

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA EXTRAÇÃO ULTRA-SÔNICA DE MINERAIS
EM RAÇÕES DE SUÍNOS**

MAYRA ANTON DIB SALEH

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP

Junho – 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA EXTRAÇÃO ULTRA-SÔNICA DE MINERAIS
EM RAÇÕES DE SUÍNOS**

MAYRA ANTON DIB SALEH
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. DIRLEI ANTONIO BERTO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP

Junho – 2010

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

Saleh, Mayra Anton Dib.

Metodologia analítica para extração ultra-sônica de minerais em rações de suínos / Mayra Anton Dib Saleh. - Botucatu, 2010

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Co-orientador: Dirlei Antonio Berto

Assunto CAPES: 50403001

1. Animais domésticos – Alimentação e rações. 2. Ultra-sonografia.
3. Minerais na nutrição animal. 4. Leitão (Suíno).

Palavras chave: Extração por ultra-som; Leitões; Minerais; Rações.

Dedicatória

À minha mãe, Ramona Anton Saleh, minha avó, Delmira Rodriguez Anton e meu irmão, Leandro Anton Dib Saleh, por todo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos, principalmente durante minha vida acadêmica e, especialmente nos últimos meses do curso. Eu amo muito vocês.

Ao meu pai, João Dib Saleh Neto, *in memoriam*, pelo grande exemplo e por todos os dias que estive ao meu lado. Você vive no meu coração. Eu te amo muito.

Ao meu melhor amigo e amor da minha vida, Yossef Matissyuhi Abramowicz, pelo inestimável apoio, amor e dedicação. Essa vitória também é sua. Eu te amo muito.

Ao meu querido co-orientador e amigo, Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto pelos ensinamentos, valiosos conselhos e inestimável ajuda. Muito obrigada!

Ao meu querido orientador e amigo, Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha pela oportunidade, pelos ensinamentos e inestimável ajuda. Muito obrigada!

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo:2008/50986-1) e pelo suporte financeiro (Processo: 2007/59778-0).

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, Carlos Pazini Júnior e Seila Cristina Cassineli Vieira, pela atenção e auxílios prestados.

Aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, Lurdinha, Vânia, Fabinho, Elaine, Prof^a Sônia pela amizade e auxílios prestados.

À querida Lucélia Hauptli pela amizade e colaboração com o fornecimento das amostras para a realização deste estudo.

Aos companheiros de Pós-graduação Renato, Fábio, Tiago, Rafael, Emanuel, Sidney pela amizade e ajuda ao longo do Mestrado.

Aos amigos Marco Aurélio Factori e Valnei Matias pela amizade, apoio, ajuda e participação ativa na condução do experimento.

E a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1. Ensaios de digestibilidade na nutrição animal.....	2
1.1 Minerais na nutrição animal	4
1.1.1 Importância dos minerais	5
1.1.2 Biodisponibilidade mineral.....	7
2. Espectrometria atômica	9
2.1 Aspectos históricos	10
2.2 Aspectos teóricos.....	10
2.3 Espectrometria de absorção atômica por chama	13
2.4 Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	14
2.5 Aspectos quantitativos	17
3. Espectrometria de emissão atômica	19
4. Extração por ultra-som.....	20
4.1 Fundamentos do processo de extração por ultra-som.....	20
4.2 Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido.....	20
4.3 Ultra-som no preparo de amostras.....	22
4.4 Vantagens da utilização dos ultra-sons.....	22
5. Referências bibliográficas.....	25
CAPÍTULO 2.....	29
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA EXTRAÇÃO ULTRA-SÔNICA DE MINERAIS EM RAÇÕES DE SUÍNOS.....	30
Resumo	30
Abstract	31
Introdução.....	32
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	39
Conclusões.....	47
Agradecimentos.....	47
Referências	47

	Página
ANEXO 1.....	49
CAPÍTULO 3.....	51
IMPLICAÇÕES.....	52

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O desmame de leitões em condições comerciais no Brasil é feito, em média, aos 21 dias de idade. Esse desmame antecipado possibilita a diminuição do número de dias não-produtivos por fêmea e o aumento do número de leitões por matriz por ano (MORÉS et al., 1998).

Contudo, o período de creche acaba sendo crítico na produção de suínos, em virtude dos fatores estressantes que ocorrem simultaneamente por ocasião do desmame, relacionados à separação dos leitões da matriz, à mudança de ambiente, à mistura de leitegadas, à dificuldade de adaptação aos comedouros e bebedouros e à mudança brusca na alimentação (SANTOS et al., 2003).

Além disso, a imaturidade do sistema digestório e as drásticas alterações na fisiologia intestinal dos leitões com duas a três semanas de idade (Boudry et al., 2004) prejudicam os processos digestório e absorptivo, comprometem o desempenho e predispõem os leitões a problemas de saúde (Pluske et al., 1997), o que torna o período pós-desmame um grande desafio para os nutricionistas.

1. Ensaios de Digestibilidade na Nutrição Animal

Os animais possuem habilidades distintas para aproveitar os nutrientes e a energia contida nos alimentos, em decorrência de suas características morfológicas e fisiológicas. Dessa forma, a avaliação do valor nutricional dos alimentos fica correlacionada à sua composição de nutrientes e à capacidade do animal em ingerí-los e absorvê-los (HIGUERA, 1987).

Nesse aspecto, o grau de aproveitamento do alimento pelo animal está atrelado à espécie, condições ambientais, quantidade e qualidade do nutriente, proporção relativa entre os nutrientes e ao tipo de processamento que o alimento foi submetido (ANDRIGUETTO, 1982).

A avaliação do valor nutricional dos alimentos geralmente é feita por meio de análise bromatológica ou por ensaios através da 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, através da determinação do total deste nutriente ingerido e excretado nas fezes. Porém, em virtude das secreções endógenas como as secreções biliares, enzimáticas e descamações do epitélio, somente uma parte desse nutriente encontrado nas fezes é proveniente do alimento testado. Dessa forma, a determinação da digestibilidade de

um nutriente sem considerar as perdas endógenas é chamada de digestibilidade aparente (YOUNG et al.,1991).

Na determinação da digestibilidade aparente de um nutriente podemos utilizar as gaiolas metabólicas (método direto ou coleta total de fezes) ou usar marcadores (método indireto ou coleta parcial de fezes) que se dividem em internos, quando ocorrem naturalmente nos alimentos e em externos, quando são adicionados à dieta. Este último permite uma maior facilidade na condução dos ensaios, 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 (LEWIS & SOUTHERN, 2000).

Dentre os marcadores externos mais utilizados, destaca-se o óxido de cromo (Cr_2O_3) por apresentar melhor aceitação e 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 e ser atóxico (KABIR et al.,1998).

No entanto, o uso de marcadores externos apresenta uma problemática em detrimento das grandes quantidades administradas para a obtenção de resultados analíticos adequados e divergências quanto a resultados de pesquisas, principalmente devido às variabilidades analíticas encontradas (Uden et al., 1980; Kozloski et al.,1998), uma vez que os coeficientes de digestibilidade são determinados pela relação entre a porcentagem de marcador encontrada na dieta e nas fezes, qualquer equívoco na determinação do marcador, especialmente na dieta, acarreta uma grande discrepância no cálculo final do coeficiente da digestibilidade (DeLa NOUE & CHOUBERT, 1986; SULLIVAN & REIGH, 1995; SAHA & GILBREATH, 1991; SHAHAT, 1993).

A quantificação do óxido de cromo nas rações e fezes apresenta dificuldades nos procedimentos de preparo das amostras. Normalmente, a mineralização das amostras é feita por aquecimento lento em blocos digestores, utilizando mistura nítrica-perclórica (Belchier & Forster, 1970). Este procedimento, além de demorado, apresenta o inconveniente de gerar nos extratos ácidos resultantes, íons dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), espécie altamente tóxica.

Considerando o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos e do óxido de cromo(III) utilizado como marcador externo na determinação da digestibilidade aparente nos estudos de nutrição animal, particularmente nutrição de leitões, torna-se fundamental.

Neste contexto, a extração dos analitos por ultra-sonificação apresenta-se como técnica bastante promissora, principalmente porque permite a eliminação da etapa de mineralização nítrica/perclórica das amostras em blocos digestores evitando assim, a produção de crômio(VI) no processo, o que pela metodologia clássica utilizada, constitui-se no principal problema.

Além disso, a metodologia proposta permitirá a diminuição do tempo de preparo das amostras e, por conseguinte, o tempo das determinações analíticas. Essa facilidade analítica será de grande contribuição para os estudos de digestibilidade na nutrição animal, principalmente com leitões, os quais são submetidos a uma fase de criação crítica determinada pelo estresse psicológico, ambiental e nutricional. Dessa forma, os resultados serão obtidos com mais rapidez e estes poderão auxiliar no planejamento nutricional dessa fase, contribuindo assim, para a eficiência alimentar e para o desempenho produtivo do suíno da creche até o abate.

1.1 Minerais na Nutrição Animal

Minerais são nutrientes inorgânicos e podem ser classificados em macro-minerais quando requeridos em concentrações que excedem cerca de 0,1% da dieta (Mavromichalis, 2006) em oposição aos microminerais, também chamados de elementos-traço, necessários em pequenas quantidades.

Os macrominerais incluem o cálcio, magnésio, fósforo, sódio, potássio, cloro e enxofre. Destes, somente o cálcio, fósforo, sódio e cloro são tipicamente limitantes na maioria das dietas, enquanto que as necessidades de potássio, magnésio e enxofre são usualmente supridas pelas contribuições dos próprios ingredientes (NRC, 1998).

Os microminerais incluem ferro, iodo, flúor, zinco, selênio, cobre, manganês, crômio, molibdênio, cobalto e níquel. Em contrapartida, os elementos ultra-traço são aqueles cuja essencialidade foi testada através de experimentações animais por várias gerações e os sintomas de deficiência só foram encontrados sob situações extremas, são eles: alumínio, arsênio, bário, bismuto, boro, bromo, cádmio, césio, germânio, mercúrio, lítio, chumbo, rubídio, antimônio, silício, samário, estanho, estrôncio, tálio, titânio e tungstênio (BELITZ et al., 2009).

1.1.1 Importância dos Minerais

As funções biológicas do organismo estão associadas principalmente com a atuação dos minerais. Essas funções são resumidamente agrupadas como estrutural, catalisadora e eletrolítica.

Nesse contexto estão incluídos o transporte de solutos e controle do pH celular (sódio), ativação enzimática (potássio e magnésio) e interações com biomoléculas (magnésio e cálcio). Funções como transmissão de impulsos nervosos exigem a participação de sódio, potássio, cálcio e cloro. Eles atuam no controle da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-base do organismo. A pressão osmótica dos fluídos intra e extracelulares são rigidamente controlados através de mecanismos regulatórios energia-dependentes que determinam a taxa de absorção de íons de sódio e de água através das membranas epiteliais, intestinos, tegumento e rins (WILKINS & WILKINS, 2003; BELITZ et al., 2009).

Como componente e ativador de muitas enzimas, o magnésio está envolvido especialmente em funções associadas com a conversão de energia (compostos ricos em fosfato), estabilização das membranas plasmática, intracelulares e dos ácidos nucleicos. É um elemento suporte da vida, sendo necessário também no metabolismo do tecido ósseo, osmorregulação e transmissão neuromuscular (WILKINS & WILKINS, 2003; BELITZ et al., 2009).

Devido à abundância no corpo, o cálcio está envolvido na estrutura do sistema muscular e controle de processos essenciais, como a contração muscular (sistema locomotor, batimentos cardíacos), coagulação sanguínea, atividade celular (movimento de carga em processos neuronais e do músculo cardíaco) e crescimento celular. Muitas das ações do cálcio são decorrentes de sua capacidade para se ligar fortemente às biomoléculas, a exemplo da calmodulina, essencial para a ação de enzimas citoplasmáticas e das lectinas, grupo de proteínas envolvidas no reconhecimento biológico, capazes de modular as atividades dos fatores de transcrição e biomineralização (deposição mineral) (WILKINS & WILKINS, 2003; BELITZ et al., 2009).

Em contrapartida, o fósforo sob a forma de fosfato desempenha papel importante no metabolismo e, como tal, é um nutriente essencial. As formas orgânicas de fósforo nos alimentos são clivados pelas fosfatases intestinais e, conseqüentemente, a absorção ocorre principalmente na forma de fosfato inorgânico. Polifosfatos, utilizados

como aditivos alimentares são absorvidos apenas após hidrólise prévia em ortofosfato (MAVROMICHALIS, 2006; BELITZ et al., 2009).

Em tecidos, o fosfato desempenha funções como componente estrutural (membranas celulares, organelas intracelulares, lipídeos, carboidratos e aminoácidos), fator no metabolismo intermediário (fonte de energia para processos metabólicos e contração muscular), componente do material genético (ácidos nucleicos), além de atuar em vários processos metabólicos que envolvem a regulação de fluídos corporais (MAVROMICHALIS, 2006; BELITZ et al., 2009).

O ferro é essencial no processo respiratório celular através da atividade de oxidação-redução e transferência de elétrons. No corpo é encontrado principalmente ligado a proteínas, tais como compostos heme (hemoglobina e mioglobina), enzimas heme (microssomal e mitocondrial, catalase, peroxidase) e compostos não-heme (transferrina, ferritina, e flavoproteínas: ferredoxinas e desidrogenases). No processamento de alimentos, o ferro é um elemento indesejável por catalisar a oxidação de óleos e gorduras, aumentar a turbidez do vinho e, como componente da água potável, favorecer o crescimento de bactérias ferro-dependentes (HOUSE et al., 1999).

O cobre é um componente de várias enzimas que estão envolvidas em reações de oxidação-redução e está presente nas células ligado a proteínas. As metaloenzimas dependentes de cobre estão envolvidas na produção de energia celular (citocromo c oxidase), proteção celular de danos causados pelos radicais livres (superóxido dismutase), neurotransmissores cerebrais (dopamina hidroxilase), síntese de colágeno (lisil-oxidase) e produção de melanina. O cobre também se encontra ligado à proteína ceruloplasmina, presente nas células e plasma e é ainda menos desejável do que o ferro durante o processamento e armazenamento dos alimentos, uma vez que catalisa várias reações indesejáveis e que alteram o sabor (BELITZ et al., 2009).

A função do zinco é baseada em seu papel como componente integrante de uma série de metaloenzimas e como catalisador para a regulação da atividade de enzimas específicas, além de regular processos metabólicos de lipídeos, carboidratos, proteínas, ter papel estrutural nas nucleoproteínas e estar envolvido no metabolismo das prostaglandinas. Embora o papel do zinco nos processos metabólicos seja evidente, pouco se sabe da relação entre sua função bioquímica e os sinais patológicos. Algumas das características clínicas da deficiência de zinco podem resultar em distúrbios do metabolismo protéico e de ácido nucleicos (HOUSE et al., 1999).

O manganês é amplamente distribuído nos tecidos animais. A maior concentração é encontrada nos ossos, no entanto, quantidades significativas também estão presentes no fígado, músculo, rins, tecidos gonadais e pele. Em tecidos, o manganês está mais concentrado nas mitocôndrias do que no citoplasma ou outras organelas celulares. Atua como co-fator na ativação de um grande número de enzimas que formam complexos ou que fazem parte integrante de metaloenzimas no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (KEEN et al., 1984).

A essencialidade do selênio na dieta de animais e suas estreitas relações metabólicas têm sido bem conhecida pelo seu papel na proteção das membranas contra a destruição oxidativa, como parte integrante da enzima glutathione peroxidase (Rotruck et al., 1973). Os efeitos protetores do selênio contra a toxicidade de metais potencialmente tóxicos como o cádmio e o mercúrio são amplamente reconhecidos (Shamberger, 1984). Altos níveis exercem efeitos tóxicos em animais (intensa atividade carcinogênica), provavelmente através da concorrência com os compostos de enxofre. No entanto, o mecanismo bioquímico exato envolvido na sua toxicidade ainda não foi estabelecido (UNDERWOOD, 1977).

1.1.2 Biodisponibilidade Mineral

Biodisponibilidade tem sido definida como a proporção da quantidade total de minerais do alimento utilizado para as funções normais do organismo (Fairweather-Tait, 1992). Outros consideram que a biodisponibilidade reflete a eficiência com que os nutrientes consumidos são absorvidos pelo trato gastrointestinal e estão, portanto, disponíveis para serem armazenados ou utilizados (FORBES & ERDMAN, 1983; BENDER, 1989).

Similarmente, Ammerman et al. (1995) definiu biodisponibilidade como o grau com que um nutriente ingerido a partir de uma fonte particular é absorvido de forma que possa ser utilizado pelo metabolismo animal. Nesse contexto, biodisponibilidade refere-se à proporção da quantidade total de um elemento mineral presente em um ingrediente que é potencialmente absorvível sob uma forma metabolicamente ativa (WELCH & HOUSE, 1982).

O termo “potencialmente absorvível” é usado devido à quantidade real absorvida que pode ser afetada por numerosos fatores, como composição da dieta (qualidade da proteína: fonte protéica, balanço aminoacídico; quantidade de proteína; quantidade de elementos traço; forma físico-química dos elementos traço; interações entre os

nutrientes: elemento-elemento, elemento-compostos orgânicos; presença de promotores: carne, ascorbato, citrato, vitamina D, alguns aminoácidos, alguns açúcares; presença de inibidores: fitato, oxalato, polifenóis, fibra, goitrogênios, excesso de ascorbato e folato; deficiências de micronutrientes: ascorbato, riboflavina, vitamina E); preparação ou processamento da dieta (alimentos crus; alguns métodos de cozimento; fermentação; moagem; embebição); fatores relacionados ao animal (idade; sexo; categoria animal; estado fisiológico, grau de atividade física; estado nutricional, condição corporal; doenças ou parasitismo) (HOUSE, 1999; BELITZ et al., 2009).

O suprimento de minerais para o organismo é dependente não somente do seu fornecimento por meio da dieta, mas primariamente de sua disponibilidade, a qual está essencialmente relacionada à composição da dieta.

A importância dos minerais como nutrientes não está atrelada apenas às suas funções nutricionais e fisiológicas, mas também à sua contribuição no sabor e participação na ativação ou inibição de reações catalisadas por enzimas, além de sua influência na textura dos alimentos. Nesse sentido, uma série de componentes da dieta, como proteínas, peptídeos, aminoácidos, polissacarídeos, açúcares, ligninas e ácidos orgânicos podem aumentar ou inibir sua absorção (BELITZ et al., 2009).

Para determinar a eficiência com que o organismo utiliza os minerais da dieta, é preciso conhecer a disponibilidade do elemento contido no ingrediente da ração. Geralmente, a análise química não indica o nível de eficácia biológica de um nutriente. Muitos problemas de biodisponibilidade mineral estão sendo cada vez mais reconhecidos em nutrição humana e animal (FORBES & ERDMAN, 1983).

Muitos fatores podem influenciar a biodisponibilidade de minerais. Estes incluem o nível de ingestão do nutriente, sua forma química, a digestibilidade dos ingredientes, a dimensão das partículas, as interações com outros nutrientes, a presença de quelantes e inibidores, estado fisiológico e sanitário do animal, a química da água, o tipo de processamento submetido à dieta e a espécie animal a ser utilizada.

A disponibilidade biológica de um elemento em uma dieta pode variar, dependendo da forma molecular em que o elemento está presente, do seu estado de valência e dos ligantes presentes quando o elemento é ingerido a partir de diferentes formulações. Mecanismos que envolvem a formação de substâncias insolúveis e não absorvíveis no intestino podem impossibilitar ou facilitar a absorção na mucosa, transporte e metabolismo do mineral no organismo. Além desses componentes da

dieta, vários fatores ambientais também podem influenciar a biodisponibilidade dos minerais (LALL, 2002)

Como geralmente avaliada, a biodisponibilidade não é uma propriedade fundamental de um alimento por si, mas representa a resposta de um objeto teste (humano, animal, células de uma cultura) à dieta ou ingrediente (Fairweather-Tait, 1992; Southgate, 1989). Ou seja, como indicado pela avaliação da absorção biológica, é aparente que a biodisponibilidade dos minerais em uma dieta específica não é estática. Os fatores que melhoram a biodisponibilidade mineral geralmente são moléculas que formam compostos solúveis com os minerais ou complexos mineral-realçadores que podem ser absorvidos intactos, podem sofrer clivagem liberando o mineral em uma forma solúvel ou transferindo-o para a mucosa ou receptores plasmáticos (CLYDESDALE et al., 1991).

Em contraste, outros fatores que inibem a biodisponibilidade mineral podem formar compostos com minerais traço, os quais podem se tornar insolúveis ou formar compostos mineral-inibidores que não serão absorvidos intactos ou que podem impedir a transferência do mineral ao seu sítio receptor (CLYDESDALE et al., 1991).

2. Espectrometria de Absorção Atômica

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 (lâmpada de catodo oco: HCL - do inglês, *Hallow Cathode Lamp*) 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 e semi-metais) em uma ampla variedade de amostras, tais como: materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos, sedimentos e plantas), alimentos, materiais geológicos e cerâmicos (SKOOG et al., 2002; KRUG et al., 2004).

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 o método mais utilizado para análises elementares na ordem de mg L^{-1} , enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ETAAS - do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry* ou GFAAS – do inglês, *Graphite Furnace Absorption*

Atomic Spectrometry) é mais utilizada para determinações em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) (SKOOG et al., 2002; KRUG et al., 2004).

2.1 Aspectos Históricos

Relativo ao levantamento bibliográfico descrito por Krug et al. (2004):

Os primeiros estudos referentes à 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. Pouco tempo depois, Kirchhoff e Bunsen estabeleceram o princípio da absorção, após estudar sistematicamente várias linhas do espectro dos metais alcalinos e alcalino-terrosos. Em 1860, Kirchhoff estabeleceu a relação entre emissão e absorção e enunciou a seguinte lei: "Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles são capazes de emitir". Este é considerado o princípio fundamental da AAS, ou seja, de maneira geral os átomos no estado fundamental só poderiam absorver radiações de comprimento de onda produzidas por eles próprios. Entretanto, não houve interesse pelos químicos da época em tentar desenvolver tal idéia como técnica analítica. 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 um 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 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 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. 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 nitroso-acetileno. 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" proposta por Slavin e colaboradores. Em 1979, 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.

2.2 Aspectos Teóricos (RICHARD & JACK, 1993; SKOOG et al., 2002)

O átomo é constituído de um núcleo rodeado por elétrons. Todos os elementos possuem um número de elétrons que estão associados com o núcleo atômico dentro da estrutura orbital que é única de cada elemento.

Os elétrons ocupam posições nos orbitais em uma ordem e em caminhos definidos. A energia mais baixa, que corresponde à configuração eletrônica estável do

átomo, conhecida como “estado fundamental”, é a configuração normal para os átomos.

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

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

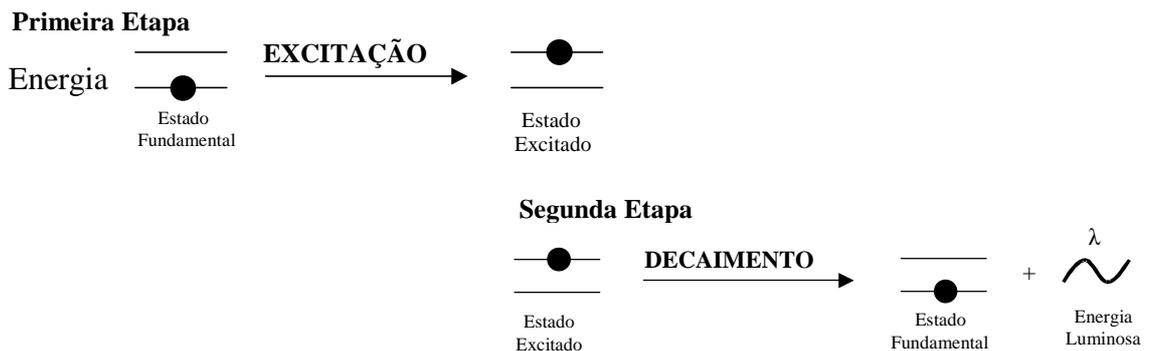


Figura 1. Processos de excitação e decaimento dos elétrons.

O comprimento de onda da energia radiante emitida está diretamente relacionado com a transição eletrônica ocorrida. Como todos os elementos possuem uma estrutura eletrônica única e o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade individual de cada elemento, é possível determinar qualitativamente o elemento por este comprimento de onda ser característico.

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

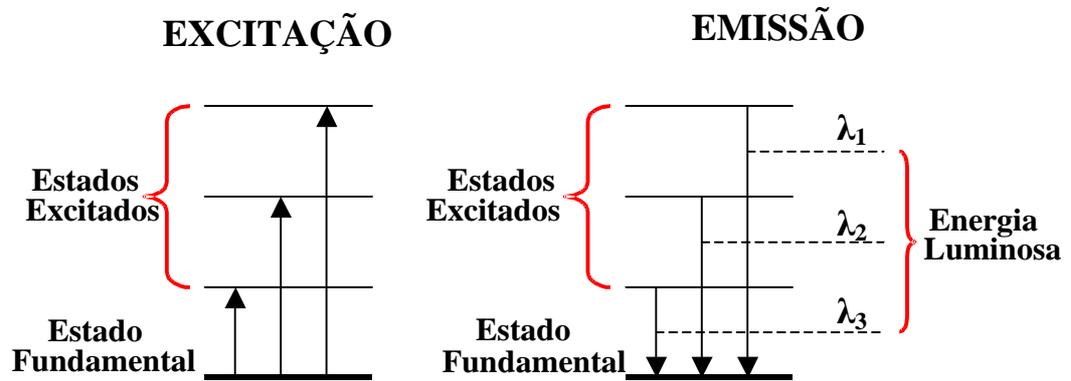


Figura 2. Transições de energia.

O processo de excitação e decaimento para o estado fundamental está envolvido em todas as 3 linhas de espectroscopia atômica (emissão, absorção e fluorescência atômica). Tanto a energia absorvida no processo de excitação quanto a energia emitida no processo de decaimento é quantificada e utilizada para propósitos analíticos.

Quando a radiação de um único e exato comprimento de onda incidir em átomos no estado fundamental, os átomos poderão absorver esta luz e atingir um estado excitado, sendo este, o princípio fundamental da Absorção Atômica. 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.

A nuvem atômica necessária para as determinações 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 no estado fundamental e serão capazes de absorver a radiação proveniente da fonte. O uso de fontes especiais de radiação em comprimentos de onda cuidadosamente selecionados permite determinações individuais de elementos em presença de outros.

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.

2.3 Espectrometria de Absorção Atômica por Chama

O atomizador é uma parte importantíssima do FAAS, pois neste dispositivo serão gerados os átomos gasosos no estado fundamental que irão absorver a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação dada pela lâmpada de cátodo oco e, conseqüentemente, a concentração do elemento de interesse será determinada (SKOOG et al., 2002).

No nebulizador, operando pela ação de fluxo de gás comprimido, a solução da amostra é aspirada do seu recipiente e nebulizada na forma de um aerossol (gotículas dispersas em gás) em uma câmara de nebulização. Essa névoa formada é direcionada ao queimador por arraste dado pela mistura dos gases combustível e oxidante. No ambiente da chama ocorre a evaporação do solvente das gotículas, etapa denominada dessolvatação, produzindo em seguida, um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas ou fundidas do soluto). Sob elevadas temperaturas da chama, ocorre a volatilização destas partículas e logo em seguida, a atomização, isto é, a conversão da espécie volatilizada em átomos livres (KRUG et al., 2004).

Então, os átomos da nuvem atômica que se encontram no estado fundamental estão aptos para absorver a energia dada pela fonte de radiação em um comprimento de onda específico e assim, passar para o estado excitado.

A Figura 3 apresenta um esquema de um espectrômetro de absorção atômica com chama e seus principais componentes (KRUG et al., 2004).

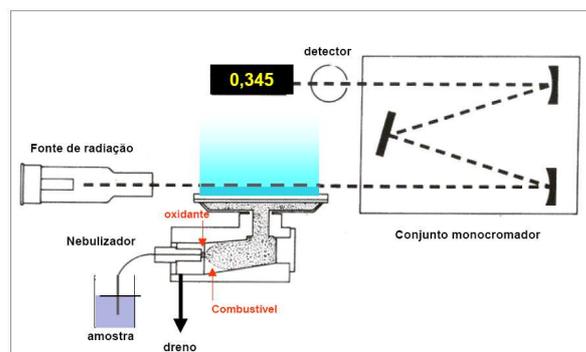


Figura 3. Espectrômetro de absorção atômica - módulo chama.

2.4 Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

O conceito de atomização eletrotérmica foi introduzido por L'vov em 1959, tornando-se conhecida mundialmente a partir de 1961. Neste trabalho, a amostra era depositada na superfície de um eletrodo móvel de grafite e em seguida, introduzida em um tubo de grafite revestido com uma folha de tântalo, o qual era aquecido eletricamente. Este sistema possibilitava a atomização da amostra numa única etapa, fornecendo uma nuvem atômica mais concentrada e, dessa maneira, uma melhor sensibilidade era alcançada, com menor consumo da amostra (VOLYNSKY & SEDYKH, 1989; VOLYNSKY, 1995).

Segundo Richard & Jack (1993), a técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), apesar de ser geralmente monoelementar, é adequada para a determinação de ampla variedade de elementos-traço. Esse método apresenta alta sensibilidade, uma vez que a alíquota da amostra depositada no interior do tubo de grafite (no forno) é atomizada em um curto período de tempo, sendo o tempo de residência média dos átomos no caminho óptico de aproximadamente um segundo (Figura 4).

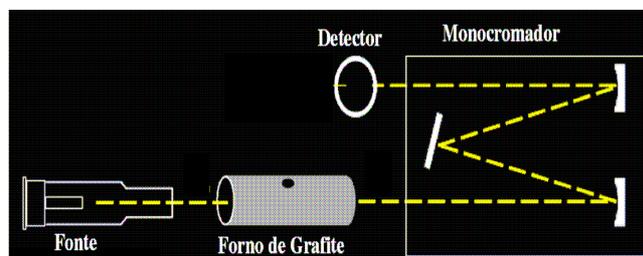


Figura 4. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.

Além disso, o método 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 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Richard & Jack, 1993), possibilita a amostragem sólida, o que elimina a decomposição total prévia da amostra e reduz a quantidade de resíduos gerados para o ambiente.

A amostragem sólida na forma de suspensão apresenta vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como a redução no tempo de preparo da amostra, redução das perdas do analito por manipulação excessiva ou incompleta liberação do analito da matriz sólida, diminuição da contaminação da amostra devido

ao pequeno volume de reagente requerido e à curta exposição ao ambiente laboratorial e prevenção da utilização de reagentes perigosos e corrosivos (CALPRIETO et al., 2002).

Ao se trabalhar com amostragem sólida na forma de suspensão, a homogeneidade da suspensão, o tamanho das partículas, a utilização de modificadores químicos e de corretor de fundo são os principais fatores para uma boa exatidão e precisão nas medidas analíticas (CHEM et al., 1998).

Na atomização eletrotérmica em forno de grafite, o solvente, ácido ou a mistura azeotrópica da amostra é evaporada em temperaturas da ordem de 200-250 °C, etapa denominada de secagem (Figura 5) (RICHARD & JACK, 1993).

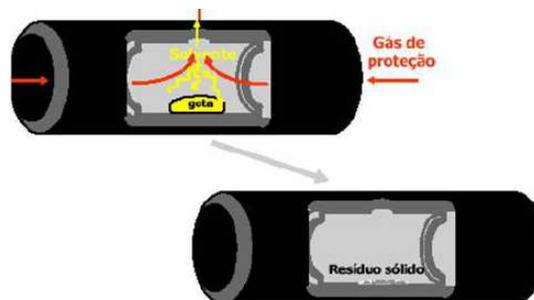


Figura 5. Etapa de secagem.

Após a etapa de secagem, a matéria orgânica e outros concomitantes da amostra são incinerados em temperaturas da ordem de 450 - 1600 °C, separando assim o analito (metal, semi-metal) dos outros componentes da matriz sólida. Esta etapa do processo é denominada de pirólise (Figura 6).

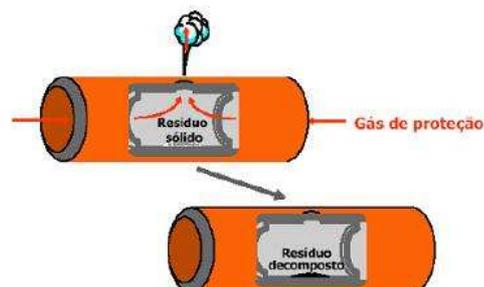


Figura 6. Etapa de pirólise.

Após a etapa de pirólise, a corrente elétrica responsável pelo aquecimento do tubo de grafite aumenta rapidamente até uma amperagem que eleve a temperatura na ordem 2000 °C a 3000 °C, provocando a formação de uma nuvem atômica dos analitos metálicos. Esta etapa é denominada de atomização e ocorre em um período de milissegundos até segundos (Figura 7). Nesta etapa, a medida de absorção da

radiação é feita na região imediatamente acima da superfície do tubo (RICHARD & JACK, 1993).

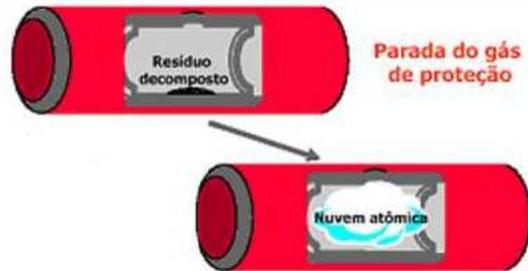


Figura 7. Etapa de atomização.

Após a medida da absorvância do analito é feita então, uma etapa de limpeza, para remoção de traços do analito metálico evitando assim, o chamado “efeito de memória” (Figura 8).

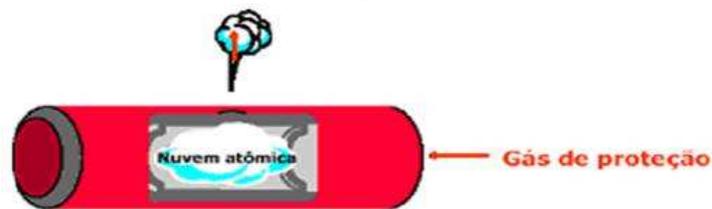


Figura 8. Etapa de limpeza.

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 9 (RICHARD & JACK, 1993).

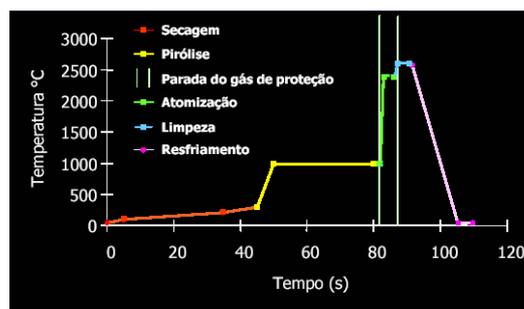


Figura 9. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

2.5 Aspectos Quantitativos (RICHARD & JACK, 1993; SKOOG et al., 2002)

Uma fonte, geralmente uma lâmpada de catodo oco, emite radiação em um comprimento de onda determinado e com intensidade inicial I_0 . Esta radiação é direcionada para a chama que contém os átomos no estado fundamental.

A intensidade inicial de radiação (I_0) sofre decréscimo devido à absorção de parte desta energia pelos átomos que passaram do estado fundamental para o estado excitado. A radiação que chega até o sistema detector com diminuição de intensidade é denominada I , e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de I e I_0 . A diferença de intensidade entre I e I_0 corresponde à concentração do analito dentro da amostra, como será detalhado a seguir.

Relação entre I_0 , I e concentração:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$A = abc$$

Equação 5

Sendo que:

"A" é a absorvância;

"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 simplificada que a concentração é diretamente proporcional à concentração dos átomos que absorvem dentro dos parâmetros pré-estabelecidos de análise.

A proporção direta entre concentração e absorvância é claramente evidenciada quando soluções com concentrações conhecidas são utilizadas na construção das curvas analíticas (Figura 10).

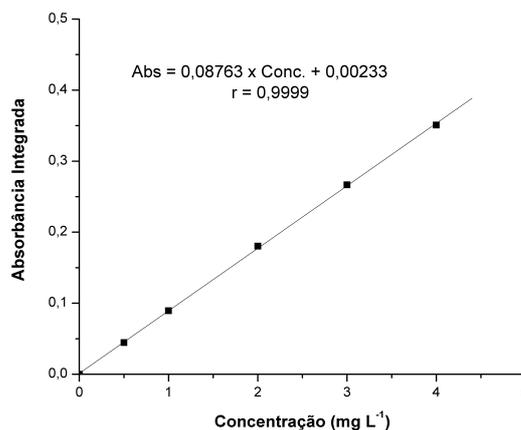


Figura 10. Curva analítica de um elemento qualquer.

O comportamento linear entre concentração e absorvância em determinados intervalos de concentração é a base para a construção de curvas analíticas, o que torna possível determinar a concentração dos analitos de interesse nas amostras por interpolação dos valores obtidos.

3. Espectrometria de Emissão Atômica

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 11.

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 de uma coleção dos comprimentos de onda emitidos, comumente denominados “linhas de emissão” devido à natureza discreta dos comprimentos de onda emitidos, conforme ilustra a Figura 12, e ainda pode ser utilizado como uma característica única do elemento para sua identificação qualitativa. A emissão atômica utilizando arco elétrico vem sendo amplamente em análises qualitativas (SKOOG et al., 2002).

A espectrometria de emissão atômica também pode ser utilizada 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 (SKOOG et al., 2002).

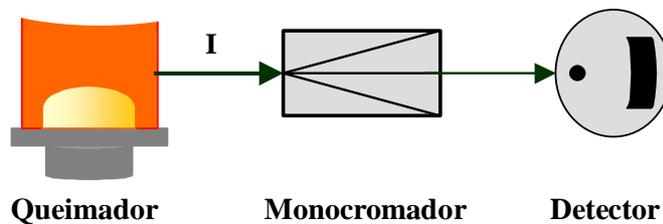


Figura 11. Emissão atômica.

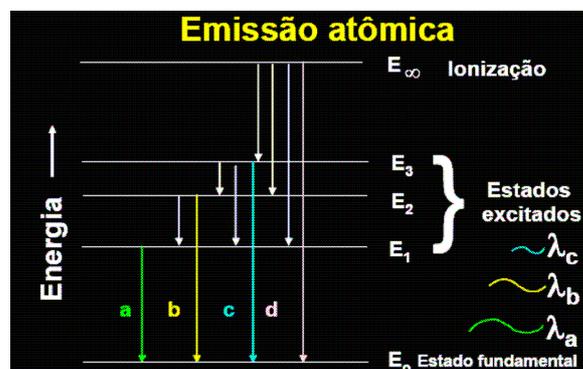


Figura 12. Diagrama de emissão de energias.

4. Extração por Ultra-som

O uso de ultra-sons em áreas científicas tem aumentado nos últimos anos, incluindo as áreas médica e industrial, onde teve maior impacto. Este aumento é contínuo e novos usos estão freqüentemente sendo desenvolvidos. Nesse sentido, a química analítica não foi excluída de utilizar a energia dos ultra-sons, explorando-a em dois aspectos: por favorecer a otimização de diferentes estágios no processo analítico, principalmente relacionado à etapas preliminares envolvendo amostras sólidas e por melhorar a detecção ou até mesmo por utilizar o ultra-som como meio para detecção.

O termo extração é definido como o ato de separar ou, de outro modo, obter elementos constituintes de uma substância através de tratamento com um solvente ou por meio de destilação, evaporação, submetendo-a à pressão ou força centrífuga ou à outro processo químico ou mecânico (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2004).

4.1 Fundamentos do processo de extração por ultra-som

Os ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com freqüência maior que 20 kHz. Os ultra-sons respondem por uma região do espectro acústico, o qual é subdividido em três regiões principais – a faixa dos infra-sons ($v < 20$ Hz); a faixa dos sons (20 Hz $< v < 20$ kHz), perceptíveis aos humanos e a faixa dos ultra-sons ($v > 20$ kHz). Para os ultra-sons pode ser assumida, ainda, uma subdivisão de faixas: a dos ultra-sons de baixa freqüência (20 kHz $< v < 1$ MHz) e de alta freqüência ($v > 1$ MHz) (KORN et al., 2003; CAPELO et al., 2005).

As ondas ultra-sônicas de baixas freqüências são aquelas que podem apresentar alta potência, enquanto que as ondas ultra-sônicas de alta freqüência têm baixa potência, podendo ser aplicadas principalmente para fins de diagnóstico, tanto na medicina como na engenharia (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2007). Na extração de nutrientes metálicos são utilizadas ondas ultra-sônicas de baixa freqüência, portanto de alta potência, as quais levam a alterações químicas e físicas no meio líquido onde são aplicadas.

4.2 Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido

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

pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação, as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso (KORN et al., 2003; PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2007).

Os resultados obtidos em diferentes ensaios realizados com sistemas heterogêneos (líquido-sólido) sob sonificação indicaram que os efeitos dessas ondas acústicas não deveriam ser considerados como um mero e eficaz sistema de agitação, mas sim relacionados aos jatos de alta velocidade produzidos pela cavitação acústica nas proximidades das superfícies dos metais já que essas ondas mecânicas, ao interagirem com a superfície de sólidos levam a alterações significativas na morfologia das superfícies dos sólidos. Caso os ultra-sons sejam aplicados em líquidos contendo material particulado em suspensão, as cavidades deixam de ser simétricas de forma que, quando de seu colapso, os microjatos são direcionados para o sólido (KORN et al., 2003; SANTOS & CAPELO, 2007).

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 (KORN et al., 2003).

A influência dos ultra-sons no aumento da reatividade química é decorrente das evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas ondas em sistemas químicos. A principal causa desses efeitos é a cavitação acústica que pode ser considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonificação. Com o colapso 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 (KORN et al., 2003; SANTOS & CAPELO, 2007).

Os ultra-sons têm sido empregados em diferentes etapas para fins analíticos: extração sólido-líquido; extração líquido-líquido; separação granulométrica; desgaseificação; degradação de matéria orgânica; co-precipitação e geração de reagentes (KORN et al., 2003; PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2007).

4.3 Ultra-sons no preparo de amostras

A sonificação é uma maneira efetiva de liberar vários analitos de diferentes tipos de amostras, em razão de combinar vários efeitos, como temperaturas altas extremamente eficazes, que resultam em um aumento na solubilidade e difusibilidade; altas pressões, que favorecem a penetração e transporte na interface entre uma solução aquosa ou orgânica sujeita à energia ultra-sônica e uma fase orgânica ou aquosa ou mesmo de uma matriz sólida e a energia oxidativa de radicais gerados durante a sonólise do solvente (hidroxil e peróxido de hidrogênio) (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2004; CAPELO et al., 2005).

As duas ferramentas que podem ser utilizadas para a aplicação de ondas ultra-sônicas no preparo das amostras são o banho ultra-sônico e a sonda ultra-sônica. Embora o banho ultra-sônico seja freqüentemente utilizado, ele apresenta duas significativas desvantagens que promovem a diminuição da repetibilidade e reprodutibilidade experimentais: a falta de uniformidade na distribuição da energia ultra-sônica e a diminuição da potência com o decorrer do tempo (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2004).

Adicionalmente, o fato do transdutor ultra-sônico estar na maioria dos casos situado no centro do banho, torna a eficiência da cavitação variável no interior do mesmo. Em contrapartida, as sondas ultra-sônicas têm vantagem sobre os banhos ultra-sônicos no que se refere à concentração de sua energia em uma zona específica da amostra, propiciando uma cavitação mais eficiente no meio líquido, além de contribuir para a redução do tamanho da partícula em suspensão, conduzindo a uma melhor eficiência de extração (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2004; CAPELO et al., 2005).

4.4 Vantagens da utilização dos ultra-sons

A redução do tamanho de partícula é um dos benefícios mais notórios da sonificação, 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 é provocado pelo colapso de microbolhas nos interstícios do sólido ou pelos violentos choques entre partículas que chegam até a promover a fusão de fragmentos metálicos. Por outro lado, bolhas formadas nas proximidades das partículas tornam-se assimétricas

e, ao implodirem, originam microjatos de líquido que são direcionados para a superfície do sólido, resultando na erosão e, conseqüentemente, na renovação da superfície, aumentando a reatividade entre solvente e amostra (KORN et al., 2003).

A principal vantagem dos ultra-sons em extrações reside na diminuição do tempo de processamento, modesto consumo de amostra e reagentes, menor necessidade de utilização de soluções diluídas de ácidos e rapidez da análise, respeitando os princípios da Química Verde. 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 (KORN et al., 2003; LUQUE-GARCÍA et al., 2003).

Dentre as várias outras aplicações dos ultra-sons para as determinações de metais, destaca-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 (KORN et al., 2003).

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 patógenos devido à ruptura das células microbianas, ocasionando o escoamento do líquido citoplasmático, além de promover a degradação térmica de diferentes classes de poluentes (KORN et al., 2003).

Outra característica notável da extração por ultra-som é a baixa temperatura mantida durante o processo, que evita o dano térmico aos extratos e perda de compostos voláteis. Nesse sentido, a extração se torna muito útil no isolamento de compostos naturais de plantas com propriedades farmacológicas (WU et al., 2001).

Além disso, o efeito combinado de soluções ácidas diluídas com a sonificação no rompimento de paredes celulares confere aos ultra-sons excelente aplicabilidade, já que leveduras podem ser submetidas à sonificação para obtenção de uma suspensão de células a ser utilizada em condições ótimas de fermentação.

A aplicação de formas não usuais de energia, como as oriundas de ultra-sons de baixa freqüência 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 (KORN et al., 2003; SANTOS & CAPELO, 2007).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para extração de minerais por ultra-som utilizando amostras de rações e fezes de leitões. Assim, o trabalho contido no Capítulo 2, intitulado: Metodologia Analítica para Extração Ultra-Sônica de Minerais em Rações de Suínos, apresenta-se de acordo com as normas da revista ***Journal of Food Composition and Analysis***.

5. Referências Bibliográficas

1. AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. New York: Academic Press, 1995. p.441.
2. ANDRIGUETTO, J.M. et al. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1982. v.1, 395p.
3. BELCHIER, R.; FORSTER, H. **The destruction of organic matter**. New York: Pergamon Press Ltda., 1970. p.19-26.
4. BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. Heidelberg: Springer, 2009. 1070p.
5. BENDER, A.E. Nutritional significance of bioavailability. In: SOUTHGATE, D.A.T.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R. (Eds), **Nutrient availability: chemical and biological aspects**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1989. p.3-9. (Special publication, 72).
6. BOUDRY, G. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglets intestine. **Journal of Nutrition**, v.134, n.9, p.2256-2262, 2004.
7. CAL-PRIETO, M.J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J.M.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, v.56, p.1-51, 2002.
8. CAPELO, J.L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.12, p.225-232, 2005.
9. CHEM, W.K.; YEN, C.C.; WEI, B.L.; HU, C.C.; YU, J.J.; CHUNG, C.; KUO, S.C. Direct determination of selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry using automated ultrasonic slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, p.131-138, 1998.
10. CLYDESDALE, F.M. et al. The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids and minerals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.30, p.599-638, 1991.
11. DeLa NOUE, J.; CHOUBERT, G. Digestibility in rainbow trout: comparison of the direct and indirect methods of measurement. **The Progressive Fish-Culturist**, v.48, p.190-195, 1986.

12. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v.43, n.3, p.213-217, 1992.
13. FORBES, R.M.; ERDMAN JR, J.W. Bioavailability of trace mineral elements. **Annual Review of Nutrition**, v.3, p.213 –221, 1983.
14. HIGUERA, M. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. In: MONTEROS, J.A.E.; LABARTA, M. **Nutrición em Acuicultura II**. Madrid: Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, 1987. p.291-318.
15. HOUSE, W.A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Research**, v.60, p.115-141, 1999.
16. 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**, v.167, p.259-272, 1998.
17. KEEN, C.L.; LONERDAL, B.; HURLEY, L.S. In: FRIEDEN, E. (Ed.). **Manganese. Biochemistry of the essential ultratrace elements**. New York: Plenum Press, 1984. p.89-132.
18. KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som. **Revista Analytica**, n.03, p.34-39, 2003.
19. KOZLOSKI, G.V.; FLORES, E.M.M.; MARTINS, A.F. Use of chromium oxide in digestibility studies: variation of the results as a function of the measurement method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.47, p.613-623, 1998.
20. KRUG, F.J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P.V Espectrometria de absorção atômica. Parte 1: fundamentos e atomização com chama. São Paulo: CENA-USP, 2004. p.1-39, Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/krug/AAS%20geral%20parte%201%20revisada.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2010.
21. LALL, S.P. Mineral nutrition. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.), **Fish nutrition**, 3.ed., San Diego: Academic Press, 2002. p.260-308.
22. LEWIS, A.J.; SOUTHERN, L.L. **Swine Nutrition**. Florida: CRC Press LLC, 2000. 1009p.
23. LUQUE-GARCÍA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.1, p.41-47, 2003.
24. MAVROMICHALIS, I. **Applied nutrition for young pigs**. Wallingford (UK): CABI, 2006. 297p.

25. MORÉS, N. et al. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J. et al. (Eds.). **Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.135-161.
26. National Research Council – NRC. **Nutrient requirements of swine**. 10.ed. Washington: National Academic Press, 1998, 189p.
27. PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v.51, n.1, p.215-236, 1997.
28. PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n.9, p.644-653, 2004.
29. PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p.249-257, 2007.
30. RICHARD, D.B.; JACK, D.K. **Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry**. Norwalk: The Perkin Elmer Corporation, 1993.
31. ROTRUCK, J.T. et al. Selenium - biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, n.4073, p.588-590, 1973.
32. SAHA, D.C.; GILBREATH, R.L. Analytical recovery of chromium from diet and feces determined by colorimetric and atomic absorption spectrophotometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.55, p.433-436, 1991.
33. SANTOS, W.G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche (desempenho, pH do trato gastrintestinal e peso dos órgãos). **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.696-702, 2003.
34. SANTOS, H.M.; CAPELO, J.L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, v.73, p.795-802, 2007.
35. SHAHAT, T.M. Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. **Veterinary Medical Journal Giza**, v.41, p.83-91, 1993.
36. SHAMBERGER, R.J. In: FRIEDEN, E. (Ed.). **Selenium. Biochemistry of the essential ultratrace elements**. New York: Plenum Press, 1984. p.201-237.
37. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
38. SOUTHGATE, D.A.T. Conceptual issues concerning the assessment of nutrient bioavailability. In: SOUTHGATE, D.A.T.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R. (Eds), **Nutrient availability: chemical and biological aspects**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1989. p.10-12. (Special publication, 72).

39. SULLIVAN, J. A.; REIGH, R.C. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Aquaculture**, v.138, p.313-322, 1995.
40. UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.31, p.625-632, 1980.
41. UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4.ed. New York: Academic Press, 1977. 545p.
42. VOLYNSKY, A.B.; SEDYKH, E.M. Principal processes in graphite atomizers modified by high-melting carbides. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.4, p.71-76, 1989.
43. VOLYNSKY, A.B. Terminology for the modification of graphite tubes with high-melting carbides used in electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.50, p.1417-1419, 1995.
44. WELCH, R.M.; HOUSE, W.A. Availability to rats of zinc from soybean seeds as affected by maturity of seed, source of dietary protein and soluble phytate. **Journal of Nutrition**, v.112, p.879-885, 1982.
45. WILKINS, R.G. & WILKINS, P.C. **The role of calcium and comparable cations in animal behaviour**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. 217p.
46. WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.347-352, 2001.
47. 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. **Swine Nutrition**. Stoneham: Butterworth-Heineman, 1991. p.623-630.

CAPÍTULO 2

Metodologia analítica para extração ultra-sônica de minerais em rações de suínos

Resumo

No presente trabalho é proposto um método para determinação de cálcio, magnésio, sódio e potássio em amostras de rações de leitões utilizando ultra-som no processo de extração dos analitos e posterior quantificação, respectivamente, por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrometria de emissão atômica (AES). As condições de extração otimizadas foram: massa de amostra de 100 mg; granulometria da amostra $< 60 \mu\text{m}$; solução extratora HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; tempo de sonificação de cinco ciclos de 10 s e potência de sonificação de 102 W. O método proposto foi aplicado em estudos de digestibilidade desses nutrientes em amostras de rações utilizadas na criação comercial de leitões e os resultados obtidos mostraram-se concordantes com os resultados provenientes da mineralização ácida.

Palavras-chave: extração por ultra-som, leitões, minerais, rações pré-iniciais

Analytical methodology for ultrasound extraction of minerals in swine samples

Abstract

The aim of the present work brings a developed and an optimized method for determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in piglets feed and feces by using ultrasound in the extraction process of nutrients and subsequent quantification by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and atomic emission spectrometry (AES). The optimum established conditions of extraction were: mass of sample: 100 mg, sample particle size: < 60 μm , extractor solution: HCl 0.10 mol L⁻¹, sonication time: five cycles of 10 s and ultrasound power: 102 W. The proposed method was applied in studies of digestibility of those nutrients in different feed used in piglets diets and their results proved to be compatible with those obtained from mineralized samples by acid digestion.

Keywords: minerals, piglets, pre-starter diets, ultrasound extraction

1. Introdução

Em várias partes do mundo a produção de suínos tornou-se altamente especializada, industrializada e concentrada geograficamente. Essa expansão e especialização permitiram que a produtividade aumentasse, objetivando a maximização da performance dos animais (Murphy & Lange, 2004).

Nesse contexto, a estratégia de utilizar ingredientes mais digestíveis nas formulações foi adotada para minimizar a suplementação de minerais e maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes pelo animal, além de minimizar os efeitos negativos do desmame, período crítico na criação de suínos, assegurando o desempenho desejável dos leitões nessa fase e, contribuindo inclusive, para a redução do impacto ambiental.

Dessa forma, ensaios de digestibilidade são realizados utilizando os chamados marcadores externos, dos quais o que apresenta melhor aceitação é o óxido de cromo (Cr_2O_3) (Kane et al., 1979). A determinação da porcentagem do marcador e dos minerais nas fezes permite estimar o coeficiente de digestibilidade aparente (*CDa*) dos nutrientes metabolizados por comparação com a porcentagem desse óxido misturado inicialmente na ração (Hanley, 1987).

No entanto, o uso de marcadores externos apresenta uma problemática em detrimento das grandes quantidades administradas para a obtenção de resultados analíticos adequados e divergências quanto a resultados de pesquisas, principalmente devido às variabilidades analíticas encontradas (Kozloski et al., 1998).

Além disso, a quantificação do Cr_2O_3 nas rações e fezes apresenta dificuldades nos procedimentos de preparo das amostras. Normalmente, a mineralização das amostras é feita por aquecimento lento em blocos digestores, utilizando mistura nítrica-perclórica. Este procedimento, além de demorado, apresenta o inconveniente de gerar nos extratos ácidos resultantes, íons dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), espécie altamente tóxica.

Considerando o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos nos estudos de nutrição animal torna-se fundamental.

Neste contexto, a extração dos analitos por ultra-som apresenta-se como técnica bastante promissora, principalmente porque permite a eliminação da etapa de mineralização ácida das amostras evitando assim, a produção de cromo(VI) no processo, o que pela metodologia clássica utilizada, constitui-se no principal problema.

Os ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 20 kHz. As ondas ultra-sônicas de baixa frequência são aquelas que apresentam alta potência sendo utilizadas para extração de minerais. A eficiência das ondas ultra-sônicas na extração de metais fundamenta-se na cavitação acústica que consiste no processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos às ondas ultra-sônicas de baixa frequência. 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 (Mason & Lorimer, 1988; Nascentes et al, 2001; Elik, 2007).

Além disso, a metodologia proposta permitirá a diminuição do tempo de preparo das amostras e, por conseguinte, o tempo das determinações analíticas. Essa facilidade analítica será de grande contribuição para os estudos de digestibilidade na nutrição animal, inclusive com leitões.

Dessa forma, os resultados serão obtidos com mais rapidez e estes poderão auxiliar no desenvolvimento de alternativas nutricionais para melhorar o desempenho dos leitões desde a creche até a terminação.

Em razão do exposto, objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método para determinação de cálcio, magnésio, sódio e potássio em rações e fezes de leitões por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrometria de emissão atômica (AES), respectivamente, utilizando extração assistida por ultra-som, de forma a eliminar a etapa de mineralização ácida das amostras.

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, ácidos nítrico e clorídrico (Merck) de pureza espectroscópica (Johnson & Matthey, Royston, Hertfordshire, UK) foram utilizados em todo o trabalho.

As soluções estoque e dos concomitantes foram preparadas por diluições de padrão titrisol Merck. As demais soluções, incluindo as soluções extratoras foram preparadas a partir de reagentes Merck. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno.

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

2.2 Coleta e preparo das amostras

As amostras de rações e fezes de leitões foram coletadas após experimento realizado nas instalações de creche da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu. Foram utilizados 90 leitões híbridos comerciais, desmamados com médias de 21 dias de idade e peso de $5,42 \pm 0,55$ kg.

Os leitões foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados em três tratamentos e dez repetições, com três animais por unidade experimental. Foi realizada análise de variância dos resultados de digestibilidade encontrados, com nível de significância estabelecido em 5 % ($P < 0,05$). As análises foram executadas utilizando o programa SAEG – Sistema de Análise Estatística e Genética, versão 9.0 (UFV, 2000).

As rações foram formuladas conforme recomendações de Rostagno et al. (2005) e foram fornecidas aos animais à vontade. As composições centesimais das rações são apresentadas no Anexo 1.

Para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente foi realizada, na segunda semana experimental, coleta parcial de fezes utilizando como marcador externo das rações pré-iniciais o óxido de cromo a 0,1% (Shahat, 1993). As rações marcadas com óxido de cromo foram fornecidas aos leitões a partir do sétimo dia do período experimental e as coletas de fezes realizadas entre o 11º e o 14º dia. Após as coletas, realizadas pela manhã e à tarde (8:00 h e 16:00 h), as fezes devidamente identificadas foram acondicionadas em potes plásticos de 1 kg e congeladas.

Ao final do experimento, as amostras de fezes de cada baia foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 45 °C por 48 horas e moídas em moinho de facas tipo Willye, em peneira de Mesh 30 (0,595 mm). Posteriormente, uma massa de aproximadamente 1,0 g das amostras foi transferida para um almofariz e utilizando um pistilo, a amostra foi macerada em presença de nitrogênio líquido. Este procedimento permitiu a obtenção de partículas com granulometria menor que 60 µm (Neves et al., 2009).

2.3 Extração dos analitos

2.3.1 Mineralização das amostras

Após a etapa de secagem e moagem, parte das amostras foi mineralizada utilizando blocos digestores. Para isso, 100 mg foram transferidos para balões de borosilicato tipo Kjeldahl de 100 mL, adicionando em seguida alíquotas na proporção de 3,0 mL de solução concentrada de ácido nítrico 65% m/m e, posteriormente, alíquota de 1 mL de ácido perclórico 70% m/m para que os íons Cr (III) fossem oxidados a Cr (VI).

Os extratos ácidos obtidos após total mineralização das amostras foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume acertado com água ultrapura. Em cada mineralização foi preparado um branco que continha todos os reagentes utilizados na mineralização ácida das amostras, exceto a amostra em questão.

2.3.2 Extração por ultra-som das amostras

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostras e 20 mL de solução 0,10 mol L⁻¹ de ácido clorídrico foram transferidos para frascos de teflon de 30 mL. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som e, nessa etapa foram avaliados diferentes tempos de sonificação e potências do ultra-som no processo de extração dos analitos. Os extratos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação a 3500 rpm por 5 min.

2.4 Instrumentação

Para secagem e digestão das amostras foram utilizados, respectivamente, estufa de circulação forçada de ar Tecnal modelo TE-394/1 e bloco digestor Marconi modelo MA-447/6/100, com capacidade para 6 balões de borosilicato tipo Kjeldahl de 100 mL.

Para determinação dos íons metálicos foi utilizado espectrômetro de absorção/emissão atômica Shimadzu modelo AA-6800 (com módulo de chama/forno de grafite), 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.

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE modelo USC-DC, com sonda de titânio de 3 mm foi utilizado para extração dos analitos nas amostras biológicas.

Ultracentrífuga, modelo Bio-Spin-R (Bioagency, São Paulo) foi utilizada para separação da fração sólida remanescente dos extratos submetidos à extração ultra-sônica.

2.5 Procedimentos Analíticos

2.5.1. Curvas analíticas

As soluções padrão aquosas de cálcio, magnésio, sódio e potássio foram preparadas a partir da diluição de padrões Titrisol (Merck) contendo 1000 mg L^{-1} dos analitos, sendo os padrões de cálcio e magnésio preparados em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e 10 g L^{-1} de Lantânio e os de crômio, sódio e potássio preparados em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para a construção das respectivas curvas analíticas, conforme mostram as Figuras 1 a 5.

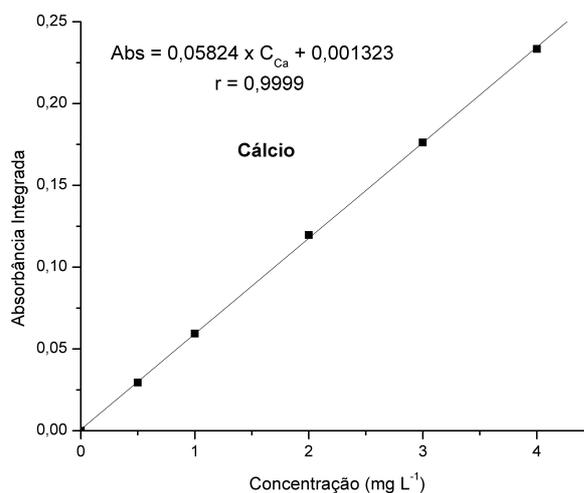


Figura 1. Curva analítica do cálcio.

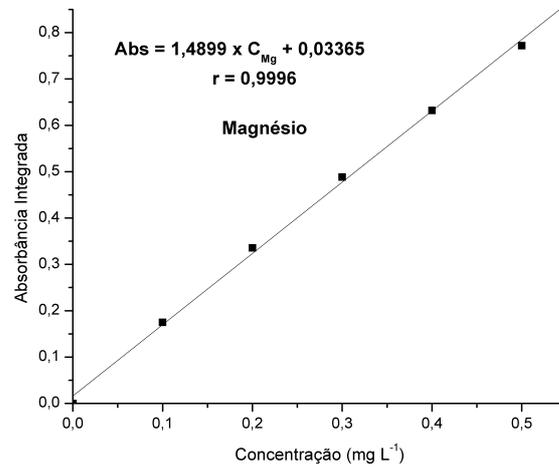


Figura 2. Curva analítica do magnésio.

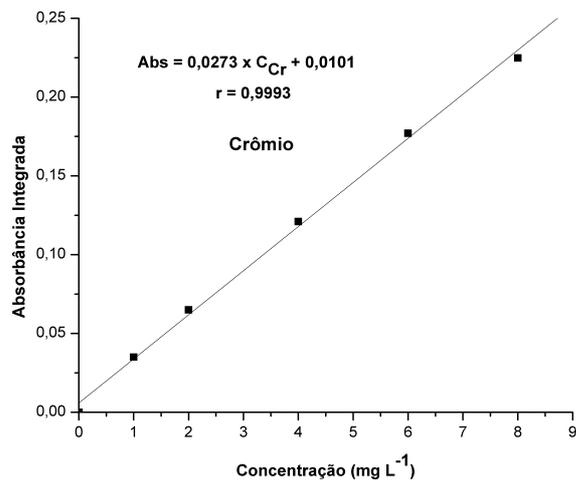


Figura 3. Curva analítica do crômio.

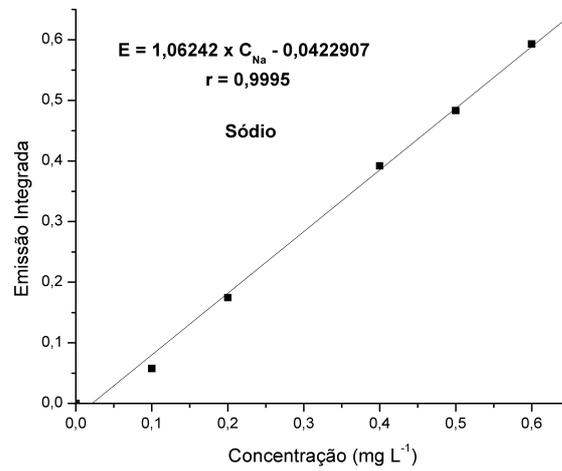


Figura 4. Curva analítica do sódio.

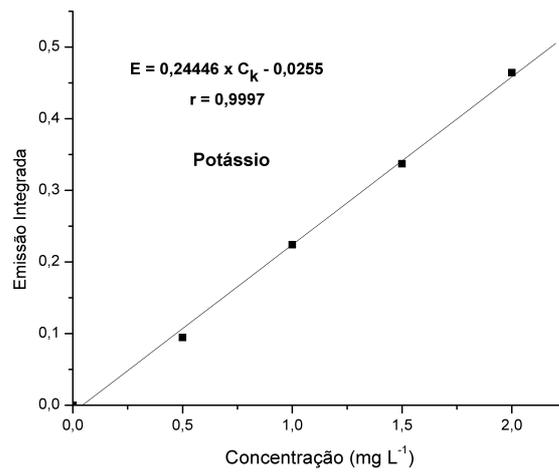


Figura 5. Curva analítica do potássio.

2.5.2 Parâmetros analíticos

Para proceder às determinações de cromo, cálcio, magnésio, sódio e potássio foram utilizados os seguintes parâmetros ópticos de ajuste do espectrômetro apresentados na Tabela 1, sendo os sinais de absorvância e emissão medidos integrados em área de pico, de acordo com Welz (1992).

Tabela 1. Parâmetros ópticos de ajuste

Condições de Ajuste	Crômio	Cálcio	Magnésio	Sódio	Potássio
Comprimento de onda	357,9 nm	422,7 nm	285,2 nm	589,0 nm	766,5 nm
Resolução espectral	0,5 nm	0,5 nm	0,5 nm	0,2 nm	0,5 nm
Corrente da lâmpada	10 mA e 400 mA	10 mA	10 mA	-	-
Estequiometria da chama	Levemente Redutora	Oxidante	Oxidante	Oxidante	Oxidante
	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno	Ar-Acetileno
Fluxo de gás	1,8 L min ⁻¹	2,0 L min ⁻¹	1,8 L min ⁻¹	1,8 L min ⁻¹	2,0 L min ⁻¹

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização do tempo de extração ultra-sônica dos analitos

A eficácia do processo de extração por ultra-som de cálcio, magnésio, sódio e potássio das amostras de rações e fezes foi avaliada a partir da variação do tempo de extração e da potência ultra-sônica.

Na etapa de moagem da amostra procurou-se obter a menor granulometria possível, o que favoreceu a homogeneidade do analito no material sólido e evitou 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.

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 (Elik, 2005; Elik, 2007; Filgueiras et al., 2000). Dessa forma, inicialmente foram feitos experimentos de otimização do tempo de sonificação para o processo de extração dos analitos das amostras. As Figuras 6 e 7 mostram os resultados obtidos nesses experimentos.

O aumento do tempo de sonificação provoca o aumento da temperatura do meio extrator. Normalmente, observa-se que em uma temperatura em torno de 50 °C, a eficácia 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) (Filgueiras et al., 2000).

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 (Elik, 2005). Existe, dessa forma, um tempo considerado ótimo de sonificação no processo de extração de metais de uma amostra sólida.

Nesse tempo ocorre a cavitação acústica ou o ciclo de formação, crescimento, e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas. Após o colapso das bolhas de cavitação, ocorre a liberação de grande quantidade de energia na microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando assim extração do íon metálico e em alguns casos até a dissolução do material sólido (Elik, 2007).

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 6 e 7, observa-se que a partir de 5 ciclos de 10 segundos de agitação ultra-sônica (50 segundos), os sinais de absorvância medidos por FAAS e AES, permaneceram praticamente constantes e a temperatura medida no sistema sólido-líquido foi de 54 °C. Dessa forma, este tempo foi considerado eficiente no processo de extração do analitos.

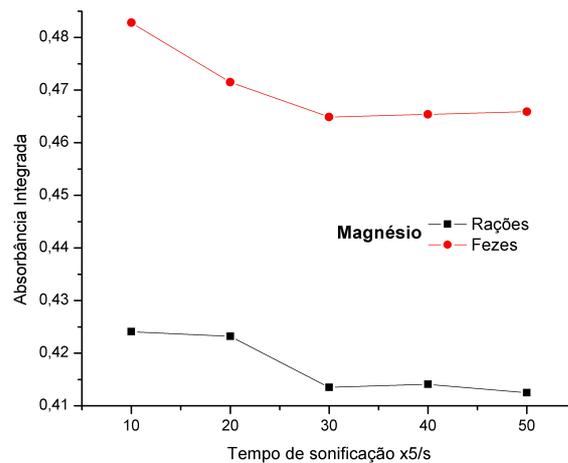
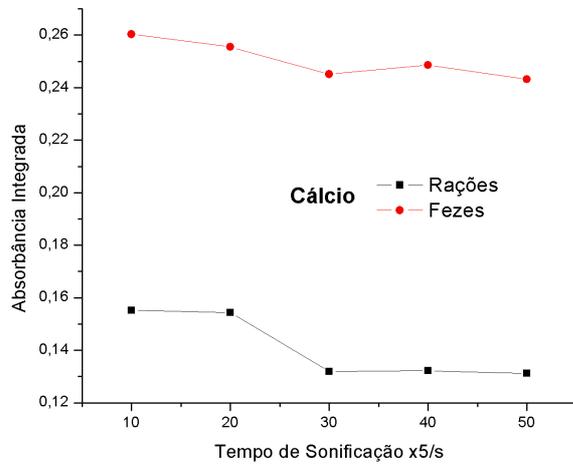


Figura 6. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de cálcio e magnésio de amostras de rações e fezes de leitões. Condições Experimentais: tempo de sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 30, 40 e 50 s; potência utilizada – 102 W; solução extratora – ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

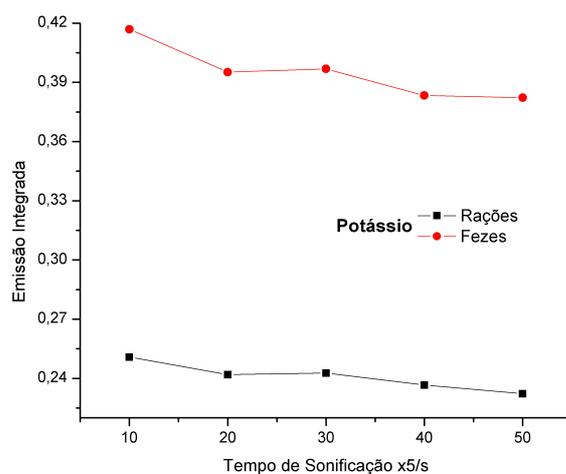
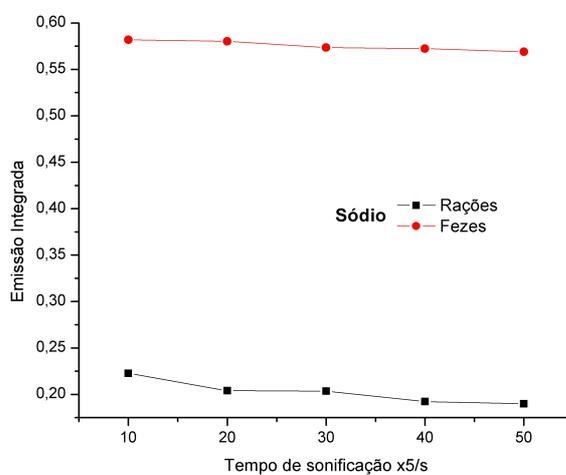


Figura 7. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de sódio e potássio de amostras de rações e fezes de leitões. Condições Experimentais: tempo de sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 30, 40 e 50 s; potência utilizada – 102 W; solução extratora – ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

3.2 Otimização da potência de extração ultra-sônica dos analitos

A intensidade do ultra-som transmitida ao meio está diretamente relacionada à amplitude da vibração da ponta do sonotrodo. Geralmente, um aumento na

intensidade da potência favorecerá um aumento nos efeitos químicos provocados pela sonificação. A influência da amplitude do ultra-som na escala 20-70% da potência total de trabalho (340 W) pode ser visualizada nos gráficos apresentados nas Figuras 8 e 9.

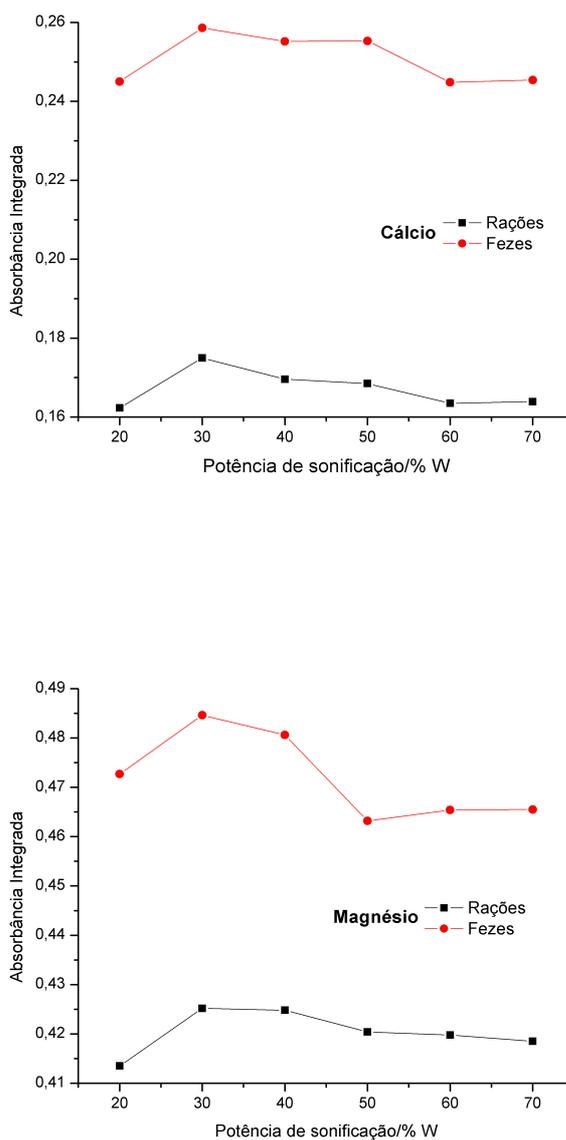


Figura 8. Influência da potência de sonificação no processo de extração de cálcio e magnésio de amostras de rações e fezes de leitões. Condições Experimentais: tempo de sonificação - 5 ciclos de 10 s; solução extratora – ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

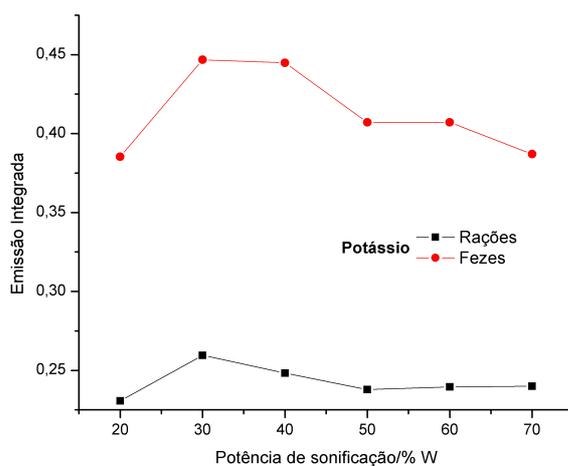
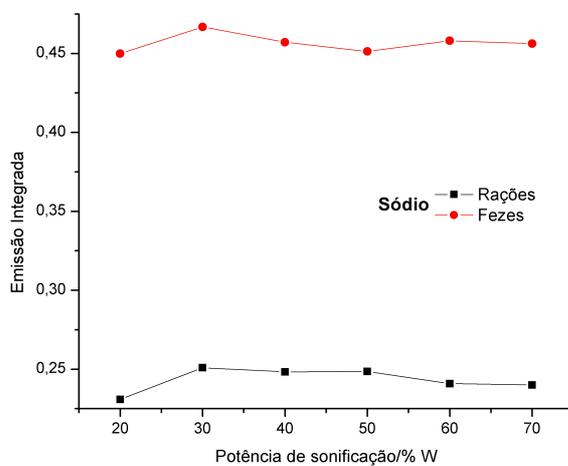


Figura 9. Influência da potência de sonificação no processo de extração de sódio e potássio de amostras de rações e fezes de leitões. Condições Experimentais: tempo de sonificação - 5 ciclos de 10 s; solução extratora – ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

Quando se utiliza amplitude vibracional muito elevada, um grande número de bolhas de cavitação é gerado na solução, o que pode desfavorecer o crescimento e o colapso dessas bolhas, tendo como conseqüência uma diminuição da energia liberada através da fase líquida (Francony & Pétrier, 1996; Elik, 2007; Filgueiras et al., 2000).

Para os quatro metais estudados, a eficiência da extração conforme mostram as Figuras 8 e 9, aumenta com amplitude crescente de 68 a 102 W (20% - 30%), sofrendo um decréscimo para os valores mais elevados de amplitude (102 a 238 W).

Os resultados obtidos indicaram, dessa forma, que a eficiência máxima do processo de extração foi conseguida na escala de amplitude 102 W de potência, pelo fato dessa potência ter provocado um menor aumento de temperatura da solução extratora (54 °C).

3.3 Figura de mérito do método de extração por ultra-som

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos no processo de extração por ultra-som, o método proposto foi aplicado na determinação dos analitos utilizando amostras de rações e fezes de leitões provenientes de ensaios de digestibilidade, cujos teores desses nutrientes foram determinados previamente utilizando a mineralização ácida. A precisão e exatidão do método foram avaliadas por determinação dos analitos em padrão certificado *Bovine Muscle* – NIST RM 8414, também apresentado na Tabela 2, utilizando os mesmos procedimentos de extração para a amostra.

Tabela 2. Resultados (n=4) obtidos nas determinações de cálcio, magnésio, sódio e potássio em padrão certificado *Bovine Muscle* – NIST RM 8414.

Elementos	NIST RM 8414	Extração por ultra-som	Mineralização Ácida
Cálcio	0,145 ± 0,02 g/kg	0,1640 ± 0,01 g/kg	0,1452 ± 0,02 g/kg
Magnésio	0,96 ± 0,095 g/kg	1,0230 ± 0,03 g/kg	0,8711 ± 0,01 g/kg
Sódio	0,21 ± 0,01 %	0,1875 ± 0,03 g/kg	0,1856 ± 0,02 g/kg
Potássio	1,517 ± 0,04 %	1,4972 ± 0,01 %	1,4802 ± 0,01 %

3.4 Aplicação do método proposto

Com base em valores das porcentagens dos nutrientes metálicos determinados nas rações e fezes e na determinação da porcentagem de óxido de crômio foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (*CDa*) desses nutrientes nas

rações pré-iniciais de leitões utilizando a equação 1 proposta por Shahat (1993), conforme o apresentado na Tabela 3.

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

Onde:

CDa = Coeficiente de 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

Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade dos nutrientes em rações pré-iniciais.

Elementos	Coeficientes de Digestibilidade Aparente (%)					
	Ração 1		Ração 2		Ração 3	
	DIG	SON	DIG	SON	DIG	SON
Cálcio	56,28±5,69	55,23±6,89	51,92±6,54	49,83±10,13	51,79±7,18	51,61±9,23
Magnésio	30,10±8,28	30,56±12,26	29,14±4,29	30,10±7,30	20,03±7,83	21,99±11,47
Sódio	81,55±2,73	91,44±0,97	88,44±2,29	91,08±5,30	78,18±5,83	91,92±2,31
Potássio	52,18±4,75	52,94±5,84	52,87±9,50	51,90±9,50	58,55±5,51	59,54±8,84

Legenda: DIG = amostra digerida; SON = amostra sonificada

Teste de Tukey $P > 0,05$

A comparação dos valores dos CDa dos minerais presentes nas três rações pré-iniciais de leitões mostradas na Tabela 3, indica que os valores determinados utilizando o método de extração por ultra-som estão de acordo com os valores obtidos a partir da mineralização ácida, não tendo sido encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$).

Os valores calculados apresentaram desvios padrão relativos menores que 5%, o que comprova uma boa repetibilidade entre as medidas e conseqüentemente uma 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 três rações) foi menor que 4% para o cálcio e magnésio e menor que 7% para o sódio e potássio, o que reforça a exatidão do método proposto e a sua aplicabilidade em estudos de digestibilidade de nutrientes metálicos na nutrição animal.

Conclusões

O método proposto para determinação de cálcio, magnésio, sódio e potássio em rações pré-iniciais de leitões utilizando extração por ultra-som, permitiu calcular os *CDa* desses nutrientes nas rações nas condições propostas e mostraram-se equivalentes aos valores calculados utilizando a mineralização ácida.

Inclusive deve-se destacar que a metodologia proposta diminuiu consideravelmente o tempo de análise, o que favoreceu a velocidade analítica. Além disso, os resíduos tóxicos presentes nos extratos ácidos após a mineralização das amostras não são gerados no processo de extração por ultra-som, corroborando com os princípios da química verde.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Processo: 2007/59778-0) e concessão da bolsa de Mestrado (Processo 2008/50986-1).

Referências

- MURPHY, J.; LANGE, L. Nutritional strategies to minimize nutrient output. In: LONDON SWINE CONFERENCE – BUILDING BLOCKS FOR THE FUTURE, 2004, London. **Anais...**London: NCSU Extension Swine Husbandry, 2004. p.57-71.
- KANE, E.A.; JACOBSON, W.C.; DAMEWOOD, JR.P.M. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **Journal of Dairy Science**, v.42, p.1359-1366, 1979.
- HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.66, n.2, p.163-179, 1987.
- KOZLOSKI, G.V.; FLORES, E.M.M.; MARTINS, A.F. Use of chromium oxide in digestibility studies: variation of the results as a function of the measurement method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.47, p.613-623, 1998.
- MASON, T.J.; LORIMER, J.P. **Sonochemistry**: theory, applications and uses of ultrasound in chemistry, Chichester: Ellis Horwood, 1988.

NASCENTES, C.C.; KORN, M.; ARRUDA, M.A.Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, v.69, p.37-43, 2001.

ELIK, A. Ultrasonic-assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. **Talanta**, v.71, p.790-794, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de Análise Estatística e Genética SAEG**, versão 9.0. Viçosa, MG, 2000.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005. 186p.

SHAHAT, T.M. Digestibility determination in catfish fingerling using internal and external markers. **Veterinary Medical, Journal Giza**, v.41, n.3, p.8391, 1993.

NEVES, R.C.F. et al. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry**, v.113, p.679-683, 2009.

WELZ, B. Symbols and units for integrated absorbance in electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS). *Spectrochimica Acta Part B*, v.47, p.1043-1044, 1992.

ELIK, A. Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.66, p.882-888, 2005.

FILGUEIRAS, A.V. et al. 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**, v.53, p.433-441, 2000.

FRANCONY, A., PÉTRIER, C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.3, p.S77-S82, 1996.

ANEXO 1

Tabela - Composição centesimal e valores nutricionais calculados das rações pré-iniciais (0 – 16 dias).

Ingredientes	Rações pré-iniciais		
	Óleo de soja (T ₁)	Óleo de palma (T ₂)	Blend ¹ (T ₃)
Milho, Grão	52,215	52,215	52,215
Soja, Farelo	20,000	20,000	20,000
Protenose	2,850	2,850	2,850
Levedura	4,000	4,000	4,000
Células sangüíneas	1,500	1,500	1,500
Blend ¹	0,000	0,000	10,000
Ácido fumárico	0,600	0,600	0,600
Leite em pó	1,040	1,040	0,000
Maltodextrina	10,000	10,000	4,070
Óleo de soja	3,030	0,000	0,000
Óleo de palma	0,000	3,030	0,000
Amoxicilina 20%	0,040	0,040	0,040
Calcário	0,750	0,750	0,750
Fosfato Bicálcico	2,000	2,000	2,000
Cloreto de Sódio	0,300	0,300	0,300
L-Lisina HCl (78,4%)	0,620	0,620	0,620
DL-Metionina (99%)	0,110	0,110	0,110
L-Treonina (98,5%)	0,270	0,270	0,270
L-Triptofano (98%)	0,045	0,045	0,045
Óxido de Zinco	0,340	0,340	0,340
Antioxidante ²	0,020	0,020	0,020
Antibiótico ³	0,010	0,010	0,010
Acidificante ⁴	0,000	0,000	0,000
Edulcorante ⁵	0,020	0,020	0,020
Cloreto de Colina	0,040	0,040	0,040
Suplem. vitamínico ⁶	0,100	0,100	0,100
Suplem. mineral ⁷	0,100	0,100	0,100
Total	100,000	100,000	100,000
Valores Calculados			
EM (kcal/kg)	3406	3387	3386
Proteína Bruta (%)	19,54	19,54	19,46
Lisina Total (%)	1,50	1,50	1,50
Metionina Total (%)	0,42	0,42	0,42
Treonina Total (%)	1,03	1,03	1,03
Triptofano Total (%)	0,26	0,26	0,26
Cálcio (%)	0,88	0,88	0,88
Fósforo (%)	0,68	0,68	0,68

1 - Blend contém: 30,30% de óleo de palma, 10,40% de leite em pó e 59,30% de maltodextrina; 2 - Butil- hidroxi-tolueno; 3 - Sulfato de colistina; 4 - Calprona PP6®: 6,30% ácido propiônico, 19,60% ácido fórmico, 19,60% ácido acético, 8,50% ácido cítrico, 21,00% de ácido fosfórico, fornecendo 24,00% de Ca e 6,00% de P; 5 - Sucran⁷ (sacarina sódica); 6 - Suplemento vitamínico fornece por Kg de ração: 9000 UI vit. A; 2250 UI vit. D₃; 22,5 mg vit. E; 22,5 mg vit. K₃; 2,03 mg vit. B₁; 6 mg vit. B₂; 3 mg vit. B₆; 30 µg vit. B₁₂; 0,9 mg ácido fólico; 14,03 mg ácido pantotênico; 30 mg niacina; 0,12 mg biotina; 400 mg de colina; 7 - Mistura mineral fornece por Kg de ração: 100 mg Fe; 10 mg Cu; 40 mg Mn; 100 mg Zn; 1 mg Co; 1,5 mg I.

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

A extração de minerais por ultra-sonificação apresenta-se como técnica bastante promissora, principalmente porque permite a eliminação da etapa de mineralização ácida, evitando assim, a produção de resíduos tóxicos no processo, os quais são prejudiciais ao analista e ao meio ambiente. Em decorrência do exposto, outra vantagem da técnica proposta é o enquadramento nos princípios da Química Verde.

Além disso, a metodologia proposta pode ser utilizada em trabalhos de rotina em laboratórios de bromatologia, diminuindo o tempo de preparo das mesmas e, por conseguinte, o tempo das determinações analíticas.

Essa facilidade analítica contribui bastante para os estudos de digestibilidade na nutrição animal, principalmente com leitões, uma vez que os resultados são obtidos com mais rapidez e podem auxiliar no planejamento nutricional dessa fase, contribuindo para o aumento da eficiência alimentar e do desempenho produtivo do suíno da creche até a terminação.

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](#)