

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
AVALIAR A DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES METÁLICOS
UTILIZADOS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

RENATO DE CÁSSIO FERREIRA NEVES
Biólogo

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção do título de
mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Co-Orientador: Prof. Dr. Margarida Maria de Barros

Botucatu - SP
Janeiro - 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

“A uma pessoa especial chamada Francisco Costa, um senhor de idade avançada com um olhar de esperança, ser humano notável no seu estímulo constante, dedico este trabalho a está pessoa que tive a sorte dele ser meu avô”;

“Minha querida e estimada noiva Patrícia uma pessoa especial na minha vida, trazendo consigo nosso Filho, Gabriel, amo vocês”;

A minha avó Ana(naninha), pela força de sempre;

Minha querida mãe, Fátima, pelo conforto de sempre. “Eu te amo”;

Meus irmãos; Julho, Luciano, Luciana, Karina e a minha cunhada Paula;

Aos meus tios: Cezar, Luiz, Denise (querida), Mario, Carlos e a minha madrinha tia Marilene, minhas primas; Juliana, Beatriz, Henrique e Carla

Meus amigos; Fábio, Gustavo, Neverson, Neilson, Fernando, João, Carol, Priscila, Cleisi, Rafael, Tiago, Sidnei, Luiz Cláudio, Kátia, Michele, Mayra, Marcos nhonho;

A uma pessoa estimada, meu orientador Pedro de Magalhães Padilha, um sul-mato-grossense de verdade;

AGRADECIMENTOS

Departamento de Química da UNESP-Botucatu, e seus funcionários; Maria, Vânia, Lourdes, Elaine, Ivalde, Luis, Fabinho;

Aos professores do departamento; José Pedro, Ariovaldo, Sônia, Julio e Margarida, *Alberto*;

Alunos de iniciação; Paula, Mayra, Vanessa, Rafael;

Aos professores, Pezzato e Margarida pelo apoio de sempre;

A uma pessoa de sempre que nos momentos difíceis me carregou no colo, quando só existia uma pegada na areia “DEUS”, obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Introdução Geral.....	1
1.1. Considerações iniciais e justificativas.....	1
1.2. Os nutrientes metálicos no organismo dos animais.....	5
1.3. Espectrometria Atômica.....	7
1.3.1. Aspectos históricos da espectrometria de absorção atômica	7
1.3.2. Conceitos básicos da espectrometria atômica.....	10
1.3.2.1. Aspectos quantitativos da espectrometria atômica.....	14
1.3.2.2. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	17
1.4. A freqüência de ultra-sons.....	21
1.4.1. Atuação das ondas ultra-sons no meio líquido.....	21
1.4.2. Principais aplicações dos ultra-sons.....	24
2.0. Referências bibliográficas.....	27
Anexo I. Lista de abreviações	

CAPÍTULO II

Avaliação da digestibilidade de cobre em amostras de ração de peixes utilizando amostragem em suspensão e determinação por GFAAS

Resumo.....	32
Abstract.....	33
1. Introdução.....	34
2. Experimental.....	35
2.1. Reagentes, solução padrão e amostras.....	35
2.2. Material biológico utilizado no preparo das suspensões padrão.....	37
2.3. Preparo das suspensões das amostras.....	37
2.4. Instrumentação.....	37
2.5. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto tungstênio.....	38

2.6. Preparo das suspensões padrão.....	39
2.7. Procedimentos analíticos.....	40
3. Resultado e discussão.....	40
3.1. Otimização das condições instrumentais.....	40
3.2. Otimização do tempo de sonificação das suspensões.....	42
3.3. Obtenção das curvas analíticas.....	42
3.4. Aplicação do método proposto.....	45
4.0. Conclusões.....	47
Agradecimentos.....	47
Referências bibliográficas.....	48
Anexo II. Lista de abreviações	

CAPITULO III

Digestibilidade de nutrientes metálicos em rações de peixes utilizando-se extração por ultra-som e determinação por espectrometria de absorção atômica por chama

Titulo.....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	53
1. Introdução.....	54
2. Experimental.....	56
2.1. Reagentes e soluções.....	56
2.2. Coleta e preparo das amostras.....	56
2.3. Extração dos nutrientes metálicos.....	57
2.4. Instrumentação.....	58
3. Resultado e discussão.....	59
3.1.Otimização tempo de sonificação no processo de extração dos analitos metálico....	59
3.2.Otimização da potência do ultra-som no processo de extração dos analitos metálicos.....	61
3.3. Figuras de mérito do método de extração por ultra-som.....	62
3.4. Aplicação do método proposto.....	64
4. Conclusão.....	66

Agradecimentos.....	66
Referências bibliográficas.....	66
Anexo III. Lista de abreviações	

CAPITULO IV

Implicações.....	71
------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Processos de excitação e decaimento dos elétrons de valência e um átomo no estado fundamental.....	11
Figura 2. Transições de energia envolvidas no processo de excitação de um átomo no estado fundamental.....	12
Figura 3. Espectroscopia de emissão atômica.....	13
Figura 4 - Espectroscopia de Absorção Atômica.....	14
Figura 5. Curva analítica para o íon metálico cobre.....	16
Figura 6. Representação de corte de forno de grafite com aquecimento longitudinal Varian.....	18
Figura 7. Etapa de secagem da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	18
Figura 8. Etapa de pirólise da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	19
Figura 9. Etapa de atomização da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	20

Figura 10. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).....	20
Figura 11 - Ocorrência da cavitação acústica.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO II

Figura 1. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização das suspensões padrão de rações e fezes de peixes contendo 10,00 µg L-1 de cobre. Temperatura de pirólise: Suspensões de fezes - Curva a, Suspensões de ração – Curva b; Temperatura de atomização: Suspensões de fezes - Curva c, Suspensões de ração – Curva d.....	41
Figura 2. Sinais de absorção atômica (AA,) e de fundo (BG) obtidos na atomização do zinco nas suspensões padrão de rações e fezes de peixes contendo 10,00 µg L-1 de cobre (Gráfico a – Suspensão de fezes, Gráfico b – Suspensão de rações).....	42
Figure 3. Influência do tempo de ultra-sonificação sobre o sobre o sinal de absorbância do cobre nas suspensões padrão contendo 10,00 µg L-1 de cobre.....	43
Figura 4. Curvas analíticas de cobre obtidas a partir de suspensões padrão de fezes e rações de peixes contendo 1,00, 2,00, 4,00, 5,00 e 10,00 µg L-1 de cobre.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de rações e fezes de peixes em forno de microondas.....	36
Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da parede interna do tubo de grafite com carbetto de tungstênio.....	38
Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de Zn em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes.....	39
Tabela 4. Valores dos Limites de Detecção (LOD), Limites de Quantificação (LOQ) e Massas Características (mo) calculadas para o zinco utilizando-se os dados obtidos	

das curvas analíticas de suspensões padrão de fezes e rações de peixes.....	44
Tabela 5. Resultados (n=5) obtidos na determinação de cobre em amostras de rações enriquecidas utilizando o método proposto (amostragem em suspensão) e a mineralização das amostras em forno de micro-ondas.....	45
Tabela 6. Coeficiente de digestibilidade de cobre de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com rações preparadas a partir de diferentes fontes alimentares.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO III

Figura 1. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de cálcio, magnésio, manganês e zinco de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 40, 50 e 60 s; Potência utilizada – 136 W; Solução Extratora – Ácido clorídrico 0,10 mol L ⁻¹	60
Figura 2. Influência da potência de sonificação no processo de extração de cálcio, magnésio, manganês e zinco de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação - 5 ciclos de 40 s; Solução Extratora – Ácido clorídrico 0,10 mol L ⁻¹	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de rações e fezes de peixes em forno de microondas.....	57
Tabela 2. Parâmetros utilizados no ajuste do espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA-6800 para as determinações de cálcio, magnésio, manganês e zinco.....	58
Tabela 3. Porcentagens dos analitos em amostras de rações de peixes, utilizando-se extração por ultra-som e mineralização em forno de micro-ondas (n = 5).....	62
Tabela 4. Porcentagens dos analitos em amostras de fezes de peixes, utilizando-se extração por ultra-som e mineralização em forno de micro-ondas (n = 5).....	63

Tabela 5. Resultados (n=5) obtidos nas determinações de cálcio, Magnésio, Manganês e zinco em ração certificada utilizando-se o método.....	63
Tabela 6. Coeficiente de digestibilidade dos nutrientes metálicos de juvenis de Tilápia do Nilo alimentados com rações preparadas a partir de diferentes fontes alimentares.....	65

Anexo I

Listas 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

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite

I_0 : Intensidade de radiação que chega à chama

I : Intensidade de radiação que não foi absorvida na chama

T: Transmitância

W: Watts

W^o: Tungstênio metálico

%T: porcentagem de transmitância

A: Absorbância

AA: Absorbância atômica

AAS: Espectrometria de absorção atômica

Anexo II

Listas 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;

W° : Tungstênio metálico

W: watts

Cu: Cobre

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama;

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica por 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: $\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$

Anexo III

Listas 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;

Ca: Cálcio;

Mg: Magnésio;

Mn: Manganês;

Zn: Zinco;

W: Watts;

Hz: Hertz;

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama;

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica por 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: $\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$

CAPÍTULO - I

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Considerações iniciais e justificativas

O valor nutricional dos alimentos geralmente é obtido por meio de análise bromatológica e/ou pela determinação do coeficiente de digestibilidade do(s) nutriente(s) de uma ração ou alimento.

A digestibilidade, na teoria, expressa o real aproveitamento do nutriente pelo animal; pela determinação do total deste nutriente ou da energia ingerida e excretada nas fezes, mas, em virtude das secreções endógenas como as secreções biliares, enzimáticas e descamações do epitélio, só uma parte deste nutriente encontrado nas fezes é proveniente do alimento testado. Desta forma, a determinação da digestibilidade de um nutriente, sem considerar as perdas endógenas, é chamada de digestibilidade aparente.¹

Na determinação da digestibilidade aparente de um nutriente utilizam-se as gaiolas metabólicas (método direto ou coleta total de fezes) ou marcadores (método indireto ou coleta parcial de fezes). Estes se dividem em internos, quando ocorrem naturalmente nos alimentos e externos, quando são adicionados à dieta; este último permite uma maior facilidade na condução dos ensaios, principalmente quando são feitos com peixes, já que a porcentagem da digestibilidade do nutriente pode ser avaliada sem a necessidade de determinar a quantidade de ração consumida e de fezes produzidas.^{1,2}

Mas, para que qualquer componente possa ser considerado um marcador em ensaios de digestibilidade, deve satisfazer os seguintes pré-requisitos: não interferir no metabolismo digestório do animal ou com a microflora intestinal; não ser absorvido *ou*

metabolizado; ter a mesma taxa de passagem pelo intestino que a dieta experimental; poder ser analisado na dieta e nas fezes e ser atóxico.²

Vários fatores afetam os coeficientes de digestibilidade dos alimentos para peixes, sendo os principais a metodologia utilizada para a coleta de fezes (técnicas com o peixe dentro ou fora da água): a espécie, a idade do peixe, a composição do alimento, a salinidade, a temperatura da água e o tipo de processamento do alimento. Esses fatores são de grande importância na formulação de dietas balanceadas que maximizem a eficiência alimentar e o desempenho animal, além de minimizar a lixiviação de nutrientes para o meio.³

Os marcadores externos são os mais utilizados nos estudos de digestibilidade com peixes, sendo o óxido de cromo III (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.^{4,5,7} 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%(m/m) 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 Após determinação da composição química-bromatológica e da porcentagem de

Cr₂O₃ nas rações e fezes, o coeficiente de digestibilidade pode ser calculado utilizando-se a equação 1:¹⁰

$$Da = 100 - \left[100 \left[\frac{\% Cr_2O_{3r}}{\% Cr_2O_{3f}} \right] \times \left[\frac{\% N_f}{\% N_r} \right] \right]$$

onde:

Da = Digestibilidade aparente;

%Cr₂O_{3r} = Porcentagem de óxido de crômio na ração;

%Cr₂O_{3f} = Porcentagem de óxido de crômio nas fezes;

%N_r = Porcentagem de nutriente na ração;

%N_f = Porcentagem de nutriente nas fezes.

A determinação da porcentagem de óxido de crômio 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 + 2 mL de HClO₄, ambos concentrados).¹¹ Os extratos resultantes são soluções ácidas de dicromato (Cr₂O₇²⁻), que normalmente é quantificado pelo método colorimétrico da difenilcarbazida.¹² Este procedimento além de demorado, apresenta o inconveniente de oxidar o crômio (III) a crômio (VI), espécie altamente tóxica.

Considerando-se o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos e do óxido de crômio (III) utilizado como marcador de rações, para determinação da digestibilidade aparente nos

estudos de nutrição animal, particularmente nutrição de peixes, torna-se fundamental. Neste contexto, a extração dos analitos metálicos por ultra-som e a determinação destes nas amostras de rações e fezes na forma de suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), apresentam-se como técnicas bastante promissoras, principalmente porque permitem a eliminação da mineralização nítrico/perclórica das amostras em bloco digestor e também a produção de crômio(VI) no processo, que pela metodologia clássica utilizada, constitui o principal problema.

1.2. Os nutrientes metálicos no organismo dos animais

Embora os íons metálicos constituam pequena proporção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais. Os principais papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, destaca-se seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, orientando assim a reação e a mediação nas reações de oxido-redução, nas mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destaca-se o papel como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tais como ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, cobalto na vitamina B₁₂ e enxofre na tiamina e na biotina, que atuam na estabilização dessas biomoléculas, através da estabilização e ou proteção de cargas negativas. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo, para a formação dos ossos, para a quantidade e a relação entre cálcio e fósforo, para a atividade muscular e para a relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular. Os eletrólitos, dos quais os sais de sódio e potássio são os mais importantes, representam os principais fatores no controle osmótico do metabolismo da água.¹³⁻¹⁶

Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas exigem a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica.^{2,5} Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, ligação a um substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento.¹⁷

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. A primeira caracteriza-se pela alta afinidade da interação metal-proteína, enquanto que na segunda a interação metal-proteína é de baixa afinidade, sendo esta ligação facilmente quebrada.¹⁸

Fracamente ligados às proteínas estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada como magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais freqüentemente, estão os metais de transição, como o ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e cobalto, que devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas.¹⁹

Um outro grupo de metaloproteínas, as chamadas metalotioninas, apresentam alta afinidade não só com íons metálicos essenciais, como cobre e zinco, mas também com os metais potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio. Estas metalotioninas estão presentes em vertebrados, plantas, fungos, algas e até em bactérias metais-resistentes.^{20,21}

1.3. Espectrometria atômica²²

O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de

radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A espectrometria de absorção atômica (AAS - do inglês Atomic Absorption Spectrometry) utiliza esse fenômeno para a determinação quantitativa de elementos (metais, semimetais e alguns não metais) em uma ampla variedade de amostras, tais como materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos, sedimentos e plantas), de alimentos, geológicos, tecnológicos entre outras. Os dois tipos de atomizadores mais usados em AAS são a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg/L, enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ETAAS - do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g/L}$).

1.3.1. Aspectos Históricos da Espectrometria de Absorção atômica²²⁻²⁶

Os primeiros estudos referentes a absorção de luz datam de 1802, quando Wollaston e Fraunhofer descobriram a existência de linhas escuras no espectro da luz solar. Essa descoberta foi, posteriormente, melhor investigada por Fraunhofer que constatou que as linhas escuras indicavam a absorção de parte da energia da luz solar.

Em 1820, Brewster estudando a absorção da luz, chegou à conclusão de que as raias de Fraunhofer poderiam ser devidas à presença de vapores atômicos na atmosfera solar, os quais absorveriam parte dessa radiação. Nesse mesmo ano, Kirchhoff e Bunsen estabeleceram o princípio da absorção, após estudar sistematicamente várias linhas do espectro dos metais alcalinos e alcalino-terrosos.

Em 1900, Max Planck estabeleceu a lei quântica de absorção e emissão da radiação, de acordo com a qual um átomo pode somente absorver radiação de comprimento de onda bem definido.

Em 1955, o físico australiano Alan Walsh verificou que a maior parte dos átomos livres, presentes em uma chama, permanecia no estado fundamental, pois a chama não tinha energia suficiente para promover transições eletrônicas para níveis mais elevados (exceto para os metais alcalinos e alguns alcalino-terrosos). Assim, com base nas leis de Kirchhoff e Planck, os átomos gerados em uma chama poderiam absorver a radiação proveniente de uma fonte de radiação primária e a quantificação dessa atenuação poderia ser utilizada para a determinação quantitativa dos mesmos.

Dessa forma, Walsh propôs o conceito da espectrometria de absorção atômica (AAS) e montou o primeiro protótipo de um espectrômetro de absorção atômica. No mesmo ano, Alkemade e Milatz também propuseram um espectrômetro de absorção atômica, porém, Walsh é, reconhecidamente, o pai da técnica, devido a sua insistência com a nova técnica e com as contribuições no desenvolvimento das lâmpadas de catodo oco.

Com base no princípio fundamental, o elemento metálico de interesse, no estado atômico vapor, absorve a radiação de um certo comprimento de onda específico pela transição de elétrons, principalmente da camada de valência, para um nível mais energético. Em condições ideais, a quantidade de radiação absorvida está diretamente relacionada com a concentração de átomos no estado fundamental.

Os primeiros espectrômetros de absorção atômica apresentavam uma chama como atomizador, uma lâmpada de catodo oco como fonte de radiação específica para o elemento a ser determinado, que é ainda hoje a fonte de radiação mais utilizada em absorção atômica,

um monocromador para selecionar o comprimento de onda de interesse das linhas emitidas pela fonte de radiação, e uma válvula fotomultiplicadora, que transforma a energia da radiação eletromagnética não absorvida em um sinal elétrico (energia elétrica). Para evitar que as radiações emitidas pelo atomizador interfiram na quantificação, a radiação da lâmpada de catodo oco é modulada mecanicamente por um interceptor rotatório (“chopper”) nos equipamentos mais antigos, ou por corrente alternada, em sintonia com o amplificador que irá amplificar apenas o sinal modulado da fonte. O grande crescimento na produção de espectrômetros de absorção atômica ocorreu na segunda metade da década de 60, principalmente após a proposta de Amos e Willis de se utilizar chama óxido nitrosoacetileno.

A temperatura da chama de óxido nitroso e acetileno ($T_{\text{máx}} = 2850 \text{ }^{\circ}\text{C}$), associada às características redutoras, permitiram a atomização de diversos elementos refratários que não atomizavam eficientemente na chama ar-acetileno ($T_{\text{máx}} = 2250 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As aplicações da AAS foram mais ampliadas quando Holak propôs a determinação de As, Bi, Pb, Sb, Se, Sn e Te via geração de hidretos gasosos com a posterior atomização em uma célula de quartzo aquecida. Poluktov e Vitkun propuseram a determinação de Hg pelo método da geração do vapor a frio, que consiste na redução de íons de mercúrio II a mercúrio no estado fundamental, com posterior transporte para uma célula de quartzo colocada na posição do atomizador.

Em 1959, Boris V. L’Vov propôs o uso de um forno de grafite como atomizador para absorção atômica, com base em um modelo de forno proposto por King (1905). Pode-se considerar que essa técnica atingiu a maturidade a partir da proposição e aceitação das condições STPF “Stabilized Temperature Platform Furnace” propostas por Slavin e colaboradores, em 1979. Neste mesmo ano, Harnly propôs o primeiro espectrômetro de

absorção atômica com possibilidade de detecção simultânea, usando uma única lâmpada de xenônio como fonte de radiação contínua, podendo operar com chama ou com forno de grafite.

1.3.2. Conceitos básicos da espectrometria atômica²⁶⁻³¹

O átomo é constituído de um núcleo rodeado de elétrons. Todos os elementos possuem um número de elétrons que esta associada com o núcleo atômico dentro da estrutura orbital, que é única em cada elemento. Os elétrons ocupam posições nos orbitais em uma ordem e caminhos definidos. As energias mais baixas, que correspondem à configuração eletrônica estável do átomo, conhecidas como “estado fundamental”, são as configurações normais 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 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 anteriormente 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 esta diretamente relacionado com a transição eletrônica ocorrida. Sabendo-se que todos os elementos possuem estrutura

eletrônica única, e que o comprimento de onda da luz emitida é 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 “impressão digital do elemento”.

Primeira etapa



Segunda etapa

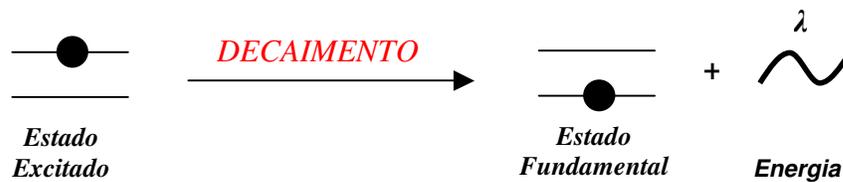


Figura 1- Processos de excitação e decaimento dos elétrons de valência e um átomo no estado fundamental. Fonte: Krug, F. J.³¹

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

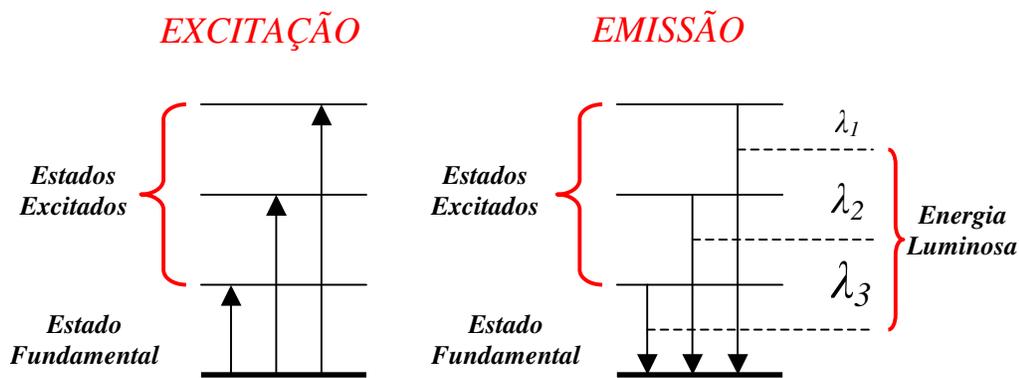
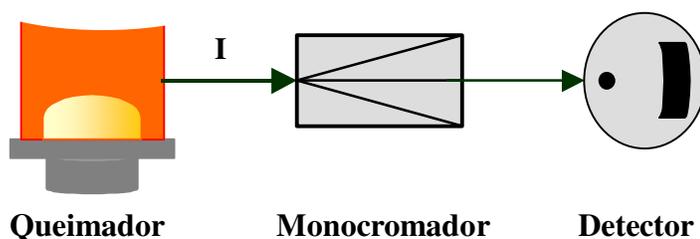


Figura 2 - Transições de energia envolvidas no processo de excitação de um átomo no estado fundamental. Fonte: Krug, F. J.³¹

O processo de excitação e decaimento para o estado fundamental está envolvido em todas as três linhas de espectroscopia atômica (emissão, absorção e fluorescência atômica). Também, a energia absorvida no processo de excitação e a 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 conforme o esquema ilustrado na 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 com característica única do elemento para identificação qualitativa. A emissão atômica utilizando arco elétrico vem sendo amplamente utilizadas em análises qualitativas.

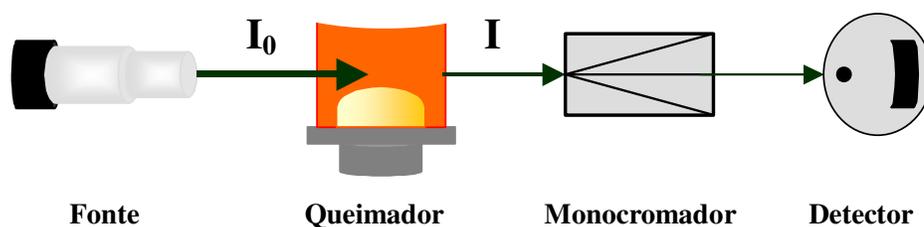
Técnicas de emissão também podem ser utilizadas para determinações quantitativas. A intensidade da luz emitida no comprimento de onda característico do elemento a ser determinado é quantificada, e esta emissão será maior de acordo com o número de átomos do analito presente na amostra. A técnica de Fotometria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



Quando a radiação 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, princípio fundamental da Absorção Atômica. (processo ilustrado na Figura 3). 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 dos analitos 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** abaixo: Espectroscopia de Absorção atômica. **Fonte:** Krug, F.J.³¹



1.3.2.1. Aspectos quantitativos da espectrometria de absorção atômica

Uma fonte, geralmente uma lâmpada de cátodo oco (HCL), emite radiação em 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, denominada I , é a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica e determinada pela

comparação entre os valores de I e I₀. A diferença de intensidade entre I e I₀ corresponde à concentração do analito dentro da amostra, como será detalhado a seguir.

Relação entre I₀, I e concentração:

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

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 1}$$

A transmitância indica 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.

$$\%T = 100 \times \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 2}$$

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

$$\%A = 100 - \%T \quad \text{Equação 3}$$

O termo absorbância é a quantidade matemática que pode ser representado por:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \text{Equação 4}$$

A absorbância também é o termo mais conveniente para caracterizar a radiação em espectrometria absorção, devido que a absorbância segue uma relação linear com a concentração, definida pela “Lei de Beer”.

$$A = abc \quad \text{Equação 5}$$

Aonde: “A” é a absorbância; “a” é o coeficiente de absorção, uma constante que é característica da espécie absorvendo em um comprimento de onda específico; “b” é o

comprimento do caminho percorrido pela radiação dentro da chama; e “c” é a concentração das espécies.

Esta equação representa, simplificadamente, 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, relação de linearidade é observada para certos intervalos de concentração (Figura 5).

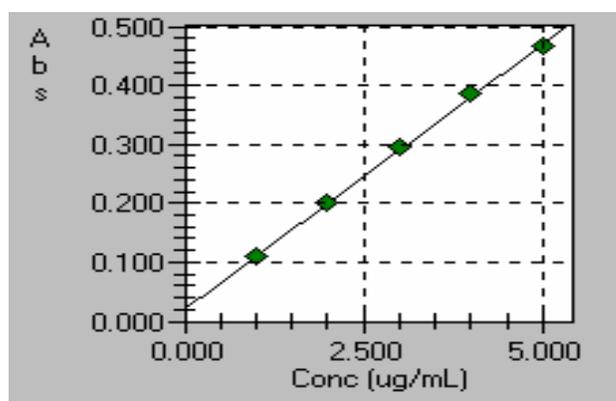


Figura 5. Curva analítica para o íon metálico cobre.

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

Quando a concentração e a absorbância aumentam, observa-se comportamento não ideal no processo de absorção em função da concentração, o que acarreta desvios da linearidade (não representado na Figura 5).

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 dos valores obtidos nestas curvas.

1.3.2.2. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

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, melhor sensibilidade é alcançada, com menor consumo da amostra.

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. Apresenta 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 um segundo (Figura 6).

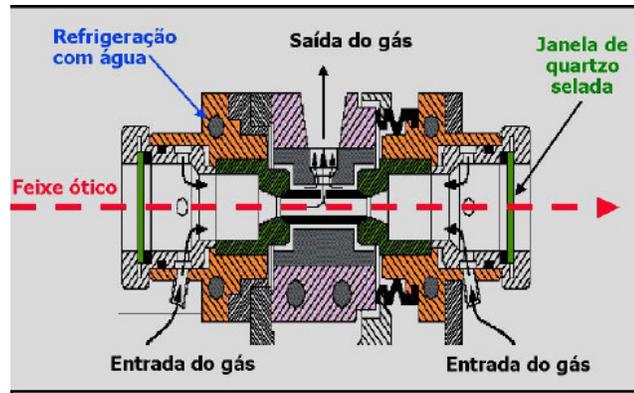


Figura 6. Representação de corte de forno de grafite com aquecimento longitudinal Varian.
 Fonte: Krug, F. J. ³¹

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 $\mu\text{g L}^{-1}$. 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 7).

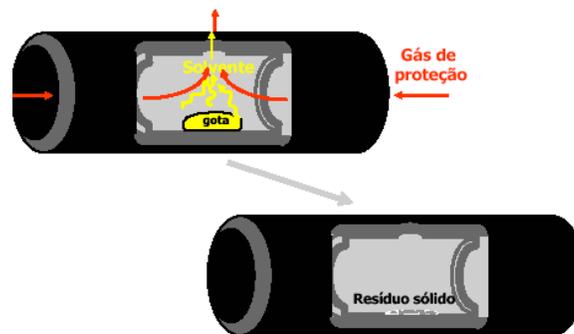


Figura 7. Etapa de secagem da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. Fonte: Krug, F. J. ³¹

Após a etapa de secagem, a matéria orgânica e outros concomitantes das amostras são incinerados em temperaturas da ordem de 450-1600 °C, separando o analito (metal, semi-metal) dos outros componentes da matriz sólida. Esta etapa do processo é denominada de pirólise (Figura 8).

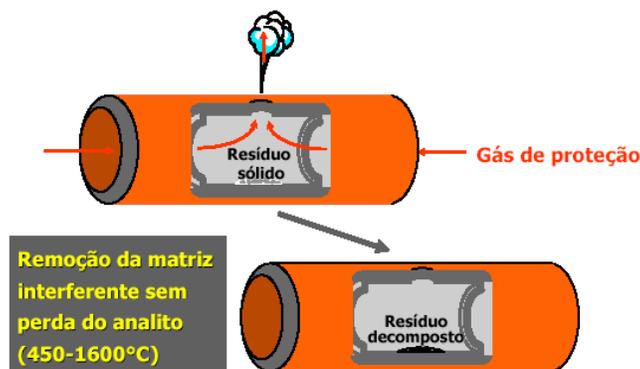


Figura 8. Etapa de pirólise da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. Fonte: Krug, F. J.³¹

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 2000 °C a 3000 °C, provocando formação de uma nuvem atômica dos analitos metálicos. Esta etapa é denominada de atomização (Figura 9) 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.

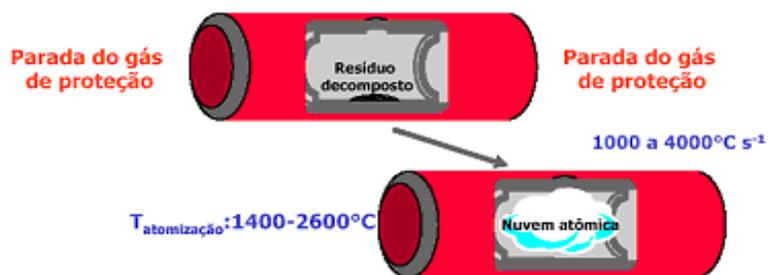


Figura 9. Etapa de atomização da amostras no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. Fonte: Krug, F. J.³¹

Após a medida da absorvância do analito, é feita 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 10.

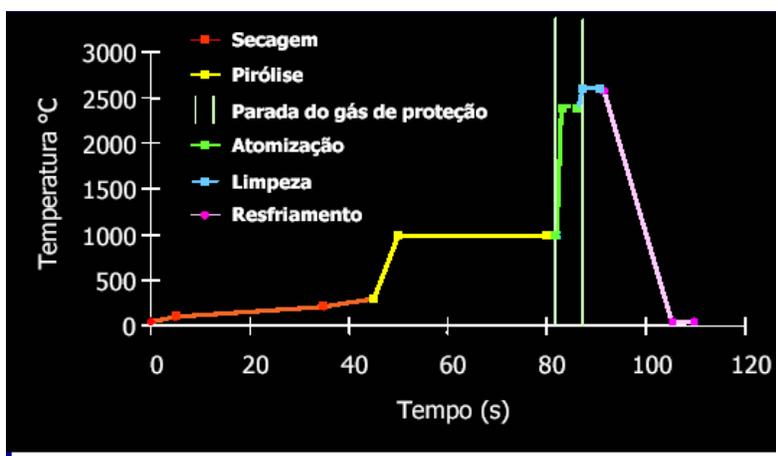


Figura 10. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Fonte: Krug, F. J.³¹

1.4. A frequência de ultra-sons³²⁻³⁹

Ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 20 kHz. Os ultra-sons respondem por região do espectro acústico, sendo subdividido em três regiões principais – a faixa do infra-sons ($v < 20$ Hz); a faixa sons ($20 \text{ Hz} < v < 20 \text{ kHz}$), perceptíveis aos humanos; e, a faixa dos ultra-sons ($v > 20 \text{ kHz}$). Para os ultra-sons pode ser assumida, ainda, uma subdivisão de faixas: ultra-sons de baixa frequência ($20 \text{ kHz} < v < 1 \text{ MHz}$) e alta frequência ($v > 1 \text{ MHz}$). As ondas ultra-sônicas de baixas frequências são aquelas que podem apresentar alta potência, enquanto que as ondas ultra-sônicas de alta frequência têm baixa potência, podendo ser aplicadas principalmente para fins de diagnóstico, tanto na medicina como na engenharia. Desta forma, utiliza-se, exclusivamente, as ações de ondas ultra-sônicas de baixa frequência e alta potência, as quais levam à alterações químicas e físicas no meio líquido onde as ondas são aplicadas.

Geradores de ondas ultra-sônicas de baixa frequência são comumente empregados em laboratórios de química e biologia, tanto para a limpeza de materiais, quanto para o rompimento das paredes celulares. Os equipamentos usualmente empregados são o banho ultra-sônico e a sonda ultra-sônica.

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

Em meio líquido, as ondas ultra-sônicas de alta potência produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação, no qual, dependendo da viscosidade, pode

ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação, as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso.

Ondas ultra-sônicas de frequência de 20 kHz e intensidade de 1 Watts cm^{-2} , ao se propagarem pela água (velocidade do som de aproximadamente 1500 m.s^{-1} e densidade = 1 g cm^{-3}), levam um corpúsculo a deslocamentos de aproximadamente 0,93 mm em torno de um ponto central, com velocidade máxima de $11,7 \text{ m.s}^{-1}$. A aceleração máxima que este corpúsculo estaria submetido seria de aproximadamente 16 km s^{-2} , ou seja, 1600 vezes maior que a aceleração da gravidade. Adicionalmente, a variação de pressão calculada para a situação apresentada seria de 1,7 MPa. Porém, este exemplo trata do efeito da propagação de onda ultra-sônica de 1 Watts cm^{-2} , e processadores ultra-sônicos superiores a 100 Watts são facilmente encontrados. Portanto, as velocidades máximas, pressões e acelerações serão tão mais intensas quanto maior a potência do gerador de ultra-sons.

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

Porém, a energia resultante da ação direta dos ultra-sons não seria capaz de provocar efeitos como aqueles observados durante a sonificação, como o rompimento de ligações inter e intramoleculares. Estudos realizados com líquidos puros e soluções aquosas demonstraram outras potencialidades da aplicação da energia acústica, ao mesmo tempo em que induziram a uma reflexão sobre o emprego de ultra-som no preparo de amostras.

Os estudos pioneiros na caracterização dos efeitos químicos provocados por ondas ultra-sônicas implicando na transformação de espécies químicas foram realizados por Miller em 1950. Tais estudos comprovaram a cisão das ligações H-O em moléculas de água e a produção de peróxido de hidrogênio no meio irradiado. O fenômeno envolvido na cisão homolítica de ligações foi denominado de sonólise da água, o qual leva a produção direta dos radicais livres H e HO· no meio.

A elevada reatividade dos radicais livres favorece a rápida interação destas espécies com íons, moléculas, ou ainda, a combinação entre radicais, com a conseqüente produção de novas espécies moleculares (H₂O₂), ou ainda, novos radicais livres (O₂H).

Os efeitos das ondas ultra-sônicas foram constatados em diferentes estudos submetendo água pura aos ultra-sons de baixa frequência; entre estes efeitos, estão: a oxidação de íons Fe²⁺ em meio aquoso, a degradação de polímeros e a formação de peróxido de hidrogênio.

Em investigações recentes também pôde ser constatada a diminuição significativa da taxa de formação de peróxido de hidrogênio sob sonificação com o aumento da concentração de NaCl presente na solução submetida a sonificação. Contudo, esses efeitos provocados pelo ultra-som não são habitualmente aplicados no desenvolvimento de métodos e procedimentos de análise química.

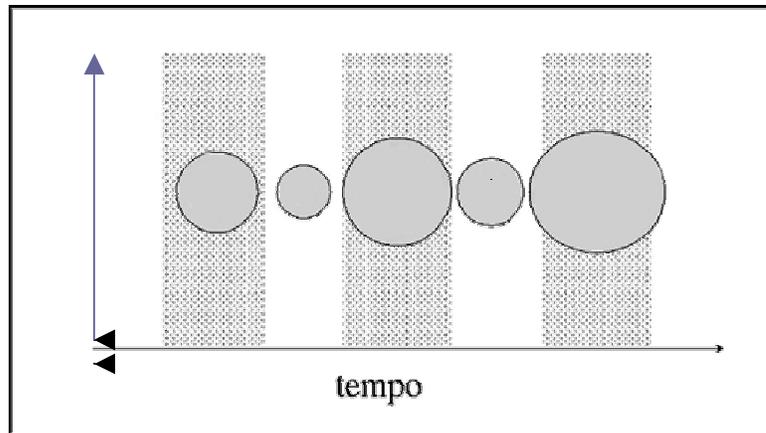


Figura 11 - Ocorrência da cavitação acústica
Fonte: Korn, M.; Pereira, M. G.; Borges, S.S.³²

A influência dos ultra-sons no aumento da reatividade química é devido às evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas ondas em sistemas químicos. A principal causa desses efeitos é a cavitação que pode ser considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonificação (Figura 11). Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio, proporcionando o aumento da temperatura e da pressão na microrregião onde ocorreu o colapso.

1.4.2. Principais aplicações dos ultra-sons

A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras e para a descontaminação de efluentes. No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes; no tratamento de efluentes, as elevadas temperaturas e pressões proporcionam a degradação térmica e/ou radicalar de espécies

orgânicas contaminantes, levando à completa mineralização das espécies para tempos prolongados de sonificação.

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

A redução do tamanho de partícula é um dos benefícios mais notórios da sonificação nos procedimentos de lixiviação e dissolução, visto que muitas reações são limitadas pela área superficial efetiva exposta aos reagentes, resultando em perdas de reprodutibilidade, rendimento e produtividade analítica. A ruptura das partículas e o conseqüente aumento da área superficial são provocados pelo colapso de microbolhas nos interstícios do sólido ou pelos violentos choques entre partículas, que chegam a alcançar velocidade superior a 500 m.s^{-1} , promovendo até a fusão de fragmentos metálicos. Por outro lado, bolhas formadas nas proximidades das partículas tornam-se assimétricas e, ao sofrer colapso, originam microjatos de líquido com velocidades superiores a 100 m.s^{-1} . Estes jatos são sempre direcionados para a superfície do sólido, resultando na erosão e, conseqüentemente, na renovação da superfície, aumentando a reatividade entre solvente e amostra.

A principal vantagem do ultra-som em extrações reside na diminuição do tempo de processamento e na utilização de soluções diluídas de ácidos minerais. Caso as

determinações sejam conduzidas para a obtenção da quantidade total do analito, eventuais modificações na forma original do íon metálico não são consideradas; já que a eficiência de extração de íons metálicos depende da matriz, natureza e concentração da espécie extratora.

Entre as várias outras aplicações dos ultra-sons para a determinação de metais, destacam-se a formação de suspensões para análise direta em sólidos, descontaminação de recipientes para armazenamento de amostras e favorecimento cinético de reações de complexação. Nestas situações, a integridade e identidade das espécies de interesse foram mantidas seguindo o critério de rastreabilidade. Contudo, não poderão ser garantidas, caso o analito sofra transformações aleatórias e múltiplas durante o processo de análise, pois o preparo de amostras empregando ultra-som pode acarretar transformações múltiplas e bruscas das espécies de interesse notadamente se estas forem voláteis. Entre os compostos orgânicos voláteis que são degradados durante a sonificação, o grupo dos clorometanos leva destaque, levando à geração de HCl, HClO e CO₂.

No âmbito da proteção ambiental, a energia ultra-sônica apresenta efeitos interessantes para o tratamento de águas e efluentes aquosos, já que leva à destruição de microorganismos patogênicos e promove a degradação térmica e/ou radicalar de diferentes classes de poluentes. A depender do poluente, a combinação da energia ultra-sonora com processos avançados de oxidação, tais como radiólise e ozonólise, origina procedimentos promissores. Adicionalmente, a eficácia do ultra-som na descontaminação de efluentes quanto à presença de microorganismos, é atribuída à ruptura das células microbianas, ocasionando o escoamento do líquido citoplasmático.

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

excelentes perspectivas para o preparo de amostras, bem como para algumas etapas acessórias ao processamento analítico, como podem ser considerados a geração de reagentes e o tratamento de resíduos de análises químicas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YOUNG, L.G.; LOW, A.G.; CLOSE, W.H. Digestion and metabolism techniques in pigs. In : MILLER, E.r.; ULLREY, D.E.; LEWIS, A.J. **Syine nutrition**. Stoneham: Butterworth-Heineman, cap.39, p.623-630,1991.
2. KABIR, N.M.J.; WEE, K.L.; MAGUIRE, G. Estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using different markers. 1. Validation of microtracer F-Ni as a marker. **Aquaculture** n 167, p.259-272, 1998.
3. BONFIM, M. A. D.; LANNA, E. A. T. Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade dos alimentos para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**. Ano 1, v.1, Artigo n.3, Agosto 2004.
4. SULLIVAN, J. A., REIGH, R. C., 1995. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* ♀ x *Morone chrysops* ♂). **Aquaculture**, 138, p.313-322.
5. AUSTRENG, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. **Aquaculture**, 13, p. 265-272.
6. KANE, E. A.; JACOBSON, W. C.; DAMEWOOD, P. M. Jr., 1959. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **J. Dairy Sci.** 42, p. 1359-1366

7. RINGO, E.,1993. The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water-reared Arctic char (*Salvinus alpinus*). **Aquacult. Fish. Manag.** 24, p. 31-34.
8. DE LA NOUE, J., CHOUBERT, G., 1986. Digestibility in rainbow trout: Comparison of the direct and indirect methods of measurement. **Prog. Fish Cult.** 48, p. 190-195.
9. DE SILVA, S. S., PERERA, K. M., 1984. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry: Effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. **Aquaculture**, 38, p. 293-306.
10. SHAHAT, T.M1993. Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. **Vet. Med. J.** 41, p. 83-91.
11. BELCHIER, R.; FORSTER, H. The destruction of organic matter. New York Pergamon Press Ltd., 1970 p. 19-26.
12. MARCZENKO, Z. **Spectrophotometric determination of elements**. Chichester: Ellis Horwood, Halsted Press, 1976. p.211-215.
13. ANDERSON L.; DEBBLE M.V.; TURKKI P.R.; MITCHELL H.S.; RYNBERGEN H.J. **Nutrição**. 17^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 737p.
14. ROMANOWSKI, S.M.M.; MANGRICH, A.S.; NEVES, A., 2001. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v.24, no.5, p.592-598,.
15. VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentals of biochemistry**. Upgrade Edition, John Wiley & Sons, Inc., p. 931, 2002.

16. FENTON, D.E. Biocoordination Chemistry. New York: **Oxford Chemistry Primers**, p. 96, 1995.
17. GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z., 2006. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15.
18. VALLEE, B.L. Metallothionein historical review and perspectives. In: J.H.R. Kagi, M. Nordberg (Eds.). **Metallothionein. Birkhauser**, Switzerland, 1979. p.19–40.
19. KAGI, J.H.R.;SCHAFFER, A., 1988. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v.27, n.3, p.8509–8515.
20. STILLMAN, M.J.; SHAW, C.F.; SUZUKI, K.T. Metallothioneins. In: M.J. Stillman, C.F. Shaw, K.T. Suzuki (Eds.). **Metallothioneins**. New York: VCH Publishers, 1992. p.1-13.
21. ARNESANO F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M.S. An Italian contribution to structural genomics: **Understanding metalloproteins. Coordination Chemistry Reviews** (In Press), 2006.
22. WELZ. B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPE, U., 1984. 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.
23. JACKSON, K.W., **Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry**, John Wiley & Sons Ltda, Chichester, England, 1999.
24. BUTCHER, D.J.; SNEDDON, J., **A Practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.

25. JENNISS, S.W.; KATZ, S.A.; LYNCH, R.W., **Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring**, 2a ed., Wiley-VCH, New York, 1997.
26. L'VOV, B.V., **Atomic Absorption Spectrochemical Analysis**, 1a ed., Adam Hilger, London, 1970.
27. PINTA, M., ed, **Spectrometrie d'absorption atomique**, Volumes I e II, Masson, Paris, 1980.
28. TSALEV, D.L.; ZAPRIANOV, Z.K., **Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice**. Volume I. Boca Raton, CRC Press, Inc., Florida, 1983.
29. TSALEV, D.L., **Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice**. Volume III. Boca Raton, CRC Press, Inc., Florida, 1995.
30. LAJUNEN, L.H.J., **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**, **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 1992.
31. KRUG, F. J. **Espectrometria atômica e abertura de amostras**. Curso ministrado Universidade de São Paulo. CENA. 2003
32. KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S., 2001. **Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons**. **Boletim Técnico**, Universidade do Estado da Bahia, p. 51-55.
33. MASON, T. J.; LORIMER, J. P., 1989. **Sonochemistry**: Theory, applications and uses of ultrasound in Chemistry, New York: Ellis Horwood, p. 252.
34. KRUG, F. J. "Methods of Sample Decomposition", In: **IV Workshop on Sample Preparation, Salvador-Brazil**, 2003.
35. VALCÁRCEL, M., 2000 "Principles of Analytical Chemistry". Ed. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, p. 534.

36. TIEHM, A.; MASON, T. J., 2001. Advances in Sonochemistry – Ultrasound in Environmental Protection – Vol. 6. New York: **Elsevier Science B.** V, p. 273.
37. FIGUEIRAS, A. V., CAPELO, J. L., LAVILLA, I., BENDICHO, C., 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 53, 433-441.
38. ELIK, A., 2005. Ultrasound assisted pseud-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 66(4), 882-888.
39. ELIK, A., 2007. Ultrasound assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. **Talanta**, 71(2), 2007, 790-794.

CAPÍTULO - II

Avaliação da digestibilidade de cobre em amostras de ração de peixes utilizando amostragem em suspensão e determinação por GFAAS

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e otimizar um método para determinação de cobre 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 recoberto internamente com carbeto de tungstênio como modificador permanente. Os limites 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 cobre) foram de 0,24 e 0,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as suspensões padrão de fezes e de 0,26 e 0,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as suspensões padrão de ração. O método proposto foi aplicado em estudos de digestibilidade de cobre em diferentes amostras de rações de peixes e mostraram-se de acordo com os resultados obtidos utilizando amostras previamente mineralizadas por digestões ácidas utilizando-se forno de microondas.

Palavras-chave: Nutrição de peixes, absorção de cobre, modificador químico, espectrometria atômica em forno de grafite.

Evaluation of digestibility of copper in fish feed samples using slurry sampling and GFAAS determination

Abstract

The aim of the present work was to develop and optimize a method to determine copper in samples of feces and fish feed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) through the direct introduction of slurries of the samples into the spectrometer's graphite tube coated internally with tungsten carbide that acts as chemical modifiers. 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 copper) were 0.24 and 0.79 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the standard feces slurries and 0.26 and 0.87 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the standard feed slurries. The proposed method was applied in studies of digestibility of copper in different fish feeds and their results proved compatible with that obtained from samples mineralized by acid digestion using microwave oven.

Keywords: *Fish nutrition, copper absorption, chemical modifier, graphite furnace atomic absorption spectrometry.*

1. Introdução

Na nutrição animal os minerais são classificados como macrominerais (minerais que o organismo necessita em grandes quantidades) e microminerais (que o organismo necessita em menores quantidades). São classificados os elementos essenciais, em macroelementos (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre) e microelementos, (ferro, iodo, selênio, cobalto, manganês, zinco e cobre) (Solomons, 1982; Smith, 1987; Macdowell, 1992).

Assim como outros nutrientes metálicos, o cobre é um elemento essencial na nutrição dos peixes (Knox, Cowey & Andron 1982). Tanto a deficiência quanto o excesso desse micronutriente metálico pode causar alterações nas funções fisiológicas e na resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções. Adequado suprimento de cobre na ração é indispensável ao funcionamento normal do organismo e conseqüentemente ao desenvolvimento do animal (Ogino & Yang 1980; Watanabe, Kiron & Satoh 1997). O cobre possui importantes funções no organismo dos peixes, sendo necessário no metabolismo de vários nutrientes e como constituinte de diversas enzimas (Murai, Andrew & Smith 1981; AOAC 1995). Esse elemento é indiretamente responsável também pela formação do colágeno e elastina, pela conversão da tirosina em melanina em destruição de anions superóxido, que são espécies reativas do oxigênio, potencialmente destrutivos para as células. O excesso desse mineral pode causar efeitos nocivos ao organismo, como intoxicação hepática e formação de complexos insolúveis junto com outros elementos metálicos, influenciando diretamente na absorção do cobre. (Knox, Cowey & Andron 1982; Ogino & Yang 1980; Watanabe, Kiron & Satoh 1997).

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 cobre, nos estudos de nutrição de peixes, torna-se fundamental. Nesse contexto, a determinação de analitos metálicos em suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite apresenta-se como uma técnica bastante robusta (Bendicho & Loos-Vollebregt 1991; Millerihli 1993; Liang, Li & Rao 1996). 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 ampla variedade de elementos

traços, considerando-se que o atomizador pode agir como reator químico, tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de decomposição prévia total da amostra (Bendicho & Loos-Vollebregt, 1991).

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de cobre, em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes por espectrometria de absorção atômica em forno de Grafite (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 piscicultura.

2. Experimental

2.1. Reagentes, soluções padrão e amostras

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

Soluções estoque do analito foram preparadas a partir de reagentes de pureza espectroscópica. 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 ficaram imersas em ácido nítrico 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por agitação antes da utilização.

As amostras de fezes de peixes foram coletadas após experimentos de digestibilidade envolvendo alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que foram submetidos à dieta com diferentes fontes alimentares. Esses experimentos foram desenvolvidos do laboratório de Nutrição de Peixes (Aquanutri) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP e Departamento de Química e Bioquímica (Instituto de Biociências). UNESP - Campus de Botucatu.

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. Para isso, uma massa de aproximadamente 1,0 g da amostra foi colocada em frasco de polycarbonato juntamente com a barra magnética, foi devidamente fechado, e imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante (20 impactos s⁻¹) a amostra foi pulverizada. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu uma primeira etapa de dois minutos para o pré-congelamento, um minuto de pulverização, novamente um minuto de congelamento, e uma segunda etapa que compreendeu dois ciclos com dois estágios de pulverização e congelamento, perfazendo um tempo total de oito minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que 60 µm (Rosa et al., 2002).

Uma parte das amostras foram também mineralizadas em forno de microondas. Para isso, massas de 100 mg de amostras moídas criogenicamente foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,5 mL de ácido nítrico suprapuro (14 mol L⁻¹) mais 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado encontra-se descrito na Tabela 1 (Rosa et al., 2002).

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de rações e fezes de peixes em forno de microondas.

Etapas	Potência W	Tempo Min.
1	200	5
2	400	10
3	Ventilação e adição do H ₂ O ₂	5
4	500	5
5	700	3
6	Ventilação	5

2.2. Material biológico utilizado no preparo das suspensões padrão

Foi preparada uma ração isenta de alguns nutrientes metálicos (no caso, isenta de cálcio, ferro, cobalto, cobre, manganês, selênio e zinco). Essa ração foi formulada com amido desidratado, albumina e um premix contendo óxido de potássio e magnésio. Um lote de alevinos de Tilápia do Nilo foi alimentado com essa ração. Decorrido o período de alimentação os peixes foram transferidos para aquário de coleta de fezes, com fundo cônico para favorecer a decantação das fezes. Após a coleta, as fezes foram tratadas conforme descrito no item anterior, no entanto, após a moagem criogênica foram lavadas exaustivamente com solução a 0,10 mol L⁻¹ de ácido nítrico suprapuro, água ultrapura e secas conforme descrito no item anterior.

2.3. Preparo das suspensões das amostras

Após a moagem criogênica, 5 mg de amostras do material biológico foram transferidas diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 5 µL de ácido nítrico 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 (utilizando uma potência de 136 W), diretamente nos copos do autoamostrador.

2.4. Instrumentação

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

Para determinação de cobre 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 cobre SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 324,8 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.

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

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE, foi utilizado para agitação das suspensões padrão e suspensões das amostras de fezes e rações de peixes.

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

Os tubos de grafite com plataforma utilizados nas determinações de cobre tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio. 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 2. Esse procedimento foi repetido 20 vezes, obtendo-se uma massa de 500 µg de carbeto de tungstênio depositada na plataforma do tubo de grafite (Lima, Barbosa, et al., 2001).

Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da parede interna do tubo de grafite com carbeto de tungstênio.(fluxo de gás sem interrupção).

Etapa	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
1	110	5	25	0.30
2	150	10	25	0.30
3	600	10	20	0.30
4	1200	10	20	0.30
5	2000	3	2	0.30
6	2200	0	5	0,30

2.6. Preparo das suspensões padrão

Suspensões padrões foram preparadas nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões de amostras de ração e fezes, utilizando, no entanto, 5 mg de material biológico isento de cobre. Dessa forma, no preparo da curva analítica, volumes de 4, 8, 16, 20 e 40 µL de solução padrão contendo 250 µg L⁻¹ de cobre foram transferidos para os frascos do autoamostrador do espectrômetro (que continham 5 mg de material biológico mais: 5 µL de ácido nítrico suprapuro 14 mol L⁻¹, 50 µL de Triton X-100 a 1% v/v e 100 µL de solução 1000 mg L⁻¹ de Pd(II)). Em seguida, os volumes finais foram acertados para 1000 µL com água ultrapura, de modo que a concentração final de cobre nas suspensões ficasse na faixa de 1,00 a 10,00 µg L⁻¹.

Soluções padrão aquosas, em meio de HNO₃ 10% v/v e contendo as mesmas faixas de concentração das suspensões padrão, foram também utilizadas no preparo de curvas analíticas para determinação de cobre nas amostras de fezes e rações mineralizadas por digestão ácida utilizando forno de microondas.

Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de Cu em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	150	10	0	1
Secagem	250	10	5	1
Pirólise	1300	10	5	1
Pirólise	1600	5	20	1
Atomização	2400	1	5	0 (leitura)
Limpeza	2800	5	0	1

2.7. Procedimentos analíticos

Após a etapa de sonificação da suspensão padrão e/ou suspensão de amostra, feita diretamente nos copos do autoamostrador, um volume de 20 µL de padrão ou amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite (recoberto internamente com carbetto de tungstênio) pela micro pipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com cinco repetições. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de cobre encontra-se descrito na Tabela 3.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização das condições instrumentais

O comportamento eletrotérmico do cobre nas amostras biológicas (rações e fezes de peixes) foi avaliado por meio de curvas de temperatura de pirólise e de atomização,

utilizando-se tungstênio como modificador permanente e Paládio, injetado junto com as suspensões de amostras e/ou padrões. Procurou-se otimizar programas de aquecimento de modo a definir os parâmetros de tempo e temperatura para as etapas de secagem, pirólise e atomização. A temperatura de pirólise considerada ótima foi a que permitiu a máxima eliminação de concomitantes da matriz sem a perda da estabilidade térmica do cobre. Na escolha da temperatura ótima de atomização foi considerado principalmente o melhor sinal transiente com o posterior retorno à linha de base, para um tempo de integração de 5 s. O comportamento eletrotérmico do cobre no estudo de otimização da temperatura de pirólise é mostrado na Figura 1 (curvas a, b, c e d). A estratégia de uso de um modificador do grupo da platina, no caso o Paládio, injetado junto com a amostra sobre o modificador permanente, favorece a mistura do primeiro com a amostra durante a etapa de secagem, e a interação do modificador-analito, principalmente quando a matriz apresenta grande teor de matéria orgânica (Aleixo, et al., 2000; Lima, et al., 2001; Zanão, et al., 2002; Barbosa, De Souza, et al., 2004). Conforme mostra a Figura 1 (curva a e b) foi possível obter a estabilização térmica do cobre até uma temperatura de pirólise de 1600 °C, o que foi fundamental para se eliminar os concomitantes da matriz. A Figura 1 (curva c e d) mostra que utilizando-se a associação dos dois modificadores químicos (Paládio e Tungstênio) foi possível obter temperatura de atomização de 2400 °C, com leituras de absorvância bastante estáveis e com ótimas repetibilidade e reprodutibilidade.

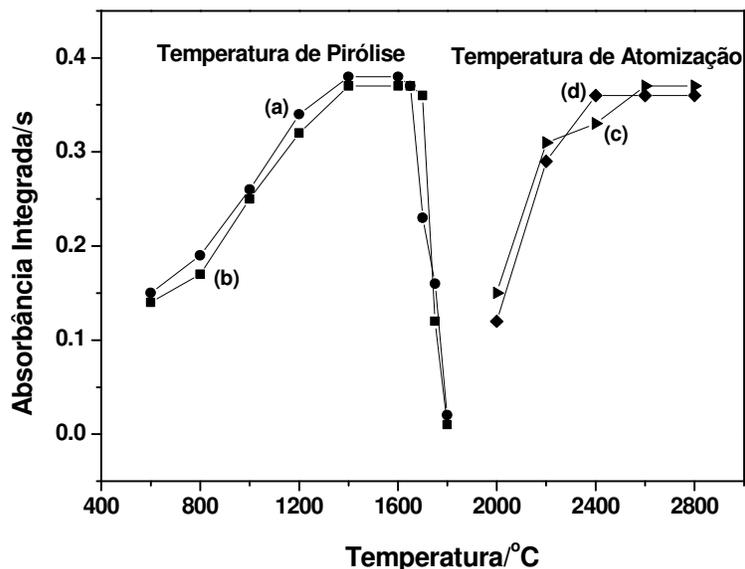


Figura 1. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização das suspensões padrão de rações e fezes de peixes contendo $10,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. Temperatura de pirólise: Suspensões de fezes - Curva a, Suspensões de ração – Curva b; Temperatura de atomização: Suspensões de fezes - Curva c, Suspensões de ração – Curva d.

Os sinais de absorção atômica (AA) e do fundo (BG) obtidos são mostrados na Figura 2 (Gráficos a e b). Pode-se observar que ambos os sinais de AA mostram-se bem definidos e homogêneos, com tempos de aparecimento e retorno à linha de base bem próxima. A associação dos dois modificadores químicos mostrou-se bastante efetiva na degradação dos concomitantes da matriz, o que permitiu também liberação mais homogênea do analito na etapa de atomização.

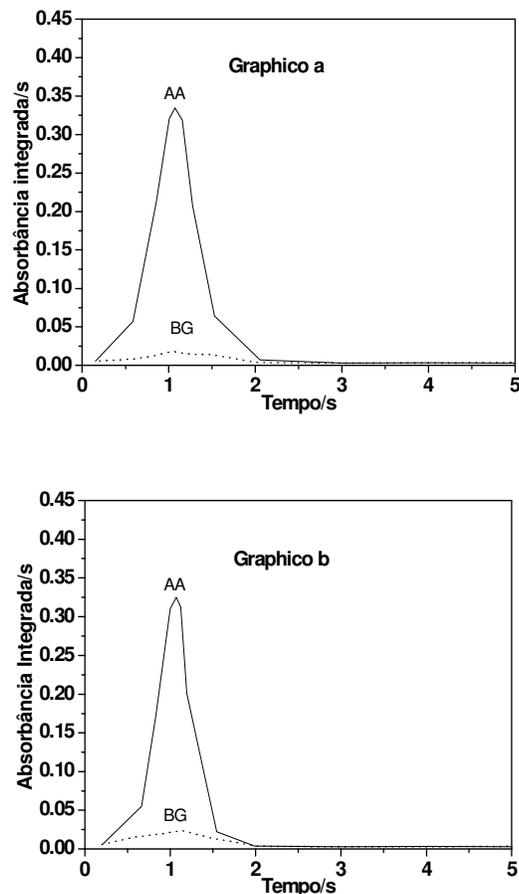


Figura 2. Sinais de absorção atômica (AA) e de fundo (BG) obtidos na atomização do nas suspensões padrão de rações e fezes de peixes contendo $10,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (Gráfico a – Suspensão de fezes, Gráfico b – Suspensão de rações).

3.2. Otimização do tempo de sonificação das suspensões

A homogeneização das suspensões dos materiais biológicos depende da eficiência da agitação ultra-sônica, o que permite obter melhor reprodutibilidade entre as medidas (Lima, et al., 2002). Assim, o tempo de sonificação das amostras foi avaliado no intervalo de 5 a 60 s de agitação. Na Figura 3 (pág 43) é mostrada a influência do tempo de sonificação das amostras sobre os sinais de absorbância obtidos para o cobre. Analisando-se a Figura 3, observa-se que os sinais de absorbância permanecem constantes a partir de 40 s de

sonificação. Esse tempo de sonificação foi considerado ótimo, pois além de obter bom sinal de absorbância, o desvio padrão real (RSD) entre as medidas foi relativamente baixo (2 %).

3.3. Obtenção das curvas analíticas

Considerando-se os parâmetros físicos 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 cobre na faixa de concentração de 1,00 – 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (descrita no item Preparação de suspensões padrão). A Figura 4 mostra as curvas analíticas obtidas com as suas respectivas equações das retas.

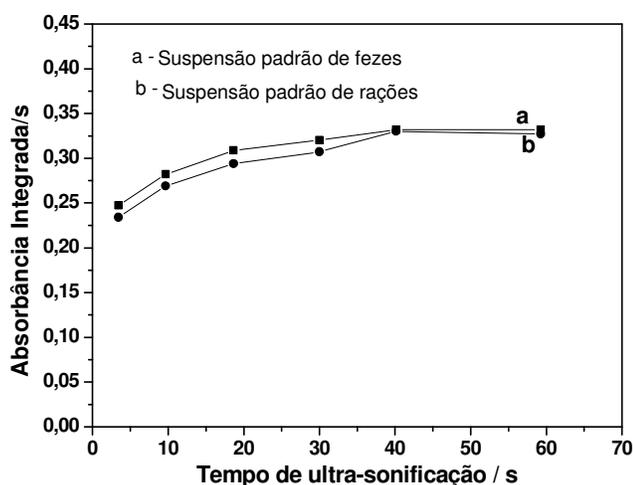


Figure 3. Influência do tempo de ultra-sonificação sobre o sobre o sinal de absorbância do cobre nas suspensões padrão contendo 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

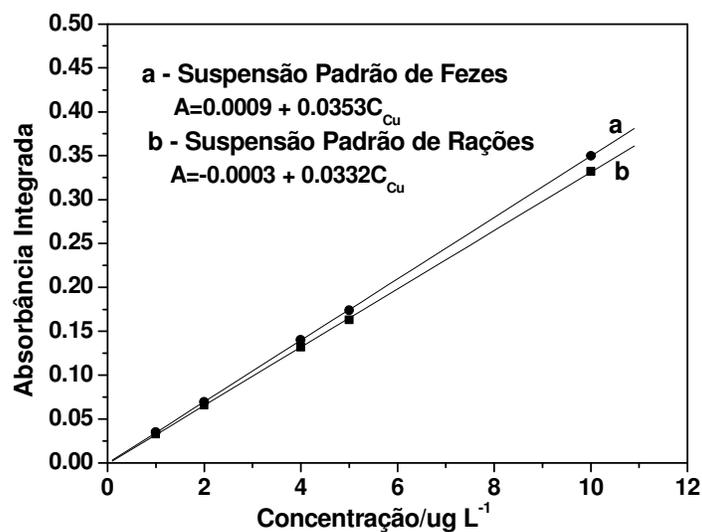


Figura 4. Curvas analíticas de cobre obtidas a partir de suspensões padrão de fezes e rações de peixes contendo 1,00, 2,00, 4,00, 5,00 e 10,00 µg L⁻¹ de cobre.

A calibração de sistemas via compatibiliza de matriz, proporciona a degradação e a eliminação quantitativa da matéria orgânica, quando se trabalha com suspensões (Lima, et al., 2002; Barbosa, et al., 2004). No caso do presente estudo, toda a otimização do programa de aquecimento foi feita utilizando-se suspensões padrão de rações e fezes de peixes. Desta forma, comparando-se a curva analítica das suspensões padrão de fezes com a preparada com suspensões padrão de rações (Figura 4), observa-se que estas apresentam perfis semelhantes, com os valores dos coeficientes angulares bem próximos ($k = 0,0353$ e $k = 0,0332$, respectivamente para a suspensão padrão de fezes e de ração). A possibilidade da utilização de padrões aquosos para calibração do sistema, foi descartada, porque poderiam ter erros devido às diferenças observadas entre os coeficientes angulares das retas obtidos nos meios em suspensão e aquosos ($k_{\text{aquoso}} = 0,0117$). Em relação à figura de mérito analítico do método proposto, foram observadas boas correlações entre as absorbâncias integradas e as concentrações do analito, sensibilidade bastante significativa conforme mostram os valores dos limites de detecção e quantificação e das massas características, apresentados na Tabela 4 (Currie, 1999).

Tabela 4. Valores dos Limites de Detecção (LOD), Limites de Quantificação (LOQ) e Massas Características (mo) calculadas para o cobre utilizando-se os dados obtidos das curvas analíticas de suspensões padrão de fezes e rações de peixes.

Suspensões Padrão	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	mo (pg)
Fezes	0,24	0,79	25,15
Ração	0,26	0,87	26,49

A utilização do tungstênio como modificador permanente, aumentou significativa a vida útil do tubo de grafite, cerca de 720 queimas contra 260 queimas, quando se utiliza o modificador convencional (como por exemplo, a mistura nitrato de magnésio e nitrato de paládio). Considerando a complexidade das amostras biológicas, o tempo de vida útil dos tubos utilizando o método proposto é compatível com outros métodos descritos na literatura (Alvarez, Carrión & Gutiérrez 1996; Lima, et al., 2001; Shiue, Mierzwa & Yang 2001).

Os desvios-padrão relativos calculados, utilizando-se ensaios de adição e recuperação dos analitos (Tabela 5), foram sempre menores que 5%, mostrando que o método apresenta boa repetibilidade e exatidão entre as medidas. A exatidão do método também foi verificada empregando uma ração certificada (Corn Bran, RM 8433 – National Institute of Standards and Technology) contendo $2,47 \pm 0,40 \text{ mg Kg}^{-1}$ de cobre. O resultado dessa determinação (Tabela 5), também apresentou um desvio padrão relativo inferior a 5% (Tabela 5), o que reforça a boa exatidão do método proposto.

Tabela 5. Resultados (n=5) obtidos na determinação de cobre em amostras de rações enriquecidas utilizando o método proposto (amostragem em suspensão) e a mineralização das amostras em forno de micro-ondas.

Amostras de ração	Amostragem em suspensão (mg Kg ⁻¹)	Amostras mineralizadas (mg Kg ⁻¹)
Ração 1	10,30±0,25	10.25±0,28
Ração 2	12,15±0,31	12.20±0,33
Ração 3	11,20±0,28	11.14±0,30
Ração 4	9,12±0,15	9.04±0,18
Corn bran*	2,52±0,11	2.54±0,13

*Material de referência certificado (RM 8433, contendo 2.47 ± 0.40 mg Kg⁻¹ de Cu) from National Institute of Standards and Technology.

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 cobre de quatro amostras de rações (preparadas de diferentes fontes 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 óxido de crômio, marcador biológico utilizado em estudos de digestibilidade de nutrientes na nutrição animal (Silva, 2006), e de cobre nas amostras de rações e fezes dos animais em estudo, foi calculada a estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente de cobre na dieta dos alevinos de Tilápia do Nilo, utilizando-se a equação 1 (Sá, et al., 2004).

$$Da = 100 - \left[100 \left[\frac{\%Cr_2O_{3r}}{\%Cr_2O_{3f}} \right] \times \left[\frac{\%Cu_f}{\%Cu_r} \right] \right]$$

Nesta equação:

Da = Digestibilidade aparente;

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

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

$\%Cu_r$ = Porcentagem de cobre na ração;

$\%Cu_f$ = Porcentagem de cobre nas fezes.

Na Tabela 6 estão sumarizados os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente calculados com base nos resultados das determinações de cobre por GFAAS utilizando-se a amostragem em suspensão e a mineralização das amostras em forno de microondas.

Tabela 6. Coeficiente de digestibilidade de cobre de alevinos de Tilápia do Nilo alimentados com rações preparadas a partir de diferentes fontes alimentares.

	Rações			
	Levedura	Milho	Farelo de soja	Farelo de arroz
Coeficiente de				
Digestibilidade	72,40 ± 3,12*	70,12 ± 2,04*	71,80 ± 2,03*	70,35 ± 2,11*
(%)	71,80 ± 2,11#	71,10 ± 3,10#	73,10 ± 3,04#	72,12 ± 3,02#

*Cálculo baseado na $\%Cu$ determinado utilizando amostragem em suspensão

Cálculo baseado na $\% Cu$ determinado por GFAAS após mineralização das amostras em forno de microondas

A comparação dos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente de cobre presentes nos quatro tipos de ração utilizadas na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo, mostrados na Tabela 6, indica que os valores determinados utilizando-se o método proposto

(amostragem em suspensão) estão de acordo com os valores obtidos utilizando-se a mineralização das amostras de rações e fezes em forno de microondas. A mineralização das amostras, como etapa inicial do processo de quantificação de um nutriente metálico, normalmente é utilizada nos estudos de digestibilidade em nutrição de peixes (Furuya, et al., 2001., Pezzato, Barros, et al., 2002;; Sa, et al., 2004), o que reforça a aplicabilidade do método proposto nesses estudos.

4. Conclusões

O método proposto de quantificação de cobre por GFAAS utilizando-se amostras de rações e fezes de peixes na forma de suspensões, para se estimar a digestibilidade aparente desse nutriente de rações utilizadas em nutrição de peixes, obteve resultados equivalentes ao método utilizando 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 do 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.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de apoio técnico (Processo 03/13362-6, e 06/60751-2).

Referências Bibliográficas

Aleixo, P. C., Nóbrega, J.A., Santos, D.J., 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.

Alvarez, M. A., Carrión, N., Gutiérrez, H. (1996). Effects of atomization surfaces and modifiers of the kinetics of copper atomization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta, Part B*, 51: 1121-1132.

AOAC (1995). *Official methods of analysis* (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Barbosa, F., De Souza, S. S., Santos, D., Krug, F. J. (2004). Evaluation of electrodeposited tungsten chemical modifier for direct determination of chromium in urine by ETAAS. *Microchem J.*, 78 (1): 7-13.

Bendicho, C., Loos-Vollebregt, M. T. C. (1991). Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.6, n.5, p.353-374.

Curie, L. A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities¹ (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta*, 391(2): 105-126.

Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Pezzato, C. A., Barros, M. M., Miranda, E. C. (2001). Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 30, 1143-1149.

Knox, D., Cowey, C. B., Adron, J. W. (1982). Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27: 111-119.

Liang, Y. Z., Li, M., Rao, Z. (1996). Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Sci.*, 12: 629-633.

Lima, E. C., Barbosa, F., Krug, F. J., Vieira, M. B. (2001). ETAAS determination of copper in sediments using W-Rh permanent modifier. *At. Spectroscopy*, 22 (6): 414-421.

- Lima, E. C., Krug, F. J., Barbosa, F., Magalhães, C. E. C. (2002). Application of tungsten-rhodium permanent modifier in slurry analysis: Determination of cadmium. *Mikrochim. Acta*, 134 (1-2): 113-121.
- Mcdowell, L. R.(1992). Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, New York, 1-18.
- Millerihli, N. I. (1993). Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem*, 345: 482-489.
- Murai, T., Andrews, J. W., Smith, R. G. (1981). Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture*, 22: 353-357.
- Ogino, C.; Yang, G. Y., (1980). Requirement for carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 46: 455-458.
- Pezzato, L. E., Barros, M. M., Miranda, E. C., Pinto, L. G. Q., Furuya, W. M., Pezzato, A. C. (2002). Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 31, 1595-1604.
- Rosa, C. R., Moraes, M., Neto, J. A. G., Nóbrega, J. A., Nogueira A.R.A. (2002). Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.*, 79: 517-523.
- Sá, M. V. C., Pezzato, L. E., Barros, M. M, Padilha, P. M. (2004). Optimum zinc supplementation level in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture*, 238: 385-401.
- Shiue, M. Y., Mierzwa, J., Yang, M. H. (2001). Mechanism of the action of palladium-magnesium nitrate for graphite atomic absorption spectrometry. Performance for the determinations of 21 elements. *J. At. Spectrom.*, 16: 1172-1170.

- 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.
- Smith, R. M. (1987). *Trace elements in human and animal nutrition*, Academic Press, New York.
- Solomons, N. W. (1982). *Absorption and mal-absorption of mineral nutrients*, Alan R. Liss, New York.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151: 185-207.
- Zanão, R. A., Barbosa, F., De Souza, S. S., Krug, F. J., Abdala, A. L. (2002). Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W-Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer. *Spectrochim. Acta, Part B*, 57: 291-295.

CAPÍTULO - III

Digestibilidade de nutrientes metálicos em rações de peixes utilizando-se extração por ultra-som e determinação por espectrometria de absorção atômica por chama

Resumo

No presente trabalho é proposto um método para determinação de cálcio, magnésio, manganês e zinco em amostras de rações de peixes utilizando-se ultra-som no processo de extração dos analitos e posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). Utilizando como solução extratora HCl 0,10 mol L⁻¹, as condições ótimas de extração estabelecidas foram: massa de amostra de 100 mg; granulometria da amostra < 60 µm; tempo de sonificação de três ciclos de 10 s e potência de sonificação de 102 Watts. O método foi aplicado em estudos de digestibilidade desses nutrientes em amostras de rações utilizadas em dietas de alevino de tilápia do Nilo e mostraram-se concordantes com os resultados obtidos utilizando a mineralização das amostras de rações no processo de extração dos nutrientes metálicos.

Palavras-chave: Nutrição de peixes, absorção de nutrientes metálicos, ultra-sonificação, FAAS.

Digestibility of metallic nutrients in fish feed using ultrasound extraction and determination by flame atomic absorption spectrometry

Abstract

The aim of the present work was to develop and optimize a method for determination of calcium, magnesium, manganese and zinc in samples of feces and fish feed using ultrasound in the extraction process of the metallic nutrients and subsequent quantification for flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Using as extractor solution HCl 0,10 mol L⁻¹, the great conditions of extraction established were: mass of sample - 100 mg, samples granulometry - < 60 µm, sonification time - three cycles of 10 s and ultrasound potency - 102 Watts. The proposed method was applied in studies of digestibility of those nutritious in different feeds used in diets of alevine of Nile tilapia and their results proved compatible with that obtained from samples mineralized by acid digestion using microwave oven.

Keywords: Fish nutrition, metallic nutrients absorption, ultra-sonification, FAAS

1. Introdução

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

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

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

Na determinação do coeficiente de digestibilidade de alimentos para peixes, utilizam-se os chamados indicadores fecais. Esses indicadores se dividem em internos e externos. Os marcadores internos ocorrem naturalmente nos alimentos, enquanto que os marcadores externos são adicionados à dieta do animal.^{8,9,11,14} Os marcadores externos são os mais utilizados, sendo o óxido de cromo (III), marcador que apresenta melhor aceitação

por ser completamente indigestível, não absorvível e passar uniformemente através do aparelho digestório do animal.^{9,11} A determinação da concentração dos nutrientes e do Cr_2O_3 nas rações e fezes, permite estimar o coeficiente de biodisponibilidade aparente dos nutrientes metabolizados pelo animal, comparando-se as quantidades de nutrientes e de óxido presente inicialmente na ração com as quantidades presentes nas fezes do animal.^{11,14}

A determinação das concentrações dos nutrientes metálicos e do indicador fecal Cr_2O_3 tanto nas fezes como nas rações, apresenta dificuldades nos procedimentos de preparo das amostras. Normalmente a mineralização das amostras são feitas por aquecimento lento em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica. Os extratos resultantes são soluções ácidas contendo os nutrientes inorgânicos mais íons dicromato, espécie altamente tóxica. Este procedimento além de demorado, apresenta o inconveniente de gerar resíduos tóxicos que podem comprometer a saúde do analista e contaminar o meio ambiente.^{15,16}

Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a extração e a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos, para posterior determinação do coeficiente de biodisponibilidade aparente desses nutrientes nos estudos de nutrição animal, torna-se fundamental. Neste contexto, a extração do analito por ultra-sonificação, apresenta-se como técnica bastante robusta.^{17,20} Os efeitos químicos provocados pelos ultrasounds ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência (< 1 MHz). A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras.^{17,18} No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes ou completa mineralização no caso de compostos orgânicos.¹⁸⁻²⁰ Assim, a utilização da extração de nutrientes metálicos de amostras biológicas por ultra-sonificação permite a eliminação da mineralização ácida, que pela metodologia clássica, constitui o principal problema.^{15,16}

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de cálcio, magnésio, manganês e zinco em amostras de fezes e rações de peixes utilizando-se extração por ultra-som e quantificação por espectrometria de absorção

atômica em chama, para posterior estimativa do coeficiente de digestibilidade aparente desse nutriente em fontes alimentares utilizadas na piscicultura.

2. Experimental

2.1. Reagentes e soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic, ácido nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho. As soluções estoque dos analitos e dos concomitantes foram preparadas por diluições de padrões titrisol Merck. As demais soluções, incluindo as soluções extratoras foram preparadas a partir de reagentes 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 acessórios do espectrômetro de absorção atômica (sistema de aspiração e de nebulização) foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da utilização.

2.2. Coleta e preparo das amostras

As amostras de fezes de peixes foram coletadas após experimentos de digestibilidade envolvendo alevinos de Tilápia do Nilo que foram submetidos a uma dieta com diferentes fontes alimentares, (levedura, farelo de soja, farelo de arroz, milho). Esses experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Nutrição de Peixes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, (FMVZ), Departamento de Química e Bioquímica, (Instituto de Biociências), UNESP- Campus de Botucatu.

Depois de coletadas, as amostras de rações de peixes foram desidratadas em estufa de recirculação forçada de ar por 48 horas e submetidas à moagem criogênica. Para isso, uma massa de aproximadamente 1 g da amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com a barra magnética, o qual devidamente fechado, foi imerso em nitrogênio

líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante ($20 \text{ impactos s}^{-1}$) a amostra foi pulverizada. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu uma primeira etapa de dois minutos para o pré-congelamento, um minuto de pulverização, novamente um minuto de congelamento, e uma segunda etapa que compreendeu dois ciclos com dois estágios de pulverização e congelamento, perfazendo um tempo total de oito minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que $60 \mu\text{m}$.²¹

2.3. Extração dos nutrientes metálicos

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostra e 10 mL de solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico foram transferidas para frascos de teflon de 50 mL. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som para extração dos analitos metálicos. Utilizando-se este procedimento foram avaliados diferentes tempos de sonificação e potências de ultra-som no processo de extração dos analitos. Os extratos ácidos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação.

Uma parte das amostras foram também mineralizadas em forno de microondas. Para isso, massas de 100 mg de amostras moídas criogenicamente foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,5 mL de ácido nítrico 14 mol L^{-1} mais 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado encontra-se descrito na Tabela 1.²¹

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de rações e fezes de peixes em forno de microondas.

Etapas	Potência (W)	Tempo (Min.)
1	200	5
2	400	10
3	Ventilação e adição do H ₂ O ₂	5
4	500	5
5	700	3
6	Ventilação	5

2.4. Instrumentação

Para a secagem das amostras utilizou-se estufa de circulação forçada de ar TECNAL modelo TE – 394/1.

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

Para as determinações de cálcio, magnésio, manganês e zinco foram utilizados espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR). As condições operacionais utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000), e constam na Tabela 2. Soluções padrão aquoso misto de Ca, Mg, Mn e Zn em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹ e 10 g L⁻¹ de lantânio, utilizadas na construção das curvas analíticas, foram preparadas a partir da diluição de padrões Titrisol (Merck) contendo 1000 mg L⁻¹ dos analitos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as seguintes (mg L⁻¹): Ca – 0,50 a 4,00; Mg – 0,20 a 1,00; Mn – 0,25 a 1,50 e Zn – 0,20 a 1,00, (mediante ao COOKBOOCK). Para cada curva

analítica foi preparado um branco que continha todos os componentes das soluções padrão menos o analito de interesse.

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

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE, foi utilizado para agitação das suspensões padrão e suspensões das amostras de fezes e rações de peixes.

Tabela 2. Parâmetros utilizados no ajuste do espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA-6800 para as determinações de cálcio, magnésio, manganês e zinco.

Condições de Ajuste	Cálcio	Magnésio	Manganês	Zinco
Corrente da lâmpada	10 mA	10 mA	10 mA	10 mA
Estequiometria da chama	Oxidante	Oxidante	Oxidante	Oxidante
	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno
Fenda	0,5 nm	0,5 nm	0,50 nm	0,50 nm
Comprimento de onda	422,7 nm	285,2 nm	279,5 nm	213,0 nm
Fluxo de gás combustível	0,70 L min ⁻¹			

3. Resultados e Discussão

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

A eficiência do processo de extração por ultra-som de cálcio, cobre, ferro e zinco das amostras de rações e fezes foi avaliada variando-se o tempo de extração e a potência ultra-sônica. Na etapa de moagem da amostra procurou-se obter a menor granulometria possível, o que favorece a homogeneidade do analito no material sólido e evita possíveis erros associados à representatividade da amostra. Nessa etapa também foi evitada a manipulação excessiva das amostras, procurando-se assim evitar possíveis fontes de contaminação. A quantidade de material sólido pesado foi feita considerando-se a concentração do nutriente na formulação da ração, sendo que em relação ao manganês

(nutriente de menor teor das amostras), as massas pesadas foram cerca de 2 vezes maiores que as massas pesadas para o cálcio, magnésio e zinco, nutrientes que se apresentam com maiores teores nas amostras de rações. Conforme já discutido na literatura, as ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos da matriz devido à atuação destas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, destruindo-as e provocando a quebra da ligação do metal com essas moléculas.^{17,20} Dessa forma, inicialmente foram feitos experimentos de otimização do tempo de sonificação no processo de extração dos analitos das amostras. A Figura 1 mostra os resultados obtidos nesses experimentos.

O aumento do tempo de sonificação provoca o aumento da temperatura do meio extrator. Normalmente, observa-se que numa temperatura em torno de 50°C, a eficiência de extração é favorecida devido ao aumento do número de núcleos de cavitação acústica formada nas proximidades da superfície da fase sólida da suspensão (sistema sólido-líquido)²². No entanto, quando a temperatura do meio extrator se aproxima da temperatura de ebulição da fase líquida, ocorre um decréscimo na eficiência da sonificação devido à diminuição da tensão superficial do meio e aumento da pressão de vapor dentro das microbolhas, o que provoca uma diminuição nas ondas de choque.²³ Existe, dessa forma, um tempo considerado ótimo de sonificação no processo de extração de metais de uma amostra sólida. Nesse tempo, ocorre à cavitação acústica, ou o ciclo de formação, crescimento e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas. Após o colapso das bolhas de cavitação, ocorre a liberação de grande quantidade de energia na microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando assim extração do íon metálico e em alguns casos até a dissolução do material sólido.²⁴ Analisando-se os gráficos apresentados na Figura 1 observa-se que a partir de cinco ciclos de 40 segundos de agitação ultra-sônica (3,30 minutos), os sinais de absorbância medidos por FAAS, (espectrometria de absorção atômica por chama), permaneceram praticamente constantes e a temperatura medida no sistema sólido-líquido foi de 66°C. Dessa forma, este tempo foi considerado eficiente no processo de extração do analitos metálicos.

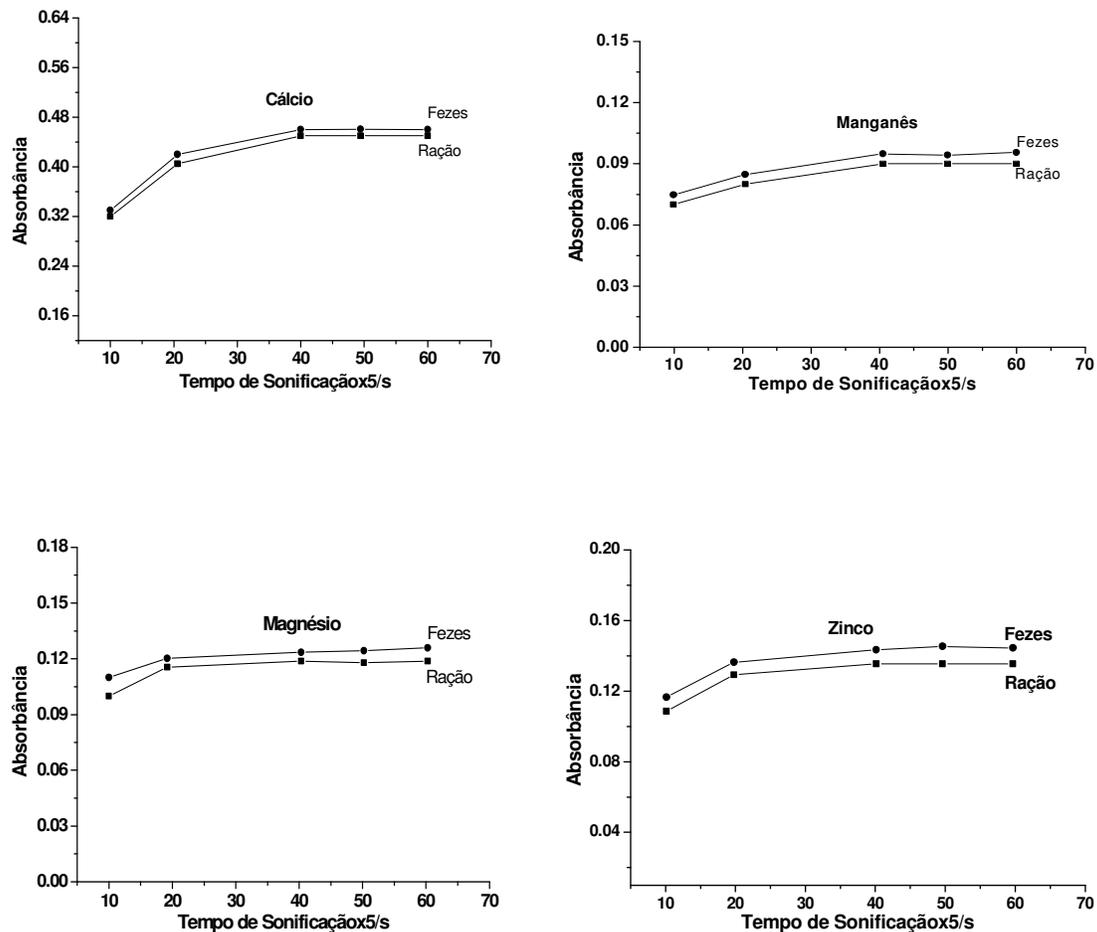


Figura 1. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de cálcio, magnésio, manganês e zinco de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – cinco ciclos de 10, 20, 40, 50 e 60 s; Potência utilizada – 136 W; Solução Extratora – Ácido clorídrico 0,10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

3.2. Otimização da potência do ultra-som no processo de extração dos analitos metálicos

A intensidade do ultra-som transmitida ao meio está diretamente relacionada à amplitude da vibração da ponta do sonotrodo. Geralmente, aumento na intensidade da potência favorecerá aumento nos efeitos químicos provocados pela sonificação. A influência da amplitude do ultra-som na escala 20-60% da potência total de trabalho (340 W) é mostrada nos gráficos apresentados na Figura 2.

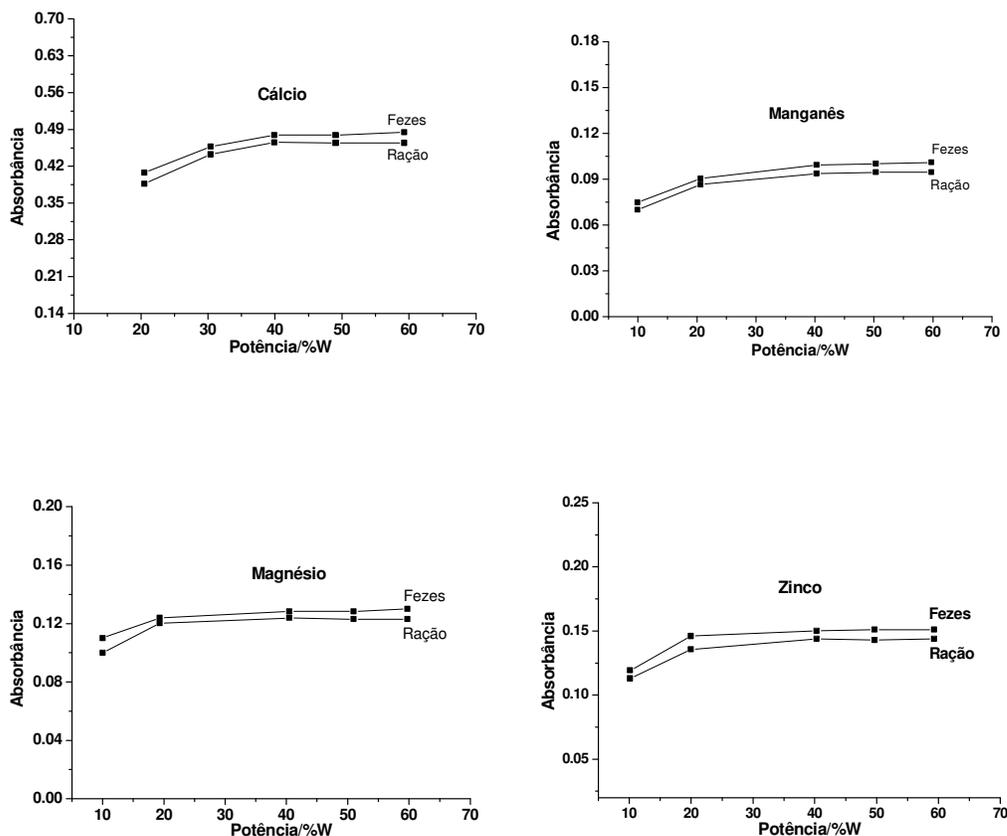


Figura 2. Influência da potência de sonificação no processo de extração de cálcio, magnésio, manganês e zinco de amostras de rações e fezes de peixes. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação - cinco ciclos de 40 s; Solução Extratora – Ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Quando se utiliza amplitude vibracional muito elevada, um grande número de bolhas de cavitação são geradas na solução, o que pode desfavorecer o crescimento e o colapso dessas bolhas, tendo como consequência uma diminuição da energia liberada na fase líquida.^{19,20,23} Para os quatro metais estudados, a eficiência da extração, conforme mostra a Figura 2, aumenta com amplitude crescente de 68 a 136 W, permanecendo constante para os valores mais elevados de amplitude. Os resultados obtidos indicaram, que a eficiência máxima do processo de extração foi conseguida na escala de amplitude 136-272 W de potência. Optou-se, então, por utilizar a amplitude de 136 W de potência em

todos os demais experimentos a serem desenvolvidos, pelo fato dessa potência provocar menor aumento de temperatura da solução extratora: 66 °C, contra 74 e 82 °C para as amplitudes de 204 W e 272 W de potência.

3.3. Figuras de mérito do método de extração por ultra-som

Após a otimização dos parâmetros físicos (tempo e potência de agitação ultra-sônica), a exatidão e a precisão do método de extração foram testadas utilizando-se ensaios de recuperação dos analitos metálicos de amostras de rações e fezes de peixes, cujos teores desses nutrientes foram determinados previamente utilizando-se a mineralização ácida por microondas. Os resultados dessas determinações são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Porcentagens dos analitos em amostras de rações de peixes, utilizando-se extração por ultra-som e mineralização em forno de micro-ondas (n = 5).

Metais	TEOR DOS METAIS (%)							
	SONIFICADO				MINERALIZADO			
	Ração ₁	Ração ₂	Ração ₃	Ração ₄	Ração ₁	Ração ₂	Ração ₃	Ração ₄
Cálcio	2,801±0,043	3,102±0,045	3,201±0,051	3,502±0,071	2,724±0,051	3,052±0,071	3,302±0,041	3,401±0,011
Magnésio	0,167±30*	0,171±33*	0,169±28*	0,174±0,012*	0,165±28*	0,172±29*	0,166±26*	0,171±30*
Manganês	0,013±3,10*	0,015±3,30*	0,016±3,80*	0,015±3,10*	0,012±3,30*	0,016±3,25*	0,015±2,20*	0,013±2,10*
Zinco	0,021±3,21*	0,023±2,80*	0,025±2,70*	0,022±2,50*	0,020±2,70*	0,022±2,80*	0,023±2,80*	0,021±2,60*

*x10⁻⁴

Tabela 4. Porcentagens dos analitos em amostras de fezes de peixes, utilizando-se extração por ultra-som e mineralização em forno de micro-ondas (n = 5).

METAIS	TEOR DOS METAIS (%)							
	SONIFICADO				MINERALIZADO			
	Fezes ₁	Fezes ₂	Fezes ₃	Fezes ₄	Fezes ₁	Fezes ₂	Fezes ₃	Fezes ₄
Cálcio	3,240±0,065	3,281±0,054	3,243±0,061	3,262±0,042	3,233±0,061	3,276±0,050	3,240±0,058	3,250±0,044
Magnésio	0,202±3,63*	0,205±3,74*	0,207±3,66*	0,204±3,52*	0,201±3,48*	0,203±3,16*	0,208±3,43*	0,205±3,41*
Manganês	0,023±0,45*	0,025±0,41*	0,028±0,49*	0,027±0,40*	0,022±0,46*	0,027±0,44*	0,026±0,41*	0,024±0,42*
Zinco	0,026±0,32*	0,028±0,35*	0,030±0,38*	0,027±0,30*	0,024±0,35*	0,026±0,31*	0,028±0,36*	0,026±0,33*

* x10⁻³

A exatidão e a precisão do método proposto também foi verificada empregando uma ração certificada (Corn Bran, RM 8433 – National Institute of Standards and Technology). Os resultados obtidos nessas determinações são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados (n=5) obtidos nas determinações de cálcio, Magnésio, Manganês e zinco em ração certificada utilizando-se o método .

Nutrientes metálicos	Valores determinados (mg Kg ⁻¹)	Valores certificados (mg Kg ⁻¹)
Cálcio	419,0±7,10	420,0±3,80
Magnésio	817,0±10,40	818,0±5,90
Manganês	2,50±0,04	2,55±0,29
Zinco	18,30±0,27	18,60±2,20

Analisando-se os resultados obtidos utilizando-se a extração por ultra-som (Tabelas 3 e 4), observa-se que estes são concordantes com os resultados obtidos utilizando-se a mineralização das amostras em forno de microondas. Os desvios-padrão relativos calculados foram menores que 3%, mostrando que o método apresenta boa exatidão e

repetibilidade entre as medidas. Em relação aos resultados determinados para a ração certificada (Tabela 5), observa-se que além dos valores apresentarem desvios-padrão relativos menores que 2%, o que caracteriza boa repetibilidade entre os resultados, estes também bem próximos dos valores certificados, comprovando assim a exatidão do método proposto.

3.4. Aplicação do método proposto

Com base em valores das porcentagens dos nutrientes metálicos determinados nas amostras de rações e fezes dos animais em estudo (Tabelas 3 e 4) e na determinação da porcentagem de óxido de cromo (valores médios determinados nas amostras de fezes e rações foram de 0,11 e 0,32%, respectivamente), marcador biológico utilizado em estudos de digestibilidade de nutriente na nutrição animal¹⁵, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (Da) desses nutrientes na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo, utilizando-se a equação 1.^{25,27}

$$Da = 100 - \left[100 \left[\frac{\%Cr_2O_{3r}}{\%Cr_2O_{3f}} \right] \times \left[\frac{\%N_f}{\%N_r} \right] \right] \quad \text{Equação 1}$$

onde:

Da = Digestibilidade aparente;

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

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

$\%N_r$ = Porcentagem de nutriente na ração;

$\%N_f$ = Porcentagem de nutriente nas fezes,

Os valores dos Da, calculados a partir dos resultados das determinações dos nutrientes metálicos por FAAS utilizando-se o método de extração por ultra-som e a mineralização das amostras em forno de microondas, estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficiente de digestibilidade dos nutrientes metálicos de alevinos de Tilápia do Nilo alimentados com rações preparadas a partir de diferentes fontes alimentares (1-Levedura; 2-Milho; 3-Farelo de soja; 4- Farelo de arroz).

Coeficiente de Digestibilidade (%)	Rações			
	Ração ₁	Ração ₂	Ração ₃	Ração ₄
Cálcio	60,67 ± 0,85*	64,04 ± 0,96*	65,55 ± 1,03*	68,33 ± 1,12*
	59,65 ± 0,77 [#]	63,50 ± 1,12 [#]	66,64 ± 1,15 [#]	67,50 ± 1,16 [#]
Magnésio	58,87 ± 0,66*	59,23 ± 0,62*	58,35 ± 0,63*	60,14 ± 0,78*
	58,58 ± 0,69 [#]	59,87 ± 0,68 [#]	57,39 ± 0,64 [#]	59,24 ± 0,67 [#]
Manganês	39,84 ± 0,52*	43,33 ± 0,54*	40,50 ± 0,51*	38,80 ± 0,42*
	37,78 ± 0,43 [#]	44,75 ± 0,53 [#]	41,07 ± 0,49 [#]	37,23 ± 0,44 [#]
Zinco	57,90 ± 0,63*	58,61 ± 0,64*	59,20 ± 0,71*	58,27 ± 0,69*
	59,20 ± 0,74 [#]	59,82 ± 0,77 [#]	58,61 ± 0,75 [#]	57,90 ± 0,74 [#]

*Cálculo baseado na % Nutriente determinado utilizando amostragem em suspensão

Cálculo baseado na % Nutriente determinado por GFAAS após mineralização das amostras em forno de microondas

A comparação dos valores dos Da dos nutrientes metálicos presentes nas quatro amostras de rações utilizadas na dieta de alevinos de tilápia do Nilo, mostrados na Tabela 6, indica que os valores determinados utilizando-se o método de extração por ultra-som estão de acordo com os valores obtidos utilizando-se a mineralização das amostras em forno de microondas, método utilizado normalmente nos estudos de digestibilidade em nutrição de peixes.^{25,30} Todos valores calculados apresentaram desvios padrão relativos menores que 2%, o que comprova uma repetibilidade entre as medidas e conseqüentemente boa precisão do método proposto. Além disso, o índice médio de comparação do método de

extração por ultra-som com o método por mineralização prévia das amostras, considerando a média geral calculada para cada um dos nutrientes para as quatro amostras de ração, foi menor que 1%, o que reforça a exatidão do método proposto e a sua aplicabilidade em estudos de digestibilidade de nutrientes metálicos na nutrição animal.

4. Conclusões

O método proposto para determinação de cálcio, magnésio, manganês e zinco de amostras de rações de peixes, utilizando-se extração por ultra-som, permitiu calcular os Da desses nutrientes nas rações utilizadas na dieta de juvenis de tilápia do Nilo. Os valores dos Da calculados nas condições propostas mostraram-se equivalentes aos valores calculados utilizando-se a mineralização ácida das amostras. No entanto, deve-se destacar que a metodologia proposta diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a velocidade analítica. Além disso, os resíduos tóxicos gerados nos extratos ácidos após a mineralização das amostras em forno de microondas, não ocorrem no processo de extração por ultra-som.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de apoio técnico (Processo 03/13362-6 e 06/60752-2).

REFERÊNCIAS

1. Mcdowell, L. R., 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, New York, pp. 1–18.
2. Smith, R. M., 1987. Trace elements in human and animal nutrition, Academic Press, New York, p. 480.

3. Hilton, J. W., 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79, p. 223-244.
4. Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151: 185-207.
5. Hanley, F., 1987. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity and digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Aquaculture*, 66, 163-179.
6. NRC (National Research Council), 1993. Nutrient requirements of fish. Washington, D.C.: National Academy Press.
7. Hefner, B., 1998. Nutrition of pond fishes. Cambridge University Press, New York, p. 388.
8. Sullivan, J. A., Reigh, R. C., 1995. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* ♀ x *Morone chrysops* ♂). *Aquaculture*, 138, p.313-322.
9. Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, 13, p. 265-272.
10. Kane, E. A., Jacobson, W. C., Damewood, P. M. Jr., 1959. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. *J. Dairy Sci.* 42, p. 1359-1366.
11. Ringo, E., 1993. The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water-reared Arctic char (*Salminus alpinus*). *Aquacult. Fish. Manag.* 24, p. 31-34.
12. De La Noue, J., Choubert, G., 1986. Digestibility in rainbow trout: Comparison of the direct and indirect methods of measurement. *Prog. Fish Cult.* 48, p. 190-195.
13. De Silva, S. S., Perera, K. M., 1984. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry: Effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. *Aquaculture*, 38, p. 293-306.
14. Shahat, T.M., 1993. Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. *Vet. Med. J.* 41, p. 83-91.

15. Silva, F. A., Padilha, C. C. F., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Padilha, P. M., 2006. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta*, 69, 1025-1030.
16. Silva, F. A., Neves, R. C. F., Quintero-Pinto, L. G., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Padilha, P. M., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere*, 68, 1542-1547.
17. Mason, T. J., Lorimer, J. P., 1989. Sonochemistry: Theory, applications and uses of ultrasound in Chemistry, New York: Ellis Horwood, p. 252.
18. Francony, A., Pétrier, C., 1996. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrason. Sonochem.*, 3, S77-S82.
19. Nascentes, C. C., Korn, M., Arruda, M. A. Z., 2001. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchem. J.*, 69, 37-43.
20. Ruiz-Jiménez, J., Luque-Garcia, J. L., Castro, M. D. L., 2003. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 480, 231-237.
21. Rosa, C. R., Moraes, M., Neto, J. A. G., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A., 2002. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 79, 517-523,
22. Filgueiras, A. V., Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 53, 433-441.
23. Elik, A., 2005. Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 66, 882-888.
24. Elik, A., 2007. Ultrasonic assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. *Talanta*, 71, 790-794.

25. Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Pezzato, A.C., Barros, M. M., Miranda, E. C., 2001. Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Anim. Sci.* 30, 1143-1149.
26. Pezzato, L. E., Miranda, E. C., Barros, M. M., Quintero-Pinto, L. G., Furuya, W. M., Pezzato, A. C., 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) . *Braz. J. Anim. Sci.* 31, 1595-1604.
27. Sá, M. V. C., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Padilha, P. M., 2004. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture*, 238, 385-401.
28. Sa, M. V. C., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Padilha, P. M., 2005. Apparent absorption of zinc from supplemental inorganic and organic sources to Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *J. World Aquacult. Soc.* 36, p. 375-383.
29. Sa, M. V. C., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Padilha, P. M., 2005. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquacult. Nutr.* 11, n. 4, p. 273-281.
30. Gonçalves, G. S., Pezzato, L. E., Padilha, P. M., Barros, M. M., 2007. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo. *Braz. J. Anim. Sci.* 36, p. 1473-1480.

CAPÍTULO - IV

IMPLICAÇÕES

Os métodos propostos podem ser utilizados em trabalho de rotina nos laboratórios de bromatologia, tendo a vantagem de diminuir os resíduos tóxicos; a eliminação do efeito de ácidos perigosos ao analista; além é claro diminuição no tempo de análise.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)