura	61±2	63±2
Milho	60±4	63±3
Farelo de soja	62±2	64±2
Farelo de arroz	63±3	65±3
Média (%)	61,50	63,75
Índice de comparação (%)	96,50	100

*Cálculo baseado na % Se determinado pelo método proposto

[#] Cálculo baseado na % Se determinado por GFAAS após mineralização das amostras em forno de microondas

A comparação dos valores dos coeficientes de biodisponibilidade aparente de selênio presentes nos quatro tipos de ingredientes utilizados na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo, mostrados na Tabela 3, indica que os valores determinados utilizando-se determinações de Se feitas pelo método proposto, estão de acordo com os valores obtidos utilizando-se o método por GFAAS após mineralização das amostras de rações

e fezes em forno de microondas, método utilizado normalmente nos estudos de digestibilidade em nutrição de peixes.²¹⁻²³ A média geral calculada, para os quatro tipos de ingredientes, considerando-se o método proposto apresenta-se de acordo média geral calculada para esses ingredientes, em relação ao método por GFAAS após mineralização das amostras. O índice médio de comparação do método proposto com o método por mineralização prévia das amostras foi de 96,50 %, o que reforça a aplicabilidade do método proposto nesses estudos.

4. CONCLUSÕES

O método proposto de quantificação de Se utilizando-se amostras de rações e fezes de peixes na forma de suspensões, para se estimar a biodisponibilidade aparente desse micronutriente de rações utilizadas em nutrição de peixes, obteve resultados equivalentes ao método de quantificação por GFAAS, método este que exige a mineralização das amostras em forno de microondas como etapa inicial. No entanto apresenta a vantagem de não gerar resíduos tóxicos que podem comprometer a saúde da analista e contaminar o meio ambiente. Além disso, como não exige a necessidade da mineralização das amostras, o tempo das determinações analíticas, é reduzido consideravelmente. Destacam-se também, os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos, da ordem de $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,71 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, o que corresponde a $2,52 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $10,54 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando-se somente 20 μL das suspensões de amostras por determinação analítica. Os valores dos limites de detecção calculados para o método proposto são equivalentes aos limites de detecção calculados para a técnica GFAAS utilizando padrões aquosos de Se.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MCDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. New York: Academic Press, 1992. p.1-18.
2. SOLOMONS, N.W. **Absorption and malabsorption of mineral nutrients**. New York: Alan R. Liss, New York, 1992. 125p.

3. SMITH, R.M. **Trace elements in human and animal nutrition**. New York: Academic Press, 1987. 480p.
4. COMBS, G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. London: Academic Press, 1986, 180p.
5. WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, n.1-4, p.185-207, mai. 1997.
6. POSTON, H.A; COMBS, G.F; LEIBOVITZ, L. Vitamin E and selenium inter-relations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gross, histological, and biochemical deficiency signs. **Journal of Nutrition**, v.106, n.7, p.892–904, 1976.
7. POPPE, T.T.; HASTEIN, T.; FROSLIE, A.; KOPPANG, N.; NORHEIM, G. Nutritional aspects of hemorrhagic syndrome (Hitra Disease) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Disease of Aquatic Organisms**, v.1, n.3, p.155–162, out. 1986.
8. LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1998, 267p.
9. OLIVEIRA, J.E.D. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Salvier, 1998. 402p.
10. COMBS, G.F.; LIU, C.H.; LU, Z.H.; SU Q. Uncomplicated selenium deficiency produced in chicks fed a corn-soy-based diet. **Journal of Nutrition**, v.114, n.5, p.964-976, 1984.
11. GANTHER, H.E.; BAUMANN, C.A. Selenium metabolism .1. Effects of diet, arsenic and cadmium. **Journal of Nutrition**, v.77, n.2, p.210-218, 1962.
12. ROSENFELD, I.; BEATH, O.A. **Selenium: Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition**. New York: Academic Press, 1964.

13. MILLER-IHLI, N.I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.345, n.7, p.482-489, mar. 1993.
14. BENDICHO. C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.6, n.5, p.353-374, aug. 1991.
15. LIANG, Y.Z.; LI, M.; RAO, Z. Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Science**, v.12, n.4, p.629-633, aug.1996
16. ROSA, C.R.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NOBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, n.4, p.517-523. 2002.
17. FISCHER; J.L., RADEMEYER, C.J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) Part 2: selenium with palladium modifiers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, n.4, p.549-567, apr.1998.
18. ALEIXO, P.C.; NOBREGA, J.A.; SANTOS JR., D.; MULLER, R.C.S. Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. **Química Nova**, v.23, n.3, p. 310-312, jun.2000.
19. MINAMI, H.; YADA, M.; YOSHIDA, T.; ZHANG, Q.; INOUE, S.; ATSUYA, I. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. **Analytical Sciences**, v.20, n.3, p.455-459, 2004.
20. SILVA, F.A.; PADILHA, C.C.F.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the

apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, v.69, p.1025-1030, 2006.

21. FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; BARROS, M.M.; MIRANDA, E.C. Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1143-1149, 2001.

22. PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, W.M.; PEZZATO, A.C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.

23. SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles diets. **Aquaculture**, v.238, n.1-4, p.385-401, 2004.

Anexo III

Lista de abreviações

Se: Selênio

NO_3 : Ácido Nítrico;

H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio;

W: Tungstênio

Na_2W_4 : Tungstato de Sódio

$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$: Nitrato de Paládio;

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite;

RDD: Desvio padrão médio

LOD: Limite de Detecção do método; Definido por: $\text{LOD} = 3\sigma_{\text{slope}}$

LOQ: Limite de Quantificação do método; Definido por: $\text{LOQ} = 10\sigma_{\text{slope}}$

IMPLICAÇÕES

Para se avaliar o potencial de inclusão de um nutriente da dieta são feitos os chamados “estudos de digestibilidade”. Estes estudos utilizam como marcador o óxido de cromo (III). Para se determinar um nutriente metálico em estudo é necessário determinar também o percentual do marcador nas fezes e na dieta. Estas determinações, tanto para o nutriente metálico quanto para o cromo, apresentam alguns problemas no preparo das amostras. Normalmente, é feita a mineralização nítrica-perclórica por aquecimento lento em blocos digestores, que além de demorada e perigosa ao analista, tem o inconveniente de oxidar o cromo (III) a cromo (VI), espécie altamente tóxica.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes implicações:

a) O novo método proposto para determinação de óxido de cromo por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) em amostras de fezes e rações de peixes pode ser usado como uma nova metodologia para determinação deste composto. Por não ser necessária a mineralização nítrica-perclórica das amostras tem-se: a diminuição da contaminação do ambiente, por não produzir cromo (VI), como resíduo tóxico; a eliminação do efeito de ácidos perigosos ao analista; além é claro de uma considerável diminuição no tempo de análise.

b) O novo método proposto para determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) em amostras de fezes e rações de peixes pode ser usado como uma nova metodologia para análise deste micronutriente. Por não ser necessária a mineralização nítrica-perclórica das amostras a possível perda do selênio por volatilização é eliminada, além é claro de uma considerável diminuição no tempo de análise.