

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DETERMINAÇÃO DE Si E Y EM AMOSTRAS AGRONÔMICAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS

Ellen Aguilar Dias*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** bolsista: CNPq (Processo 131889/2019-2)**

São Carlos – SP

2021



Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ellen Aguilar Dias, realizada em 20/05/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Luana Novaes Santos (UESC)

Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes (UFMG)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.”

(Pablo Picasso)

À minha família pelo apoio.
Minha mãe Gracília, meu pai Eduardo e minha irmã
Eduarda, fontes de companheirismo, cumplicidade e
amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar energia, coragem e forças para ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais, Gracília e Eduardo, que se dedicaram e me incentivaram em todas as minhas decisões. Agradeço por serem exemplos e por todo o amor e apoio. À minha irmã Eduarda, por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos.

Ao meu namorado Denilson, por todo amor e carinho dedicado a mim. Por me incentivar e trazer alegria, risadas e leveza na minha vida.

Agradeço à Dr^a Ana Rita pela orientação, pelo conhecimento, apoio e generosidade. És um exemplo de profissional, de serenidade e ética. Obrigada!

Aos professores Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega por todo conhecimento compartilhado e pelo incentivo.

Ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada, do qual tive o prazer de fazer parte. Obrigada pelas conversas, incentivos e contribuições. Em especial à Julymar, Raiza, Ivero, Ana Beatriz, Cibeli, Mykaelli e Herick obrigada pela convivência diária, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela amizade.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste por todo suporte técnico e por sempre se disponibilizarem em ajudar e compartilhar conhecimento naquilo que era necessário.

Ao Departamento de Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela infraestrutura e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, código de financiamento 001.

Aos membros da banca pelas correções e valiosas sugestões.

Por fim a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste mestrado.

LISTA DE ABREVIÇÕES

BEC - Concentração equivalente ao sinal de fundo (Background equivalent concentration)

CCD – Dispositivo de carga acoplada (Charge-coupled device)

CRM – Material de referência certificado (Certified reference material)

DRC-ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com cela dinâmica de reação

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry)

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)

LOD – Limite de detecção (Limit of detection)

LOQ – Limite de quantificação (Limit of quantification)

μED-XRF - Fluorescência de raios-X com micro-energia dispersiva (Microenergy dispersive X-ray fluorescence)

MIP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry)

MW – Micro-ondas (Microwave)

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (National Institute of Standards and Technology)

XRF - Fluorescência de raios-X (X-ray fluorescence)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para determinação de elementos inorgânicos.	11
TABELA 2. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam MIP OES para determinação de elementos inorgânicos.	20
TABELA 3. Condições operacionais aplicados no ED-XRF e μ ED-XRF	23
TABELA 4. Condições operacionais para a determinação de Si por MIP OES.	24
TABELA 5. Diferentes volumes de HBF_4 na determinação de Si por MIP OES (média \pm desvio padrão, $n=3$) em amostras de folhas de cana-de açúcar e recuperações obtidas a partir da fração de massa de Si determinada por μ ED-XRF.	29
TABELA 6. Fração de massa de Si (mg kg^{-1}) em amostras de folhas de cana-de-açúcar e colmos de sorgo determinados por MIP OES (média \pm desvio padrão, $n= 3$).	34
TABELA 7. Avaliação da veracidade do método em amostras de folhas de cana-de-açúcar determinados por MIP OES (média \pm desvio padrão, $n= 3$) e recuperações obtidas a partir do teor de Si determinadas por ICP OES.	35
TABELA 8. Avaliação da veracidade do método em amostras de folhas de cana-de-açúcar determinados por MIP OES (média \pm desvio padrão, $n= 3$) e recuperações obtidas a partir do teor de Si determinadas por XRF.	35

TABELA 9. Fração de massa de Si em amostras de colmos de sorgo determinados por MIP OES (média ± desvio padrão, n =3).	36
TABELA 10. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ácido diluído no preparo de amostras com digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado para determinação de elementos inorgânicos.	52
TABELA 11. Condições operacionais para a determinação de Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Y por MIP OES.	61
TABELA 12. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a determinação de Y por MIP OES.	65
TABELA 13. Dados para linearidade do ítrio determinado por MIP OES.	66
TABELA 14. Testes estatísticos para a Linearidade do ítrio.	67
TABELA 15. Testes F (Snedecor) e Teste t para avaliar o efeito de matriz.	69
TABELA 16. Coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade.	69
TABELA 17. Coeficiente de variação para avaliação da precisão intermediária.	70
TABELA 18. Recuperações obtidas na avaliação da veracidade	71
TABELA 19. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as determinações por MIP OES.	72
TABELA 20. Equações das curvas analíticas obtidas para os elementos analisados em amostras de ração e fezes de peixe e determinados por MIP OES.	73
TABELA 21. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de macieira (NIST SRM 1515) determinados por MIP OES.	74

TABELA 22. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de tomateiro (NIST SRM 1573a) determinados por MIP OES.74

TABELA 23. Frações de massa dos macronutrientes (média \pm desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes analisados por MIP OES.76

TABELA 24. Frações de massa dos micronutrientes e Y (média \pm desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes analisados por MIP OES.78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais componentes presentes no MIP OES	19
FIGURA 2. Estimativa da fração molar de H_3BO_3 nas soluções digeridas	31
FIGURA 3. Representação de uma curva analítica típica e seus componentes	55
FIGURA 4. Resíduos da regressão linear do Y	67

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE Si E Y EM AMOSTRAS AGRONÔMICAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS. Diferentes demandas por respostas analíticas são requeridas na pesquisa agropecuária. Nesse enfoque, essa dissertação, dividida em dois capítulos, procura oferecer alternativas analíticas para projetos de melhoramento vegetal e nutrição de peixes. No primeiro capítulo foi desenvolvido um procedimento para a determinação de silício em amostras vegetais, especificamente o sorgo (*Sorghum bicolor*), empregado na alimentação animal e na produção de bioenergia. A presença de altos teores de Si na planta pode provocar danos em caldeiras utilizadas para a geração de bioenergia. Como alternativa ao uso do HF, normalmente empregado na digestão de amostras para a determinação de Si, foi avaliado o emprego do ácido fluorbórico (HBF_4) bem como seus possíveis produtos de reação. Digestão assistida por radiação micro-ondas foi utilizada para o preparo das amostras e a determinação por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Foram estudados diferentes volumes do ácido HBF_4 (0,2 mL, 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL), indicando o volume de 0,2 mL o mais adequado, com recuperação de 99% em amostras previamente analisadas por espectrometria de fluorescência por raios-x (XRF) e limite de detecção de $0,03 \text{ g kg}^{-1}$. A digestão com HBF_4 indicou que o Si solubilizado se encontra principalmente como H_2SiF_6 . As condições de equilíbrio das reações envolvidas indicaram também a formação de HF, confirmando a necessidade de empregar estratégias para se evitar danos aos componentes dos equipamentos. As frações de massa de Si encontradas nas amostras de sorgo analisadas variaram de 0,67 a $4,57 \text{ g kg}^{-1}$. No segundo capítulo é apresentado o desenvolvimento e validação de procedimento de preparo de amostras para a quantificação de Y por MIP OES empregado como marcador na avaliação da digestibilidade em amostras de ingredientes, dietas e fezes de peixes. O procedimento desenvolvido apresentou adequada linearidade através dos valores de r e r^2 , avaliação dos resíduos e da homocedasticidade. A seletividade foi avaliada no estudo relacionado aos efeitos de matriz obtendo resultados satisfatórios. Já a precisão, que incluiu repetibilidade e precisão intermediária, apresentou $\text{cv} \leq 5 \%$. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram, respectivamente $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ e $1,99 \text{ mg kg}^{-1}$.

ABSTRACT

DETERMINATION OF Si AND Y IN AGRONOMIC SAMPLES BY MICROWAVES INDUCED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY. Different demands for analytical responses are presented in agricultural research. In this approach, this dissertation, divided into two chapters, seeks to offer analytical alternatives for plant breeding and fish nutrition projects. In the first chapter, a procedure was developed to determine silicon in plant samples, specifically sorghum (*Sorghum bicolor*), used in animal feed and bioenergy production. The presence of high levels of Si in the plant can cause damage to boilers used for the generation of bioenergy. As an alternative to the use of HF, usually employed in the digestion of samples for the determination of Si, the use of HBF₄ acid and its possible products of reaction were evaluated. Microwave-assisted digestion was used for sample preparation and determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). Different volumes of HBF₄ acid (0.2 mL, 0.5 mL, 1.0 mL and 2.0 mL) were studied, indicating the most appropriate 0.2 mL volume, with 99% recovery in samples previously analyzed by X-ray fluorescence spectrometry (XRF), and 0.03 g kg⁻¹ limit of detection. The digestion with HBF₄ showed that about 70% of Si solubilized was found as fluorosilicic acid. Also, the equilibrium conditions of the reactions involved indicated the formation of HF, confirming the need to employ strategies to avoid damage to the components of the equipment. The mass fractions of Si found in the analyzed sorghum samples ranged from 0.67 to 4.57 g kg⁻¹. The second chapter presents the development and validation of a sample preparation procedure for the quantification of Y by MIP OES. It was used as a marker to evaluate digestibility in ingredients, diets, and fish faeces. The developed procedure presented adequate linearity. It was assessed by values of r and r², evaluated residues, and homoscedasticity. Selectivity was evaluated in the study related to matrix effects, obtaining satisfactor results. Precision, which included repeatability and intermediate precision, presented cv < 0.5%. The limits of detection and quantification obtained were 0.60 mg kg⁻¹ and 1.99 mg kg⁻¹, respectively.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: ESTUDO E UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE SI EM SORGO	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Objetivos	5
1.1.1. Objetivo geral	5
1.1.2. Objetivos específicos	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Sorgo	7
2.2. Silício nas plantas	8
2.3. Procedimento de preparo de amostras	9
2.3.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas	9
2.3.2. Digestão de matrizes com alto teor de silício	13
2.3.2.1. Digestão ácida	13
2.3.2.2. Fusão alcalina e digestão em meio básico	14
2.3.3. Métodos de determinação de silício	15
2.3.4. Técnicas de plasma	16
2.3.5. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Instrumentação	23
3.2. Reagentes e soluções	24
3.3. Amostras	25
3.4. Preparo das amostras	25

3.4.1. Procedimento de digestão com HBF ₄	25
3.4.2. Procedimento de digestão ácida e alcalina	26
3.4.3. Procedimento de avaliação dos produtos de reação	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Avaliação do volume de ácido e precisão	29
4.2. Digestão ácida com HBF₄	29
4.3. Digestão ácida seguida da digestão alcalina	32
4.4. Limites de detecção	33
4.5. Análise das amostras	33
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	38
CAPÍTULO 2: VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE Y EM AMOSTRAS DE RAÇÃO E FEZES DE PEIXE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM)	39
1. INTRODUÇÃO	41
1.1. Objetivos	43
1.1.1. Objetivo geral.....	43
1.1.2. Objetivos específicos	43
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
2.1. Peixe Tambaqui no Brasil	45
2.2. Avaliação da digestibilidade dos peixes.....	45
2.3. Função e determinação dos nutrientes inorgânicos	48
2.4. Procedimento de preparo de amostras	50
2.4.1. Emprego de ácido diluído.....	50
2.5. Validação	54
2.5.1. Seletividade	54
2.5.2. Linearidade e Faixa de trabalho	54
2.5.3. Limites de detecção e quantificação	56
2.5.4. Veracidade.....	56

2.5.5. Precisão.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.1. Instrumentação	60
3.2. Reagentes e soluções padrão	62
3.3. Amostras	62
3.4. Preparo de amostras.....	63
3.4.1. Procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Validação do método	65
4.1.1. Limite de detecção e de quantificação.....	65
4.1.2. Linearidade	66
4.1.3. Seletividade	68
4.1.4. Repetibilidade	69
4.1.5. Precisão Intermediária	70
4.1.6. Veracidade.....	70
4.2. Aplicação analítica.....	71
4.2.1. Limite de detecção e quantificação.....	71
4.2.2. Linearidade e faixa dinâmica linear	72
4.2.3. Veracidade.....	73
4.2.4. Resultados.....	75
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	81
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

CAPÍTULO 1: Estudo e utilização do método de determinação de Si em sorgo

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Originário da África, o sorgo *Sorghum bicolor* [L.] Moench é o quinto cereal mais produzido no mundo, sendo agronomicamente classificado em 5 grupos: granífero, forrageiro, sacarino e o sorgo lignocelulósico ou biomassa (HARIPRASANNA e PATIL, 2015; DOGGET, 1970). Por ser uma cultura resistente a locais quentes e com déficit hídrico, é cada vez mais cultivado em diversos locais do Brasil, com 2,55 milhões de toneladas produzidas em 2010 (INDEX MUNDI, 2021; STATISTA, 2021). Apesar de o sorgo ser cultivado nos EUA e na Austrália para o consumo humano, no Brasil é utilizado majoritariamente para fins de alimentação animal e na produção de bioenergia (HARIPRASANNA e PATIL, 2015; REZENDE e RICHARDSON, 2017; ALMEIDA et al., 2019).

Diante dos diversos tipos de sorgo, a sua cultura é estratégica para o agronegócio. O sorgo granífero, por ser resistente à escassez hídrica, contribui na produção de grãos do país. Já o sorgo forrageiro é utilizado para alimentação animal, principalmente em épocas de seca. Tanto o sorgo sacarino quanto o lignocelulósico aparecem como alternativas de produção de energia renovável, como o bioetanol e de biomassa (REZENDE e RICHARDSON, 2017; ALMEIDA et al., 2019; PARRELLA et al., 2010).

Os estresses bióticos e abióticos são os principais fatores de crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, plantas expostas frequentemente a esses estresses podem ter produção reduzida tanto em relação a sua biomassa quanto dos grãos (HUI et al., 2012).

Tido como elemento benéfico e relatado como essencial, o silício ao ser acumulado da rizosfera nas plantas pode minimizar efeitos desfavoráveis dos estresses bióticos e abióticos, através de diversos mecanismos de resistência (LI, Z. et al., 2018; HUI et al., 2012). O Si é depositado nas plantas principalmente na forma de fitólito $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, que age como uma barreira física, aumentando a resistência da planta através da redução da toxicidade de íons metálicos, regulação das atividades de enzimas antioxidantes e regulação e manutenção do equilíbrio hídrico da planta entre outros (LUYCKX et al., 2017; ETESAMI e JEONG, 2018). Apesar da essencialidade do Si na nutrição das plantas, a presença de altas concentrações do

elemento nos combustíveis pode provocar danos na câmara de combustão dos veículos bem como nas caldeiras de aquecimento para a produção de energia através da formação de incrustações nas partes metálicas, o que dificulta a transferência de calor e favorece o rompimento dos tubos das caldeiras (ÁLVAREZ-FLÓREZ e EGUSQUIZA, 2015; TAVARES et al., 2013).

Para a determinação de Si em amostras de biomassa existem diversas alternativas sendo que para o preparo de amostras é utilizado principalmente digestão com HF (BLOND et al., 2011; NAKADI et al., 2018), fusão (TAFUR-MARINOS et al., 2016) ou por análise direta de sólidos por absorção eletrotérmica (BOSCHETTI et al., NAKADI et al., 2018) ou pelo emprego de espectrometria induzida por laser (SOUZA et al., 2015; YIN et al., 2009).

Em função da necessidade da determinação dos teores de Si presente em amostras de sorgo de biomassa nesta pesquisa foi desenvolvido procedimento que visa a substituição do HF por ácido fluorbórico para o preparo de amostras de sorgo.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Desenvolver procedimento para a digestão de amostras de sorgo utilizado como biomassa para geração de energia através da adoção do HBF_4 para a quantificação de Si por MIP OES.

1.1.2. Objetivos específicos

- i. Avaliar possíveis produtos de reação envolvidos no processo de digestão utilizando o HBF_4 ;
- ii. Comparar a digestão com HBF_4 e a digestão em meio básico para a determinação de Si;
- iii. Definir o protocolo para preparo de amostras de biomassa de sorgo;
- iv. Determinar Si em amostras de sorgo;

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sorgo

O sorgo é uma planta originária da África, tendo também a Índia como segundo ponto de origem, grandes produtores até os dias atuais, sendo os Estados Unidos o maior produtor, totalizando 8,91 milhões de toneladas em 2020 (INDEX MUNDI, 2021). O sorgo foi cultivado no Brasil a partir do século XX principalmente nas regiões de Goiás e Minas Gerais. Esses dois estados, juntamente com a Bahia são atualmente os principais produtores do país (CONAB, 2018).

Os principais tipos de sorgo cultivados no Brasil são: o sorgo granífero, forrageiro, sacarino e o lignocelulósico ou biomassa. O sorgo granífero foi cultivado a partir da década de 70 no Brasil e diferentemente de alguns países da África e da Ásia, os grãos são majoritariamente empregados na alimentação animal devido à similaridade do valor nutritivo quando comparado ao do milho. Existem diversos estudos sobre a sua introdução em dietas para diversos animais tais como aves (ARMSTRONG et al., 1973), bovinos (SANTOS, et al., 1999; BERNARD e TAO, 2017), suínos (FIALHO et al., 2004; O'QUINN et al., 1997) entre outros, em função da sua composição química como o teor de amido e aminoácidos (MCCUISTION et al., 2019).

Já o sorgo forrageiro é principalmente cultivado em regiões de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro por ser bastante versátil devido a possibilidade de utilização para feno, silagem e pastejo direto. Estudos compararam diferentes dietas à base de silagem de milho e silagem de sorgo forrageiro, cujo objetivo principal é avaliar as respostas obtidas pela alimentação de vacas leiteiras e em todos os casos, apesar da produção de leite ser menor quando alimentadas pela silagem de sorgo, as diferenças entre as dietas não são significativas (BERNARD e TAO, 2017; COLOMBINI, et al., 2012; HARPER et al., 2017). De acordo com SAMARAPPULI e BERTI (2018), a silagem de sorgo pode ser utilizada não só como uma alternativa de substituição ou adição às dietas de animais como também para a produção de biogás. Principalmente quando comparada ao milho, o rendimento da biomassa são similares e o seu cultivo tem menor impacto ambiental.

O sorgo sacarino assim como os outros tipos é utilizado como alimento animal, mas o seu cultivo passou a ter como principal finalidade na produção de

bioetanol. Isso se dá principalmente pela sua tolerância à seca, eficiência produtiva em solos de baixa qualidade, podendo ser cultivado em regiões semiáridas, bem como boa eficiência energética (NAZLI, 2020; JANKOWSKI et al., 2020; PARRELLA et al., 2010). Outro estudo avaliou a utilização desse tipo de sorgo juntamente com a cana-de-açúcar para a produção de etanol em microdestilaria, resultando em uma boa alternativa, tanto por poder ser cultivado durante a entressafra da cana-de-açúcar tanto por apresentarem teores alcoólicos semelhantes (TEIXEIRA et al., 1997).

O sorgo biomassa por sua vez se apresenta como um bom candidato para o processo de obtenção de energia por queima direta principalmente devido ao seu cultivo poder ser feito em regiões de escassez hídrica, custo de produção mais baixo e pelo ciclo de produção ser mais rápido quando comparado com outras matérias primas (YUE et al., 2017; MAY et al., 2013). Um estudo recente demonstrou a possibilidade da produção de bioetanol de segunda geração a partir desse tipo de sorgo devido a seus elevados teores de celulose, hemicelulose e lignina (ALMEIDA et al., 2019).

2.2. Silício nas plantas

O silício é o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre, constituindo cerca de 28,8%. Apesar de não ser considerado um elemento essencial, estudos demonstram sua importância devido aos efeitos benéficos causados nas plantas, principalmente em relação ao desenvolvimento e estruturação das mesmas (EPSTEIN, 2001; MENEGALE et al., 2015). Entre os principais benefícios do Si nas plantas destacam-se: aumenta da tolerância ao estresse hídrico, aumento da capacidade fotossintética, diminuição do acamamento, redução da transpiração e aumento da resistência ao ataque de pragas e doenças (KORNDÖRFER et al., 2004).

O silício é absorvido do solo onde se encontra principalmente na forma de ácido monossilícico, cuja disponibilidade está relacionada ao pH do solo (MENEGALE et al., 2015; CAMPOS e MAIA, 2019). Ao ser absorvido pelas raízes o silício é transportado e acumulado nas epidermes das folhas na forma de fitólito ou sílica amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) agindo então como uma barreira física, aumentando a resistência da planta contra os estresses abióticos e bióticos (LUZ et al., 2015; NETO et al., 2019; LUYCKX et al., 2017).

Um estudo realizado por RESENDE et al. (2009) teve por objetivo avaliar o efeito do silício em duas linhagens distintas de sorgo com a doença antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolu*. Foi possível notar que as plantas que tiveram maior fornecimento de Si resistiam mais a doença. HURTADO et al. (2019) avaliaram os efeitos da presença de Si em sorgo e girassol submetidos a estresse salino medindo a absorção de macronutrientes e micronutrientes, Os autores observaram que o Si permitiu uma menor absorção de íons sódio aliviando, portanto, o estresse salino e melhorando a eficiência nutricional, o que favorece o aumento da matéria seca produzida.

Considerando o emprego do sorgo como matéria prima para a produção de combustível, a presença de altos teores de Si pode acarretar danos na câmara de combustão dos veículos bem como nas caldeiras de aquecimento. O Si pode combinar com outros elementos, formando espécies que são praticamente insolúveis em água e com a maioria dos ácidos, favorecendo a produção de incrustações reduzindo a troca de calor do equipamento com o meio, podendo gerar também no entupimento e corrosão dos componentes metálicos (ÁLVAREZ-FLÓREZ e EGUSQUIZA, 2015; TAVARES et al., 2013). A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis estabelece como 80 mg kg⁻¹ a concentração máxima de Si + Al em biodiesel (BRASIL, 2010).

2.3. Procedimento de preparo de amostras

2.3.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas

A digestão se refere a um processo mais complexo quando comparado ao processo de dissolução e se baseia na remoção da matéria orgânica e na solubilização dos analitos através da aplicação de altas temperaturas e/ou maior pressão. A amostra é oxidada através do emprego de ácidos inorgânicos e com alto poder oxidante, gerando espécies solúveis em água (SKOOG et al., 2006; KRUG e ROCHA, 2019).

Pelo fato da radiação micro-ondas ser transferida de forma direta e ter uma distribuição homogênea para as moléculas da solução contida nos frascos que são mantidos em um sistema de alta pressão e temperatura, a digestão assistida por radiação micro-ondas é muito utilizada para o preparo de amostras (SKOOG et al., 2006; FLORES, 2014). Isso implica em um processo de digestão mais rápido

quando comparado a métodos que se baseiam no aquecimento por condução, tais como chama e bloco digestor (KRUG e ROCHA, 2019). A digestão assistida por radiação micro-ondas pode ser realizada em frasco aberto ou fechado, sendo o frasco fechado utilizado principalmente para amostras que apresentam maior quantidade de compostos orgânicos e quando se pretende determinar analitos voláteis (KRUG e ROCHA, 2019; MILLOUR et al., 2011).

Métodos baseados na digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado são amplamente relatados na literatura, sendo que alguns trabalhos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Levantamento bibliográfico de publicações recentes que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo para determinação de elementos inorgânicos.

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Ano	Referência
K, Ca, Mg, S, P, Cu, Fe, Mn e Zn	Sementes de guaraná	1 mL de HNO ₃ (9,0 mol L ⁻¹) 3 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹) 6 mL de H ₂ O ultrapura	ICP OES	2019	SANTOS, H. et al., 2019
Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo e Ni	Arroz	5 mL de HNO ₃ (1,0 mol L ⁻¹) 2,5 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2020	SILVA, et al., 2020
Ba, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn	Biodiesel	Mistura: 7 mol L ⁻¹ de HNO ₃ 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	SF-ICP-MS	2017	BARELA, et al., 2017
38 elementos	Sangue, urina, tecido e cabelo	2 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 200 µL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP-MS	2019	GRASSIN-DELYLE, et al., 2019
Ni e V	Óleo cru	3 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 4 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2017	ANJOS, et al., 2017
As, Cd, Cr, Pb, Se, V e Sb	Produtos do cacau e chocolate	3 mL de HNO ₃ (60% v v ⁻¹) 5 mL de H ₂ O ultrapura	ICP-MS	2018	LO DICO, et al., 2018
Hg	Óleo de ômega 3	5 mL de HNO ₃ (65% v v ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2018	SHABESTARI, et al., 2018

Tabela 1. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Ano	Referência
Zn, Al, As, Cd, Pb, Sn, Cr e Hg	Papel de filtro de microfibra de vidro e filtro de ar	4 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP-MS	2017	AHMED, et al., 2017
Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Se e Zn	Arroz	7 mL de HNO ₃ (4,5 mol L ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	2017	TARANTINO, et al., 2017
Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn	Linhaça e gergelim	2 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2018	SOUZA et al., 2018
Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Sr e Zn	Ração de porco	4 mL de HNO ₃ (7 mol L ⁻¹) 1,5 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	2019	SAVIO, et al., 2019
Zn, P, Cd, Pb, Fe, Mn, Mg, Cu, Ca, Al, Na e K	Farinha de trigo, pão integral, dieta total e leite em pó desnatado	10 mL da mistura: 2% (v v ⁻¹) de HClO ₄ 4% (m v ⁻¹) de H ₂ O ₂	ICP OES	2019	MULLAPUDI, et al., 2019

2.3.2. Digestão de matrizes com alto teor de silício

2.3.2.1. Digestão ácida

A digestão completa de amostras de plantas para a determinação de Si é um processo complexo devido a presença de $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e é realizada principalmente com o emprego de ácidos, mas também pode ser feita por outros métodos como fusão alcalina e ácido diluído com adição de solução alcalina (BARROS et al., 2016). Considerando o emprego de ácidos para a digestão completa, o ácido fluorídrico é o mais empregado e recomendado pelo US EPA (1996), porém o seu uso pode acarretar problemas aos operadores, por ser um ácido complexante bastante perigoso em contato com a pele ou se inalado, podendo provocar queimadura severa à pele e dano aos olhos (KRUG e ROCHA, 2019). Além disso, o ácido restante contido na solução digerida pode atacar e danificar os componentes de quartzo ou vidro presentes nos equipamentos empregados para as determinações, bem como gerar contaminação do branco analítico. A formação de fluoretos insolúveis como CaF_2 , MgF_2 e AlF_3 também é observada. Como alternativa para superar esses problemas é adicionado ácido bórico para complexar com o excesso de HF e evitar a liberação do flúor.

O ácido tetrafluorbórico foi investigado por alguns pesquisadores em relação ao seu desempenho na digestão de materiais silicatados. KRACHLER et al. (2002) compararam dois métodos de digestão de amostras de turfa e matrizes de planta utilizando autoclaves e digestão assistida por radiação micro-ondas para a determinação de terras raras. Os autores observaram que os resultados obtidos utilizando HNO_3 juntamente com o HBF_4 foram próximos quando comparados com o método utilizando HNO_3 e HF. O HBF_4 se mostrou como uma alternativa para a digestão de matrizes com alto teor de silício devido à redução significativa da formação de fluoretos insolúveis como também em razão do menor volume de ácido, diminuindo problemas relacionados ao excesso de acidez durante a determinação.

SUCHAROVÁ e SUCHARA (2006) avaliaram três métodos distintos de digestão sendo o procedimento A: $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, procedimento B: $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HF} + \text{H}_3\text{BO}_3$ e por fim o procedimento C: $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HBF}_4$ para a determinação da recuperação de 36 elementos em amostras de materiais de referência de vegetais utilizando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

(ICP-MS) como técnica de determinação. O procedimento C demonstrou ser tão eficiente quanto o procedimento B, o que pode ser observado pelas recuperações e resultados com valores estatisticamente semelhantes. Além disso, o procedimento C apresentou o menor tempo de digestão e uso de volume de HBF_4 inferior ao HF.

2.3.2.2. Fusão alcalina e digestão em meio básico

A fusão é uma reação heterogênea executada em altas temperaturas entre um fundente e o material da amostra. Como resultado desse procedimento, um mineral original ou fases refratárias são convertidas em formas sólidas diferentes que são facilmente dissolvidas em ácidos, bases ou até mesmo em água (KRUG e ROCHA, 2019). HOGENDORP et al. (2010) propuseram a fusão alcalina para a quantificação de Si em amostras de tecido vegetal de plantas e obtiveram resultados satisfatórios. MENEGUIN et al. (2019) empregaram a fusão alcalina para solubilização do silício presente em amostras de cinzas de bagaços de cana-de-açúcar para a sintetização de um material ecológico.

Considerando a fusão alcalina como método de preparo de amostras para a determinação de Si, os principais problemas relacionados à sua utilização são a contaminação da solução da amostra em função do elevado conteúdo de sólidos dissolvidos (prejudicial para determinações via técnicas de plasma) e as interferências espectrais causados pelo fundente, prejudicial para determinações por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Como alternativa, YU et al. (2003) utilizaram a digestão com ácido nítrico com aquecimento assistido por radiação micro-ondas seguido pela adição de HF, para avaliar a digestão completa para a solubilização de Si presente em filtros, sendo analisada a sílica livre cristalizada. Os resultados demonstraram recuperações comparáveis à fusão alcalina.

BARROS et al. (2016) trouxeram uma nova abordagem para a digestão de amostras de plantas para a determinação de Si. A digestão é realizada em duas etapas, sendo a primeira constituída por digestão ácida utilizando HNO_3 diluído e H_2O_2 com aquecimento assistido por radiação micro-ondas e a segunda etapa digestão básica utilizando NaOH ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$), também assistida por radiação micro-ondas. Silício, Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, S e Zn foram determinados em amostras de materiais vegetais e a veracidade do método avaliada com o emprego de materiais de referência certificado indicou recuperações na faixa de 90,2 a 115%.

2.3.3. Métodos de determinação de silício

Entre os principais itens a serem observados quando da escolha de um método de análise devem ser destacados a demanda e treinamento da mão de obra, a disponibilidade de equipamentos, a confiabilidade dos métodos (precisão e veracidade), o tempo empregado nas determinações e o custo total da análise (KORNDÖRFER et al., 2004).

Baseado na fusão alcalina da sílica (FREITAS, 1973), o método gravimétrico de determinação do Si é considerado como padrão, porém apresenta-se pouco prático no dia a dia dos laboratórios, por demandar muita mão de obra.

Técnica até recentemente bastante utilizada, a espectrofotometria apresenta como vantagens ser rápido e preciso, além de baixo custo e possibilitar determinações de diferentes teores de silício (KORNDÖRFER et al., 2004). A determinação colorimétrica envolve a reação do ácido silícico com o ácido molíbdico [$H_4(SiMo_{12}O_{40})$], resultando na formação do complexo ácido sílico-molíbdico, de coloração amarela (FREITAS, 1973).

Com a evolução e o surgimento de novos instrumentos analíticos bem como o desenvolvimento de ferramentas analíticas, a análise direta de sólidos vem sendo cada vez mais utilizada para a determinação de diversos elementos (KRUG e ROCHA, 2019). Essa modalidade apresenta algumas vantagens quando comparada aos métodos que necessitam de decomposição por via úmida, tais como: preparo de amostras de forma simples e rápida, menor risco de contaminação devido ao menor uso de reagentes, menor risco de perda por volatilização e menor geração de resíduos, entre outros (KRUG e ROCHA, 2019; PENG et al., 2016; LI, Y. et al., 2018).

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) é um exemplo de técnica de análise direta e se baseia na emissão de radiação a partir de pulsos de alta energia, devido a uma fonte de laser, aplicado diretamente na amostra. Desta forma um trabalho feito por SOUZA et al. (2013) teve por objetivo desenvolver um método que utiliza a LIBS como o método de análise direta para a determinação de Si em amostras vegetais. Para o preparo de amostra foram feitas pastilhas a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar moídas por moinho criogênico. Ao serem analisadas por LIBS os resultados foram comparados com os obtidos por ICP OES, cujas amostras foram digeridas pelo método de

digestão proposto por BARROS et al. (2016) e não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos.

TRIPATHI et al. (2016) avaliaram a presença de Si e Pb em mudas de trigo em relação à absorção de Pb e estresse oxidativo, entre outros. Foi feita a análise de Si e Pb *in vivo*, para avaliar a sua distribuição ao longo da planta, utilizando o LIBS focando na superfície da raiz e no caule. Com isso foi possível notar menores teores de Pb em mudas cultivadas com Pb e Si, bem como a suplementação com o Si inibiu a absorção de Pb pelas mudas

A espectroscopia de fluorescência de raios-X (XRF) é outro método de análise direta que se fundamenta da medição da intensidade da emissão de raios-X característicos dos elementos químicos presentes na amostra quando devidamente excitada por uma fonte (FILHO, 1999). YOUNG et al. (2016) avaliaram a viabilidade do uso da fluorescência de raios-X portátil (hXRF), miniaturização do XRF para avaliar a composição de amostras geológicas. Apesar da técnica não ser capaz de detectar elementos como Mg e Na, consegue detectar de forma confiável elementos como Si, Ca, Ti e K.

ENT et al. (2020) avaliaram a distribuição e o efeito do Si em relação ao Mn em amostras de plantas. A análise foi realizada com o emprego da técnica de micro espectroscopia de fluorescência de raios X (μ XRF) e foi possível concluir que o Si reduz a toxicidade do Mn através da sua interação com a parede celular.

2.3.4. Técnicas de plasma

O ICP OES utiliza atomizador desenvolvido por Reed (REED, 1961; REED, 1962) na década de 60 e empregada pela primeira vez por GREENFIELD et al. (1964). No entanto, este tipo de atomizador só se tornou disponível comercialmente na década de 70 e apresenta diversas vantagens quando comparada a técnicas de chama, tais como alta temperatura e conseqüentemente possibilidade de atomizar e excitar a maioria dos elementos, limite de detecção com magnitude superior, ser um meio inerte e apresentar menores interferências químicas e espectrais, entre outros (SKOOG et al., 2006; TYLER e YVON, 2003).

Um trabalho feito por HAUPTKORN et al. (2001) utilizou para o preparo de amostra digestão alcalina não oxidativa, com uma solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a determinação de Si presente em amostras de fígado de porco por ICP OES. As melhores condições do preparo de amostras foram

otimizadas e para avaliar a veracidade do método os resultados obtidos por ICP OES foram comparados com os resultados obtidos por espectrômetro de fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF), obtendo resultados muito próximos. Sendo assim esse método se apresentou adequado para a determinação de Si em materiais biológicos. No entanto para outros materiais se faz necessária a avaliação das melhores condições para a decomposição.

A determinação de Si também é feita por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado ICP-MS como abordado no trabalho realizado por AURELI et al. (2020) que determinaram Si e SiO₂ em amostras biológicas para estudo toxicocinético de um nanomaterial utilizado como aditivo alimentar. Para a análise do teor de Si foi utilizado DRC-ICP-MS, ICP-MS com cela dinâmica de reação. A estratégia se baseia na adição gases que reagem com os interferentes poliatômicos, tornando-as espécies não interferentes (BATISTA, 2009). Os resultados demonstraram que o fígado e o baço são os tecidos mais propícios a ocorrer deposição de Si devido aos seus altos teores presentes, com concentrações variando de 0,3 a 424 µg g⁻¹.

Levando em consideração a quantificação de Si em amostras complexas AMAIS et al. (2014) descreveram um procedimento para a determinação de P, S e Si em amostras de biodiesel, diesel e óleo lubrificante. Neste trabalho a determinação foi realizada por espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente com arranjo tandem (ICP-MS/MS), que se baseia na presença de um analisador quadrupolo adicional localizado posteriormente à célula de reação e colisão. Tal arranjo é utilizado para reduzir os sinais de fundo bem como melhorar a precisão (O'CONNOR e EVANS, 2007). Para a análise quantitativa de Si foram monitoradas as espécies ²⁸Si¹⁶O⁺ e ²⁹Si¹⁶O⁺ obtidas através da adição de O₂ na célula de reação obtendo recuperações entre 82,6% a 107% quando comparado com os valores certificados do material de referência certificado de óleo lubrificante (SRM 1848).

2.3.5. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)

Desde a década de 50 que plasmas induzidos por micro-ondas são utilizados como uma fonte de atomização e excitação. No entanto, os sistemas propostos inicialmente apresentavam baixa sensibilidade e dificuldades de utilização

de amostras líquidas, devido a baixa potência aplicada (200 - 300 W) e plasma em formato não toroidal. Outros projetos instrumentais minimizaram alguns desses efeitos, porém problemas como baixa temperatura do plasma e pequena interação entre o plasma e as amostras líquidas resultavam em elevados efeitos de matriz. Diversos projetos foram propostos, porém o modelo comercial que se apresentou mais adequado foi lançado em 2012 pela Agilent Technologies (4100 MP-AES), baseada na cavidade ressonante de Hammer, utilizando um magnetron como fonte de excitação que funciona com o gás N_2 (HAMMER, 2008, JANKOWSKI e RESZKE, 2011; WILLIAMS et al., 2019). Esta montagem proporcionou algumas vantagens, como tamanho menor, simplicidade e redução de custos.

O plasma é sustentado por N_2 , que pode ser facilmente separado do ar atmosférico através de um equipamento que faz a separação do N_2 das demais espécies presentes no ar, fornecido por um compressor de ar (GONÇALVES et al., 2016a). Na Figura 1 é possível observar os componentes principais do MIP OES. Inicialmente tem-se o sistema de introdução de amostra que se baseia (a) bomba peristáltica (b) nebulizador e (c) câmara de nebulização ciclônica. Com isso tem-se a tocha de quartzo (d) conectada a parte da inserção do N_2 o guia de ondas que cria campos eletromagnéticos para a formação de um plasma robusto e a radiação emitida pela amostra. Tendo em vista que a tocha é posicionada de forma vertical e a visão é axial, a radiação é direcionada através de um arranjo de espelhos para um monocromador sequencial Czerny-Turner (e) além de uma rede de difração com a faixa de comprimento de onda de 178 a 780 nm que separa os comprimentos de onda de interesse que são detectados por um (f) detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) (GONÇALVES et al., 2016).

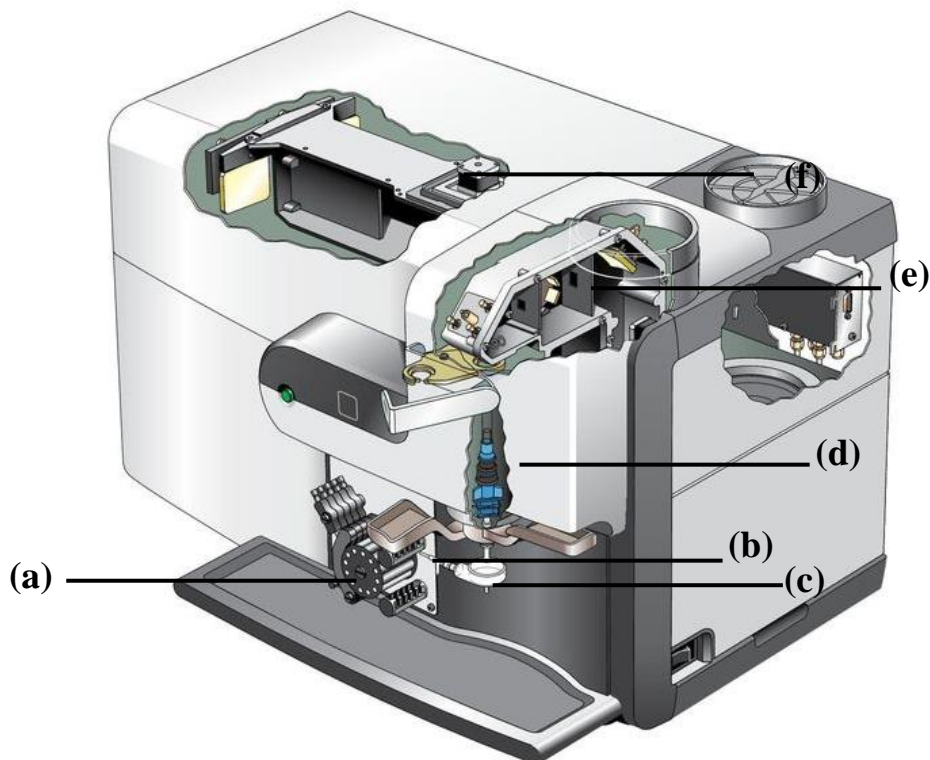


Figura 1. Principais componentes presentes no MIP OES

Fonte: Adaptado da Agilent Technologies (2015)

O MIP OES possui algumas vantagens como baixo custo operacional, determinação multielementar, fácil operação, não utiliza gases inflamáveis e o plasma de N_2 com temperatura aproximada de 5000 K sendo maior do que a temperatura do óxido nitroso utilizado no FAAS. Entretanto a temperatura do plasma de N_2 é menor do que a temperatura de um plasma de argônio usado no ICP OES, o que contribui no desequilíbrio no plasma devido aos produtos de prováveis reações e recombinações que podem ocorrer nesse ambiente. Além disso, amostras orgânicas favorecem a deposição de carbono na tocha bem como no sistema óptico. Alguns trabalhos (AMAIIS et al., 2013; DONATI et al., 2013) relatam o emprego de acessório chamado módulo de gás de controle externo (EGCM) que promove a introdução de ar no plasma e reduz o sinal de fundo, estabilizando o plasma quando se tem a introdução de amostras orgânicas.

Na Tabela 2 é apresentado um resumo de artigos publicados que empregam determinações por MIP OES.

Tabela 2. Levantamento bibliográfico de trabalhos recentes que utilizam MIP OES para determinação de elementos inorgânicos.

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Ano	Referência
Al, Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn, Ca, Mg, Na e K	Cerveja	Diluição em HNO ₃ (1,0 mol L ⁻¹)	2019	PIRES et al., 2019
Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, V e Zn	Lodo de tratamento de água potável	Dedo frio com sistema de refluxo semifechado 5 mL de HNO ₃ 1 mL de H ₂ SO ₄	2020	KLEEMANN et al., 2020
Ca, Cu, Mg, Mn, Fe, P, K e Zn	Pão	Dissolvido em uma mistura 3 mL de HNO ₃ (65% v v ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (35% m v ⁻¹)	2016	OZBEK e AKMAN, 2016
Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Pb e Zn	Solos	Protótipo de aquecimento por radiação infravermelho 2 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	2020	JOFRE et al., 2020
Cu, K, Mg, Mn, P e Zn	Sopas instantâneas	Micro-ondas 1 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹) 6 mL de H ₂ O ultrapura	2020	CARVALHO et al., 2020
As, Ba, Cd, Cr e Pb	Fertilizantes	Micro-ondas 6 mL de HNO ₃ (7 mol L ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	2018	MACHADO et al., 2018

Tabela 2. Levantamento bibliográfico de trabalhos recentes que utilizam MIP OES para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Ano	Referência
Al, B, Ca, Cu, Co, Cr, Fe, K, Mn, Mo, Mg, Na, Ni e Zn	Arroz	4 mL de HNO ₃ (14 mol L ⁻¹) Placa de aquecimento	2019	OZBEK et al., 2019
Mn	Vinho	Diluição em HNO ₃ (5% v v ⁻¹)	2019	JUNG et al., 2019
Al, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn	Café, chá verde, bebida energética, cerveja, whiskey e cachaça	Diluição em HNO ₃ (1% v v ⁻¹)	2016	GONÇALVES et al., 2016b
Ca, K, Mg, e Na	Biodiesel	Diluição em 5 mL de 1-propanol	2016	LOWERY et al., 2016
Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn	Xarope para tosse infantil, colírio e antisséptico bucal	Diluição em HNO ₃ (1% v v ⁻¹)	2017	ALTHOFF et al., 2017
As, Bi, Ge, Sb e Sn	Gesso, agrícola, fertilizantes minerais, fígado bovino e amostras de forrageiras	Micro-ondas 6 mL de HNO ₃ (7 mol L ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	2017	MACHADO et al., 2017

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

Para ao preparo de amostras foi utilizado um sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas em frasco fechado (Multiwave Go Plus, Anton Paar, Graz, Áustria) contendo rotor de 12 posições. Para a digestão de duas etapas foi utilizado outro sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas em frasco fechado (Ethos 1, Milestone, Sorisole, BG, Itália) equipado com tubos de perfluoroalcoxi alceno (PFA) e equipado com sensores de pressão e temperatura.

Para a determinação de flúor foi utilizada Cromatografia iônica com detecção condutimétrica (Compact IC Flex, Methrom, Suíça). As condições operacionais foram descritos na Tabela 3.

Tabela 3 . Condições operacionais aplicados no ED-XRF e μ ED-XRF.

Parâmetro Instrumental	ED-XRF	μED-XRF
Linha Si (keV)	K α = 1,74	K α = 1,74
Spot size	500	50
Corrente do tubo (μ A)	56	100
Voltagem do tubo (kV)	40	50
Detector	Si(Li) semiconductor	Si(Li) semiconductor
Raio-X	Rh	Rh
Região de aquisição (keV)	1,00 - 40	0 - 40

Para as determinações foi utilizado um MIP OES (4200 MP AES, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) equipado com um gerador de nitrogênio (Agilent Technologies, modelo 410) e uma bomba peristáltica de cinco canais. Os comprimentos de onda selecionados e as condições operacionais podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4. Condições operacionais para a determinação de Si por MIP OES.^a Para a análise da digestão alcalina com solução de NaOH

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Frequência do Micro-onda (MHz)	2450
Potência aplicada ao plasma (kW)	1,0
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,45
Posição de observação do plasma	10
Tempo de estabilização (s)	15
Nebulizador	One Neb (series 2)
Sistema de introdução de amostra	Câmara de spray ciclônico de vidro single-pass e tocha easy-fit (1,8 mm id) ^a Câmara de spray ciclônico single-pass (PTFE) e tocha easy-fit com injetor de cerâmica (1,8 mm id) ^b
Comprimento de onda (nm)	250.690 251.611

^b Para a análise da digestão do ácido HBF₄

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada, cuja resistividade é maior que 18,2 MΩ cm, a partir do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Todo material utilizado foi previamente lavado e desmineralizado em banho de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) por 24 h, com posterior lavagem com água deionizada e desmineralizada e secagem em capela de fluxo laminar.

Para a determinação de flúor pela cromatografia iônica foi utilizada uma coluna empacotada com álcool polivinílico com grupos de amônio quaternário (Metrosep A Supp 7-250/4,0). Já a fase móvel era composta por carbonato de sódio a 1 mmol L⁻¹ e bicarbonato de sódio a 3,6 mmol L⁻¹. O fluxo do eluente foi definido para 0,8 mL min⁻¹ a coluna foi mantida em um forno a 30 °C e o supressor foi regenerado com o uso de H₂SO₄ a 50 mmol L⁻¹.

Para a digestão das amostras foi empregado HBF₄ (48% m v⁻¹, Sigma-Aldrich, Suíça) e H₂O₂ (30% v v⁻¹, Sigma-Aldrich, Suíça). Para a determinação do ácido fluorsilícico foi utilizado etanol (Alphatec, São José dos Pinhais, Brasil) e cloreto de potássio (99% de pureza, Sigma-Aldrich, Suíça). A fase móvel usada na

cromatografia iônica foi preparada diluindo carbonato de sódio (64 mmol L^{-1}) e bicarbonato de sódio (20 mmol L^{-1}) em água. As soluções padrão de silício foram preparadas por diluição de solução estoque de 1000 mg L^{-1} (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça) e para as soluções padrão de flúor foi utilizado uma solução estoque de 10 mg L^{-1} (Sigma-Aldrich, Suíça).

3.3. Amostras

As amostras de sorgo biomassa analisadas nesse trabalho foram obtidas de experimentos conduzidos pelo programa de melhoramento de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil) no ano agrícola 2015/2016. As amostras se baseiam em seis genótipos experimentais, um híbrido de sorgo biomassa comercial, uma linhagem de sorgo sacarino como bagaço e dois híbridos de sorgo sacarino comercial.

A veracidade para a determinação de Si foi obtida a partir de análises em amostras de folhas de cana-de-açúcar previamente analisadas por $\mu\text{ED-XRF}$ e ICP OES (SANTOS et al., 2020).

3.4. Preparo das amostras

As amostras de sorgo foram coletadas a partir de seus colmos de forma manual e trituradas em um picador. Posteriormente o material foi seco em estufa de circulação de ar a 65°C até peso constante, depois foram moídas em um moinho de facas do tipo Willey na granulometria de 1mm. As amostras de folhas de cana-de-açúcar utilizadas para a avaliação da veracidade do método foram preparadas da mesma forma.

3.4.1. Procedimento de digestão com HBF_4

Inicialmente foi feita a otimização do volume mais adequado do ácido para a digestão das amostras. Foram realizados quatro experimentos variando os volumes de HBF_4 adicionado no processo de digestão das amostras de folhas de cana-de-açúcar, cujo teor de Si havia sido previamente determinado por $\mu\text{ED-XRF}$

As amostras foram digeridas em triplicata, por radiação micro-ondas com sistema fechado. Foi feita a otimização do volume de HBF_4 , sendo avaliados os volumes 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mL HBF_4 (48% m v⁻¹). Na otimização foram utilizados 0,1 g de amostra, com a adição de 3 mL de HNO_3 (14 mol L⁻¹), 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹) e 0,2-2,0 mL de HBF_4 . O programa de aquecimento empregou rampa inicial de 15 min até 180 °C, 25 min de patamar a 180 °C e 10 min de resfriamento. Após o resfriamento, os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno e avolumados para 50,0 mL com água deionizada.

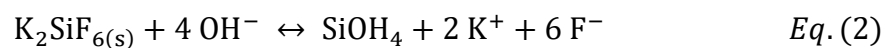
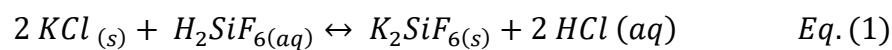
3.4.2. Procedimento de digestão ácida e alcalina

As amostras de folhas de cana de açúcar foram digeridos em triplicata, em forno assistido por radiação micro-ondas com sistema fechado com o emprego de digestão alcalina (BARROS et al., 2016). A digestão é feita em duas etapas. Inicialmente foram utilizados 0,1 g de amostra com a adição de 5 mL de HNO_3 (14 mol L⁻¹) e 5 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹). Após a digestão, os frascos foram resfriados e foi adicionado uma alíquota de 5 mL de NaOH (1,5 mol L⁻¹) aos frascos, seguindo então para uma etapa adicional de aquecimento. Na primeira etapa o programa de aquecimento foi executado em seis etapas: (1) 5 min para atingir 120 °C; (2) 5 min a 120 °C; (3) 5 min para atingir 160 °C; (4) 5 min a 160 °C; (5) 3 min para atingir 230 °C; e (6) 5 min a 230 °C. Na segunda etapa a digestão foi realizada com uma rampa de 15 min a 200 °C, patamar de 20 min a 200 °C e 10 min de resfriamento. Finalizada a digestão 750 µL de HNO_3 (14 mol L⁻¹) foram adicionados às soluções digeridas e o volume final ajustado para 50,0 mL com água deionizada.

3.4.3. Procedimento de avaliação dos produtos de reação

Em relação aos produtos de reação que ocorrem durante a digestão, óxido de silício é convertido a ácido fluorsilícico (H_2SiF_6). Para a quantificação deste composto por cromatografia iônica foi utilizada reação de precipitação com cloreto de potássio em meio de etanol precipitando na forma K_2SiF_6 (ACKER e HENßGE, 2007). Inicialmente, 40 mL de etanol foi empregado para dissolver aproximadamente 410 mg of KCl. A seguir foram adicionados 2,5 mL de solução digerida e 2,5 mL de água deionizada. A mistura foi resfriada e mantida a 4 – 8 °C por 2 h. Em seguida,

esse precipitado foi filtrado, lavado e solubilizado com água. Para que a solução atingisse o pH 9 foi adicionado NaOH para promover a reação do ânion SiF_6^{2-} . As reações envolvidas nesse processo estão descritas nas Equações 1 e 2 e os íons fluoreto em solução foram quantificados por cromatografia iônica .



Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do volume de ácido e precisão

Na Tabela 4 são apresentadas as recuperações obtidas para a otimização do volume ideal de ácido fluorbórico empregado na digestão de amostra de cana-de-açúcar. Recuperações variando de 98% a 101% em relação aos resultados obtidos previamente por μ ED-XRF (SANTOS et al., 2020). A partir desses resultados estabeleceu-se volume de 0,2 mL de HBF_4 para realizar as digestões das amostras de sorgo.

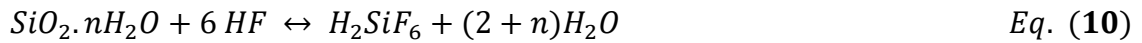
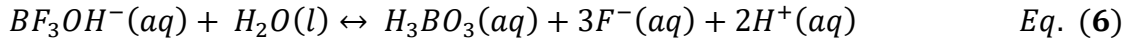
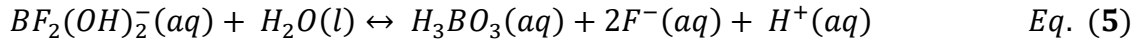
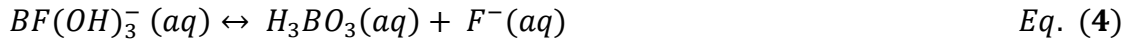
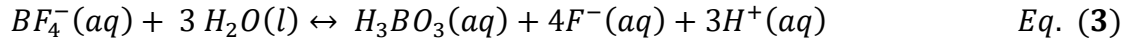
Tabela 5. Diferentes volumes de HBF_4 na determinação de Si por MIP OES (média \pm desvio padrão, n =3) em amostra de folhas de cana-de-açúcar e recuperações obtidas a partir da fração de massa de Si determinada por μ ED-XRF.

Volume de ácido HBF_4 (mL)	Si (g kg^{-1})	Recuperação (%) ^a
0,2	9,28 \pm 0,13	99
0,5	9,31 \pm 0,21	99
1,0	9,50 \pm 0,16	101
2,0	9,37 \pm 0,10	98

^a Calculado a partir do valor obtido por μ ED-XRF 9,4 g kg^{-1} Si (SANTOS et al., 2020).

4.2. Digestão ácida com HBF_4

A partir do que já foi descrito na literatura (RIETIG e ACKER, 2017; HALL et al., 2019; KATAGIRI et al., 2010) têm-se H_3BO_3 , $\text{BF}(\text{OH})_3^-$, $\text{BF}_2(\text{OH})_2^-$, BF_3OH^- , H_2F_2 , HF_2^- , HF, F^- como as principais espécies de boro e de flúor esperadas nas reações de dissociação do ácido HBF_4 . As principais reações são apresentadas nas Equações 3 a 10.



Considerando esses prováveis produtos de reação, a utilização do ácido tetrafluorbórico implica na preocupação da possível formação de HF, devido à periculosidade do ácido, além dos problemas relacionados ao ataque aos componentes de vidro ou quartzo nos equipamentos durante as determinações. Quando HF é empregado geralmente é adicionado ácido bórico para reagir com os fluoretos livres e convertê-lo em HBF₃OH (SUCHAROVÁ e SUCHARA, 2006). Neste contexto, as reações de equilíbrio envolvendo espécies contendo boro indicam a formação do ácido bórico (H₃BO₃). De acordo com KATAGIRI et al. (2010), em pH < 2 a formação dessa espécie é favorecida, sendo que a concentração de flúor também interfere nessa formação. Para a determinação do flúor nas soluções digeridas foi empregada a cromatografia iônica.

Para estimar a fração molar do ácido bórico na solução digerida a Equação 11 foi utilizada a partir da faixa de concentração de flúor obtida (0,1 a 0,2 mol L⁻¹). A concentração de H⁺ foi estimada a partir do volume de HNO₃ usado no preparo da amostra. A distribuição de H₃BO₃ na solução digerida é apresentada na Figura 2, construída a partir da fração molar bem como da faixa de concentração de flúor e da concentração de H⁺.

$$\alpha_{H_3BO_3} = \frac{[H_3BO_3]}{[B]_{total}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[F^-]}{k_{BF(OH)_3^-}}\right) + \left(\frac{[F^-]^2[H^+]}{k_{BF(OH)_2^-}}\right) + \left(\frac{[F^-]^3[H^+]^2}{k_{BF_3(OH)^-}}\right) + \left(\frac{[F^-]^4[H^+]^3}{k_{BF_4^-}}\right)} \quad Eq. (11)$$

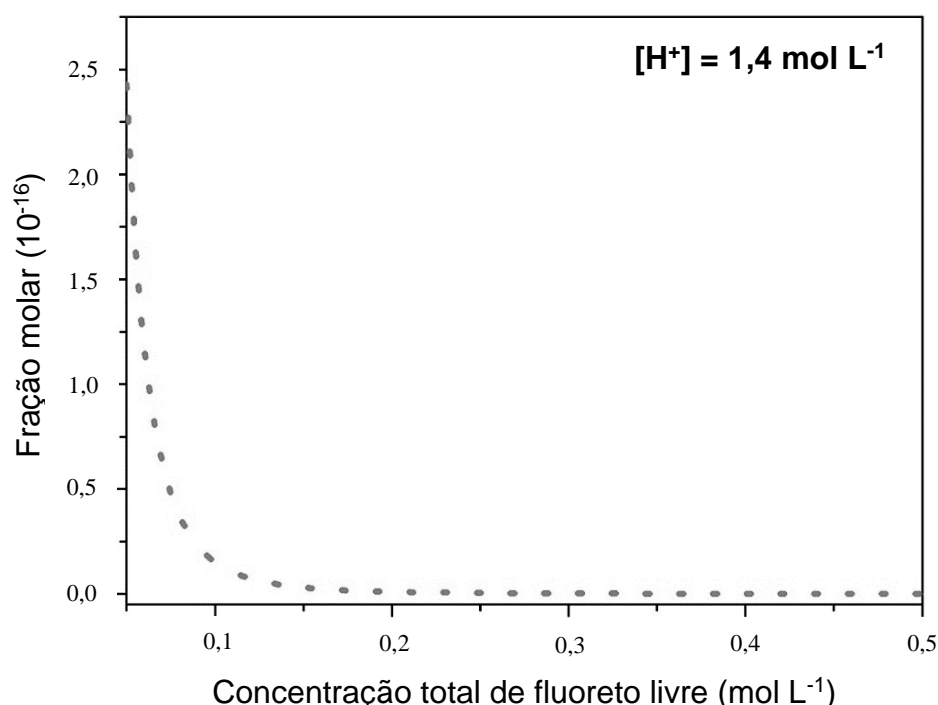


Figura 2. Estimativa da fração molar de H_3BO_3 nas soluções digeridas

Fonte: (SANTOS et al., 2020)

A partir da Eq. 8 o teor de fluoreto livre está relacionado à formação de HF. Com isso na Figura 2 é possível notar que quando a fração molar do H_3BO_3 é muito baixa (c.a. de 10^{-16}), a concentração total de fluoreto livre aumenta, conseqüentemente tem se a possibilidade da presença de HF nas soluções. Portanto, é necessário adotar estratégias para evitar danos aos componentes do instrumento bem como para controlar a contaminação do branco. Essas estratégias podem ser a adição de ácido bórico, o fator de diluição maior e/ou o uso de um sistema de introdução da amostra fabricado com componentes inertes, como de materiais poliméricos, os quais foram utilizados neste trabalho, com nebulizador, câmara de nebulização construída em material polimérico e tocha com sistema interno de injeção de amostra construída em cerâmica.

Levando em consideração as reações que ocorrem durante o processo de digestão, o dióxido de silício (SiO_2) é convertido em ácido fluorossilícico (H_2SiF_6), como pode ser observado na Eq. 10. Para quantificar esse composto na solução digerida é utilizada uma reação de precipitação formando a espécie K_2SiF_6 como descrita pelas Eqs. 1 e 2. Ao ser adicionado NaOH no meio para que a solução

atingisse pH 9 são produzidos ânions de flúor como descrito na Eq. 2, sendo esta a solução quantificada por cromatografia iônica (ACKER e HENßGE, 2007). Os resultados indicaram que aproximadamente 70% do Si inicial foram encontrados na forma H_2SiF_6 . De acordo com estudos relatados na literatura (MIZUHATA et al., 2009) a estabilidade termodinâmica máxima dos ânions SiF_6^{2-} são alcançados na faixa de pH de 2,6 a 2,7, portanto o Si pode estar presente em outras formas.

4.3. Digestão ácida seguida da digestão alcalina

Conforme descrito anteriormente na literatura a digestão ácida seguida da digestão alcalina se tornou uma alternativa adequada para a digestão de matrizes com alto teor de silício (NÓBREGA et al., 2006; BARROS et al., 2016). No entanto, utilizar esse procedimento pode acarretar problemas quando a técnica de detecção é o MIP OES. Isso ocorre em função da temperatura do plasma ser menor (5000 K) quando comparado com o do ICP OES (7000 K). Tendo em vista que a introdução de uma alta concentração de Na (aproximadamente 3% m v⁻¹), elemento facilmente ionizável, resulta em efeito de matriz e em mudanças das propriedades fundamentais do plasma como temperatura e densidade do número de elétrons.

Alguns estudos avaliaram a introdução de gases no plasma para melhorar a precisão em relação a análise de amostras complexas, podendo se tornar alternativa para evitar esses efeitos deletérios (AMAS et al., 2013).

Assim, a injeção de ar no plasma de nitrogênio foi aplicada, através de um módulo de controle de gás externo (EGCM), sendo o ar operado em um fluxo de 1 L min⁻¹. De acordo com ARAI et al. (2013) quando o oxigênio é adicionado a um plasma de nitrogênio, radicais de oxigênio são formados devido a múltiplas colisões entre as espécies de nitrogênio como N_2 e N_2^+ e com isso é alcançada uma atmosfera altamente oxidante no plasma. Além disso, essas reações contribuem para a redução da densidade de elétrons e o equilíbrio anteriormente afetado pela presença de uma matriz complexa é reestabelecida.

4.4. Limites de detecção

O valor de LOD foi calculado a partir da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC), calculado a partir da Equação 12, que pode ser definido como sendo a concentração do analito com intensidade equivalente a intensidade do sinal de fundo. É recomendado utilizar esse parâmetro principalmente para matrizes complexas e para espectrômetros de emissão óptica devido ao fato de possibilitar a visualização de qualquer mudança no espectro de fundo devido a alterações nas condições operacionais do instrumento em comparação ao LOD calculado da maneira convencional (OLIVEIRA, 2009; PEREIRA, 2010; PERKINELMER, 2017). Com isso foi obtido LOD de 0,03 g Kg⁻¹ e LOQ de 0,09 g kg⁻¹.

$$BEC = \frac{Int_{\text{branco}}}{Int_{\text{padrão}} - Int_{\text{branco}}} \cdot Conc_{\text{padrão}} \quad Eq. (12)$$

Onde Int_{branco} = Intensidade do branco analítico

$Int_{\text{padrão}}$ = Intensidade do padrão

$Conc_{\text{padrão}}$ = Concentração do padrão

No que diz respeito a análise direta de sólidos, os valores de LOD encontrados para Si durante a análise de amostras de plantas por XRF e por LIBS foram de 0,14 g kg⁻¹ e 0,16 g kg⁻¹, respectivamente, conforme relatado anteriormente (REIDINGER et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Desta maneira o método analítico desenvolvido, usando HBF₄ no preparo de amostras para a determinação de Si em amostras de plantas por MIP OES demonstrou ser adequado, pois melhora a sensibilidade quando comparada a análise direta e a digestão alcalina.

4.5. Análise das amostras

O procedimento proposto e a digestão alcalina foram aplicados em oito amostras de folhas de cana-de-açúcar e colmos de sorgo. Os resultados são apresentados na Tabela 5. Os resultados apresentaram-se estatisticamente semelhantes a nível de 95% a partir do emprego de teste *t* pareado.

Tabela 6. Fração de massa de Si (mg kg⁻¹) em amostras de folhas de cana-de-açúcar e colmos de sorgo determinados por MIP OES (média ± desvio padrão, n= 3).

Amostras	Digestão ácida HBF₄	Digestão alcalina*
Folhas de cana-de-açúcar	8,7 ± 0,5	8,3 ± 0,8
Folhas de cana-de-açúcar	6,1 ± 0,4	6,6 ± 0,8
Folhas de cana-de-açúcar	6,6 ± 0,2	6,8 ± 1,3
Colmo de sorgo	4,2 ± 0,1	4,7 ± 0,7
Colmo de sorgo	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Colmo de sorgo	4,8 ± 0,2	4,6 ± 0,1
Colmo de sorgo	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1
Colmo de sorgo	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2

*BARROS et al., 2016.

O procedimento proposto utilizando ácido fluorbórico foi aplicada a amostras de sorgo provenientes de Programa de melhoramento de sorgo. Inicialmente para a avaliação da veracidade do método foi determinado o teor de Si em três amostras distintas de folhas de cana-de-açúcar previamente analisadas por XRF e ICP OES (Tabelas 6 e 7). As recuperações calculadas a partir da comparação dos resultados do XRF e ICP OES com o MIP OES variaram de 86% a 103% e 88% a 111%, respectivamente. De acordo com INMETRO (2016) o critério de aceitação para a recuperação é de 80% - 120%, portanto o método apresenta-se adequado.

Tabela 7. Avaliação da veracidade do método em amostras de folhas de cana-de-açúcar determinados por MIP OES (média ± desvio padrão, n= 3) e recuperações obtidas a partir do teor de Si determinadas por ICP OES.

Amostras	Valor obtido por ICP OES (g kg⁻¹)	Valor obtido por MIP OES (g kg⁻¹)	Recuperação (%)
Folhas de cana-de-açúcar	6,3 ± 0,04	5,7 ± 0,4	90
Folhas de cana-de-açúcar	9,6 ± 0,02	8,2 ± 0,2	86
Folhas de cana-de-açúcar	6,8 ± 0,02	6,9 ± 0,1	103

Tabela 8. Avaliação da veracidade do método em amostras de folhas de cana-de-açúcar determinados por MIP OES (média ± desvio padrão, n= 3) e recuperações obtidas a partir do teor de Si determinadas por XRF.

Amostras	Valor obtido por XRF (g kg⁻¹)	Valor obtido por MIP OES (g kg⁻¹)	Recuperação (%)
Folhas de cana-de-açúcar	6,0 ± 0,02	5,7 ± 0,4	95
Folhas de cana-de-açúcar	9,4 ± 0,18	8,2 ± 0,2	88
Folhas de cana-de-açúcar	6,3 ± 0,02	6,9 ± 0,1	111

Os resultados obtidos para amostras de sorgo estão na Tabela 8 cuja equação da reta é $y = 2833,9x - 46,558$ apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999.

Tabela 9. Fração de massa de Si em amostras de colmos de sorgo determinados por MIP OES (média ± desvio padrão, n =3).

Amostras	Valor determinado (g kg⁻¹)
Colmo de sorgo	0,67 ± 0,04
Colmo de sorgo	4,03 ± 0,12
Colmo de sorgo	2,90 ± 0,11
Colmo de sorgo	4,57 ± 0,20
Colmo de sorgo	2,41 ± 0,16
Colmo de sorgo	3,07 ± 0,23
Colmo de sorgo	3,44 ± 0,10
Colmo de sorgo	3,25 ± 0,10
Colmo de sorgo	4,38 ± 0,17
Colmo de sorgo	3,89 ± 0,19
Colmo de sorgo	3,59 ± 0,15

Conclusões Parciais

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O procedimento de preparo de amostras utilizando o HBF_4 para a determinação de Si em amostras de plantas em MIP OES se mostrou adequado. Os resultados descritos em relação a digestão por HBF_4 em comparação com a digestão alcalina apresentaram alta correlação.

De acordo com as reações envolvidas no processo de digestão utilizando HBF_4 , a maior parte do Si solubilizado se encontra na forma de H_2SiF_6 . No entanto, outras espécies coexistiram na solução em menor quantidade. Além disso, considerando as condições de equilíbrio é formado HF no processo. Para evitar danos nos componentes de borossilicato e quartzo presentes no sistema de introdução da amostra é recomendada a adição de H_3BO_3 , alto fator de diluição e emprego de um sistema de introdução de amostra composto por componentes inertes, ou seja, os mesmos cuidados tomados quando do uso de HF permanecem inalterados, apesar da menor periculosidade em função dos menores volumes de ácido empregados.

**CAPÍTULO 2: Validação e determinação
de Y em amostras de ração e fezes de peixe
Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos de estudos voltados à aquicultura foram datados de meados da década de 50, mas só houve um maior desenvolvimento a partir de 1980, quando foram obtidos ganhos significativos tanto da produtividade quanto de qualidade, com custos menores. O Brasil possui a maior reserva de água doce do mundo, o que proporciona um grande potencial da produção aquícola (ANDRADE et al., 2019; STICKNEY, 2001; SIDONIO et al., 2010; SIQUEIRA, 2018). Com o aumento da oferta e da demanda de pescado no Brasil, devido a expansão da aquicultura o Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) se tornou uma das espécies mais importantes da piscicultura nacional, atingindo sua maior produção em 2014 com 139.632 toneladas (SIDRA, 2021; RODRIGUES, 2014). Trata-se de espécie originária do Brasil, típico da região Norte. Sua produção é majoritariamente nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, bem como em outros países tais como Colômbia, Peru e Bolívia (RODRIGUES, 2014; WOYNÁROVICH e ANROOY, 2019).

A nutrição através de uma alimentação balanceada é o principal fator para o aumento da produção e o cultivo intensivo de peixes. Atrelado a isso a alimentação representa cerca de 70% de todos os custos (WOYNÁROVICH e ANROOY, 2019; SILVA et al., 2003). A alimentação balanceada interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento dos peixes, bem como proporciona uma maior tolerância a doenças e o aumento do desempenho reprodutivo. Desta forma se faz necessário avaliar a eficiência da nutrição, a partir da digestibilidade de proteínas, lipídios, componentes energéticos e aminoácidos, os quais são normalmente estimados pelo coeficiente aparente. Os estudos de digestibilidade normalmente são realizados a partir da incorporação de um marcador inerte às dietas, sendo que até recentemente este marcador era o óxido de cromo (Cr_2O_3) (NETO et al., 2003). Entretanto devido a problemas ambientais novas alternativas foram requeridas e avaliadas, sendo o óxido de ítrio (Y_2O_3) uma boa opção principalmente por poder ser incorporado em baixas concentrações (DAVIES e GOUVEIA, 2006).

Considerando o que foi exposto, a quantificação dos teores das espécies inorgânicas se faz necessária. Para determinações utilizando técnicas espectroscópicas especificamente o MIP OES as amostras necessitam estar na forma líquida. Portanto, neste Capítulo o emprego de ácido diluído para a digestão

da dieta e fezes de peixes e determinação por MIP OES, incluindo outros nutrientes foi priorizado, sendo desenvolvido e validado procedimento para o preparo de amostras de rações e fezes de peixe Tambaqui para a determinação de Y usado em marcador dietético.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um procedimento de preparo de amostras de ração e fezes de peixe para a quantificação de Y em MIP OES e gerar informações relacionadas a constituintes inorgânicos nas fezes e nas diferentes dietas submetidas aos peixes Tambaqui visando avaliar a digestibilidade das mesmas.

1.1.2. Objetivos específicos

- i. Desenvolver e validar procedimento para o preparo e determinação de Y em amostras de ração e fezes de peixe por MIP OES;
- ii. Determinar os teores de Y em amostras de dietas e fezes de peixes;
- iii. Determinar constituintes inorgânicos (Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Zn e Cu) presentes nas fezes e dietas;
- iv. Contribuir para a minimização do uso de reagentes, empregando os princípios da Química Verde;
- v. Realizar análises de macro e micronutrientes nas amostras de ração e fezes de peixe.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Peixe Tambaqui no Brasil

O tambaqui (*Colossoma Macropomum*) pertence à classe *Actinopterygii*, ordem *Characiformes* e família *Characidae* e por ser onívoro se alimenta desde frutos e sementes até algas e moluscos, dos quais depende da disponibilidade dos mesmos nos rios (CARVALHO, 2007; RODRIGUES, 2014). Tem por habitat natural as bacias do rio Amazonas e rio Orinoco, sendo encontrado em regiões do Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (RODRIGUES, 2014; WOYNÁROVICH e ANROOY, 2019). Em meados da década de 70 houve o crescimento dos centros urbanos na região da Amazônia, o que levou o Tambaqui se tornar uma espécie popular para o consumo, substituindo outras espécies de peixes tal como o Pirarucu (*Arapaima Gigas*) (SIDONIO et al., 2010).

Por esse motivo essa espécie vem se tornando uma das principais na piscicultura brasileira principalmente devido à sua alta produtividade e bom crescimento. No entanto, por ser uma espécie de regiões quentes, a temperatura ideal das águas para a sua produção está entre 25° C a 30° C, pois águas cuja temperatura chega abaixo de 17° C favorecem sua mortalidade. Por isso, a maioria da produção de Tambaqui ocorre nas regiões norte e nordeste (FAO, 2020).

Atualmente tem-se um crescimento significativo da produção aquícola decorrente da alta demanda por pescado pela população, chegando a um consumo de 20,5 kg percapita/ano em 2018 (FAO, 2020). De acordo com SIDRA (2021) a produção do Tambaqui em 2019 foi de 101.079 toneladas, ficando atrás apenas da produção de tilápia, sendo considerada uma produção promissora principalmente devido a facilidade de adaptação de criação em cativeiro, desenvolvimento tecnológico através de novos estudos e conseqüentemente favorecendo a diminuição dos custos e redução de perdas e desperdícios (COSTA et al., 2020; FAO, 2020; ANDRADE et al., 2019).

2.2. Avaliação da digestibilidade dos peixes

Tendo em vista que a piscicultura é um setor importante para a economia brasileira, avaliar e aumentar a produção são os principais pontos de interesse. A alimentação é um dos fatores mais importantes em relação a produção,

pois proporciona o desenvolvimento, crescimento, maior tolerância às doenças e aumento do desempenho reprodutivo (SALMAN et al., 2010). Tendo isso em vista se faz necessário avaliar a qualidade do alimento, sendo que avaliação do coeficiente de digestibilidade é uma das técnicas empregadas (CHOUBERT et al., 1979; FILHO, 2005; SALMAN et al., 2010).

A digestibilidade do alimento pode ser entendida como a capacidade do animal de aproveitar os seus nutrientes sendo, portanto, uma característica do alimento. Porém esta pode variar de acordo com o alimento e também pelo animal (VAN SOEST et al., 1991; CHOUBERT et al., 1979; SILVA e ANDERSON, 1998). Uma das técnicas de medida é a digestibilidade aparente, visto que não considera as perdas endógenas do próprio animal e pode ser medida de duas formas: direta e indireta (SALMAN et al., 2010; LOVELL, 1998).

A forma direta se baseia no alojamento dos animais em gaiolas metabólicas em que todo o alimento digerido e fezes excretadas são controlados. No entanto esse método apresenta algumas desvantagens como ser oneroso, afetar no comportamento dos animais consequentemente na redução do consumo do alimento e incompleta recuperação das fezes (BERCHIELLI et al., 2000; LE DU e PENNING, 1982). Além disso, se tratando da avaliação da digestibilidade de peixes, utilizar esse método é inviável, devido a impossibilidade do controle total, pois o mesmo vive no meio aquático. Desta forma o método indireto é normalmente empregado. Este se baseia no uso de marcadores, os quais podem ser, referentes àqueles que ocorrem naturalmente no alimento e externos, que são adicionados aos alimentos (NRC, 1993; SALMAN et al., 2010).

2.2.1 Indicadores internos e externos

O indicador utilizado no método indireto se fundamenta na medida que o alimento transita pelo trato gastrintestinal do animal. O indicador tem a sua concentração aumentada de forma progressiva, indicando a remoção de constituintes dos alimentos que são digeridos e absorvidos. Portanto a digestibilidade aparente pode ser calculada a partir das concentrações do indicador no alimento e nas fezes visto que o aumento da concentração é proporcional a digestibilidade (ASTIGARRA, 1997; MORAES, 2007). O método indireto apresenta algumas vantagens como ser simples, ser bastante conveniente e adaptável para diversos animais (SALMAN et al., 2010; OETTING, 2002).

Exemplos de marcadores internos amplamente utilizados são a lignina, sílica, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) os quais estão presentes principalmente em dietas proporcionadas a ruminantes (VAN SOEST et al., 2020; SERRAPICA et al., 2019; EL OTMANI, et al., 2019; GOKTEPE e SELCUK, 2017), equinos (MOSS, 2012; ARAÚJO et al., 2018; GHAJAR et al., 2020) e ovinos (BARBOSA, 2012; FILHO et al., 2017; PEPETA, 2019). De acordo com o trabalho realizado por JUNIOR VIDAL et al. (2004) o uso de indicadores internos e externos para avaliar dietas com farelo de fubá de milho e farelo de soja para peixes da espécie Tambaqui indicou baixas recuperações para o uso de indicador interno, no caso a fibra bruta, quando comparadas aos resultados obtidos pelo indicador externo. Isso se deve a possível degradação microbiana da fibra bruta no intestino grosso para peixes que possuem um tubo digestivo longo como o tambaqui e tilápia (LANNA et al., 2004). Desta forma para avaliar a digestibilidade aparente de dietas propostas para alevinos em sua maioria é utilizado indicador externo.

Os indicadores externos são substâncias que podem ser adicionadas à dieta ou podem ser ministradas por via oral aos animais. Além disso, os marcadores externos necessitam atender a certos parâmetros como: ser inerte, ser indigestível e inabsorvível, atóxico, não influenciar ou ser influenciado por secreções intestinais (SALMAN et al., 2010). O óxido crômico é o marcador mais amplamente utilizado em ensaios de digestibilidade, no entanto alguns estudos discutem o seu uso devido ao fato de não ser totalmente recuperado nas fezes, poder afetar o metabolismo dos animais bem como ser ambientalmente tóxico (LIED et al., 1982). Desta forma novos indicadores vêm sendo estudados e aplicados como óxido de itérbio (NUR et al., 2018; WADE et al., 2018), óxido de lantânio (HILLESTAD et al., 1999), dióxido de titânio (PERES et al., 2019; FAVERO et al., 2014) e óxido de ítrio (WADE et al., 2018; MAAS et al., 2018).

Em relação aos peixes, trabalhos recentes demonstram que em sua maioria o óxido de ítrio é o marcador externo mais utilizado como alternativa para o óxido crômico. Isso se deve por algumas vantagens quando comparado ao uso do óxido crômico tais como menor concentração a ser adicionado, não afetar o metabolismo dos peixes e apresentar resultados de digestibilidade equivalentes entre eles (DAVIES e GOUVEIA, 2006; AUSTRENG et al., 2000). Um estudo desenvolvido por LEE et al. (2020) avaliou a suplementação de protease em diferentes dietas proporcionadas a trutas arco-íris utilizando 0,1% de óxido de ítrio

como marcador inerte. Com isso o estudo demonstrou que a suplementação melhora de forma variável entre os ingredientes, mas a digestibilidade aparente para o farelo de soja teve uma melhora significativa tanto em relação a matéria seca quanto para todos os aminoácidos estudados.

O trabalho feito por JACOBSEN et al. (2018) avaliou diferentes formas de adição de um complexo enzimático contendo fitase, protease, xilanase e celulase, juntamente com farelo de soja utilizando o óxido de ítrio como marcador e foi possível notar que a adição do complexo antes da extrusão do alimento apresenta um efeito benéfico em relação a qualidade da alimentação como melhorar a digestibilidade do Fe e possibilitar uma maior energia para o Salmão do Atlântico. Outro estudo feito por AAS et al. (2020) avaliou dois alimentos com propriedades físicas diferentes fornecidos a peixes Salmão do Atlântico, cujo objetivo era avaliar a taxa de passagem no sistema gastrointestinal e a digestibilidade aparente para lipídios, matéria seca, nitrogênio, energia, fosforo e zinco utilizando três indicadores dos quais são os óxidos de ítrio, itérbio e lantânio em diferentes avaliações. Com isso foi possível concluir que apesar de não haver diferença no consumo da ração, houve uma diferença significativa nas taxas de passagem na amostragem realizadas entre 8 e 16 horas após a alimentação, mas para amostragens de 24, 32, 40 e 48 horas não houve diferenças. Além disso, foi possível notar que os três marcadores apresentaram resultados similares entre si.

2.3. Função e determinação dos nutrientes inorgânicos

Muitos aspectos sobre a presença e o requisito de alguns compostos inorgânicos em peixes ainda não foram descritos, no entanto a ingestão e assimilação deles são obrigatórias para o desempenho do animal (MORAES e ALMEIDA, 2020). Os nutrientes inorgânicos são classificados como macroelementos do qual é requerido uma concentração maior pelo organismo e os microelementos que é requerido em menor teor (TÜRKMEN et al., 2009). O excesso ou a falta destes afetam o desempenho do organismo do animal, dentre estes serão discutidas as funções metabólicas de alguns macronutrientes como o Ca, P, Mg, K e Fe e micronutrientes como o Mn, Zn e Cu.

O Ca pode ser absorvido tanto pelo meio aquático quanto pelo intestino através da presença da vitamina D3 fornecida pela dieta. Com isso a função metabólica principal do cálcio é o desenvolvimento e crescimento das

estruturas esqueléticas, coagulação do sangue, regulação das secreções hormonais e contração muscular (MORAES e ALMEIDA, 2020). O excesso de cálcio de acordo com WILSON e GROSELL (2003) é precipitado na forma de CaCO_3 e excretado a fim de proteger os rins, porém a excreção excessiva pode formar cálculos renais. A falta de cálcio pode causar anorexia, reduz o crescimento e reduz a eficiência alimentar.

O P favorece principalmente na formação dos ossos, está presente na molécula ATP e auxilia nos fluidos tampões do organismo. Desta forma a sua falta implica em distúrbios do metabolismo como deformidade esquelética, desmineralização óssea além de reduzir o crescimento e a eficiência alimentar (ROCHA, 2016; SUGIURA et al., 2004). De acordo com QUINTERO-PINTO et al. (2011) Ca e P são considerados juntos e a sua relação no organismo é de suma importância, pois são os maiores constituintes dos ossos, além de participarem de diferentes processos fisiológicos dos peixes. Desta forma existe uma preocupação sobre o teor de Ca/P disponíveis na alimentação dos peixes, como descrito no trabalho realizado por MIRANDA et al. (2000) que avaliaram a relação de Ca/P em rações fornecidas a Tilápias do Nilo. Os autores concluíram que a suplementação de Ca e P na ração favorece de forma significativa o desempenho do organismo animal, bem como tem papel importante na manutenção da homeostase óssea, ou seja, da remodelação óssea dos peixes.

Já o K desempenha a manutenção celular, geração de impulsos nervosos além do balanço iônico dos fluidos do organismo (SANTOS, 2007; LIANG et al., 2012). Já a falta do mesmo acarreta anorexia, reduz o crescimento além de causar aumento da mortalidade (LIANG et al., 2012; TACON, 1992). De acordo com ZHU et al. (2006) em água doce o K está em menor concentração, desta forma o objetivo deste trabalho era avaliar a suplementação de K em três diferentes concentrações e a adição de sais de potássio em um mar artificial com salinidade em 30%. O resultado demonstrou que a adição de potássio nas águas é suficiente para suprir as necessidades de K do organismo e, portanto a suplementação é de pouca necessidade.

O ferro por sua vez tem papel fundamental no transporte de oxigênio, respiração celular e oxidação de lipídios (SANTOS, 2007; FENG et al., 2019). De modo geral a falta de Fe implica na redução do crescimento, reduz a eficiência alimentar além de proporcionar anorexia, convulsões e morte (FENG et al., 2019). O magnésio por sua vez desempenha um papel importante também na

formação dos ossos, metabolismo celular e no sistema enzimático (BIJVELDS et al., 1998; SANTOS, 2007). A sua falta contribui na redução do conteúdo ósseo e conseqüentemente crescimento além de promover anorexia, convulsões e catarata (TACON, 1992).

Manganês está envolvido em vários processos bioquímicos como ser um constituinte da arginase do qual é uma importante enzima para o processo de desintoxicação (LORENTZEN et al., 1996). Já a falta dele implica no crescimento reduzido, redução do apetite, malformação da nadadeira e mortalidade (LORENTZEN et al., 1996; TACON, 1992). Já o Zn está presente na insulina além de estimular a formação óssea e mineralização (NGUYEN et al., 2008; TACON, 1992). De acordo com SATOH et al. (1983) a deficiência de Zn reduz o crescimento, reduz o apetite, reduz a cicatrização de feridas e alta mortalidade. No entanto o Zn bem como o Cu são avaliados tanto nas dietas quanto nos tecidos dos peixes por poder se tornar tóxico em altas concentrações. Segundo ZAFARZADEH et al. (2017) ao avaliar concentrações de Zn, Cu, Pb e Cd em tecidos de peixes carpa-comum observaram altas concentrações principalmente para o Zn, Cu e Pb. Entretanto o Cu tem a principal função metabólica no sistema enzimático e a sua deficiência reduz o crescimento e pode proporcionar catarata (SANTOS, 2007; TACON, 1992).

2.4. Procedimento de preparo de amostras

2.4.1. Emprego de ácido diluído

Durante o século XIX foram desenvolvidos diversos métodos de decomposição de amostras sólidas a partir de agentes oxidantes e normalmente eram utilizadas grandes quantidades de reagentes. No entanto, recentemente os métodos de decomposição estão gradualmente sendo modificados e uma das tendências mais significantes é a busca e utilização de procedimentos ambientalmente amigáveis (MESKO et al., 2011; BARBOSA et al, 2015). A possibilidade destas mudanças está diretamente atrelada aos avanços tecnológicos da instrumentação utilizada para decomposição, pois permite alcançar elevadas temperaturas e pressão de forma segura (KRUG e ROCHA, 2019).

Por diversas vezes tem-se a necessidade de se utilizar ácidos concentrados, porém a sua utilização implica em um maior consumo de reagentes e grandes volumes de resíduos ácidos. Como alternativa tem-se a utilização de HNO₃

diluído que vem sendo bastante utilizado. Apesar do menor poder oxidante, possui boa eficiência de decomposição (ARAUJO et al., 2002; KUBRAKOVA et al., 1999).

A eficiência da decomposição com a utilização de soluções diluídas de HNO_3 pode ser explicada pela sua regeneração devido a combinação das espécies de óxido de nitrogênio com o oxigênio presentes no interior do frasco de reação (KRUG e ROCHA, 2019). Desta forma a presença de O_2 na atmosfera interna do frasco é imprescindível para que ocorra a regeneração do ácido, e a partir disso pode ser utilizado H_2O_2 como reagente auxiliar no qual atua como fonte de oxigênio além de melhorar a eficiência de decomposição, pois o mesmo atua como um oxidante da matéria orgânica (KRUG e ROCHA, 2019).

O trabalho feito por BIZZI e colaboradores (2012) teve por objetivo investigar a possibilidade da adição de O_2 e H_2O_2 como reagentes auxiliares de decomposição utilizando HNO_3 diluído para decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas. Os resultados demonstraram que tanto a adição de O_2 quanto a adição de H_2O_2 possibilitaram a mesma eficiência quando comparado com a decomposição usando ácido concentrado. Além disso, o emprego do aquecimento assistido por radiação micro-ondas exerce um efeito cinético sobre a regeneração do ácido dentro do frasco.

Na Tabela 9 estão resumidos alguns trabalhos que empregam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado e ácido diluído no desenvolvimento de métodos para a determinação de elementos inorgânicos em diferentes amostras.

Tabela 10. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ácido diluído no preparo de amostras com digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado para determinação de elementos inorgânicos.

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Ano	Referência
As, Cd e Pb	Erva mate	Estudo das concentrações 6 mL de HNO ₃ (2, 4 e 7 mol L ⁻¹)	ICP-MS	2018	PARDINHO et al., 2018
Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo e Ni	Arroz	5 mL de HNO ₃ (1,0 mol L ⁻¹) 2,5 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2020	SILVA, et al., 2020
Ba, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn	Biodiesel	Mistura: 7 mol L ⁻¹ de HNO ₃ 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	SF-ICP-MS	2017	BARELA, et al., 2017
As, Cd, Cr, Cu, Pb, Fe e Zn	Sedimentos de água doce	10 mL de HNO ₃ (5 mol L ⁻¹)	ICP OES	2019	MOKOENA et al., 2019
B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Zn	Arroz	7 mL de HNO ₃ (4,5 mol L ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	2016	TARANTINO et al., 2016
Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Ba	Leite comercial e produtos à base de leite	1 mL de HNO ₃ (65% v v ⁻¹) 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2018	BAKIRCIOGLU et al., 2018
Zn, P, Cd, Pb, Fe, Mn, Mg, Cu, Ca, Al, Na e K	Farinha de trigo, pão integral, dieta total e leite em pó	5 mL de HNO ₃ (65% v v ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES	2019	MULLAPUDI et al., 2019

Tabela 10. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ácido diluído no preparo de amostras com digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Analitos	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Ano	Referência
Zn, Al, As, Cd, Pb, Sn, Cr e Hg	Cacau em pó e chocolate	3 mL de HNO ₃ (65% v v ⁻¹) 5 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP-MS	2018	LO DICO et al., 2018
Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Se e Zn	Mel, farinha de trigo, demilho, de mandioca e de batata	8 mL de H ₂ O ₂ (50% m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	2017	MULLER et al., 2017
As, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Ni, Pb, Se, V e Zn	Chás de ervas	6 mL de HNO ₃ (7 mol L ⁻¹) 2 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP-MS	2019	KILIC e SOYLAK, 2019
B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Mn	Leite em pó	8 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	2016	MULLER et al., 2016
K, Ca, Mg, S, P, Cu, Fe, Mn e Zn	Guaraná	1 mL de HNO ₃ (9 mol L ⁻¹) 3 mL de H ₂ O ₂ (30% m v ⁻¹) 6 mL de H ₂ O	ICP OES	2019	SANTOS et al., 2019

2.5. Validação

A validação é um processo que tem por objetivo confirmar que o método é adequado e abrangente para o uso pretendido (INMETRO, 2016). Segundo a norma ABNT NBR ISO:IEC 17025 a validação é definida como “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. Desta forma são avaliados alguns parâmetros de desempenho dos quais são a seletividade, limites de detecção e de quantificação, precisão, veracidade, linearidade e faixa de trabalho.

2.5.1. Seletividade

O analito de interesse não está completamente isolado da matriz da amostra e existem outros elementos que podem agir como interferentes na medida do sinal analítico. Desta forma, a seletividade pode ser entendida como sendo a capacidade do método de medir o analito ou analitos mesmo na presença de possíveis interferentes presentes na matriz (INMETRO, 2016; MAPA, 2011).

Para avaliar a seletividade em uma análise quantitativa existem algumas estratégias que podem ser adotadas. Uma forma de avaliar esse parâmetro de desempenho é através do estudo de efeito de matriz, o qual se baseia no preparo de duas curvas analíticas em que uma deve ser preparada com a presença da matriz e adição do analito e outra curva sem a presença da matriz com adição do analito. A partir da medição deve-se comparar de forma estatística os resultados obtidos com os testes *t* e *F* (Snedecor) (INMETRO, 2016).

2.5.2. Linearidade e Faixa de trabalho

A linearidade de acordo com EMEA (1995) é a habilidade do método analítico dentro de uma faixa em obter resultados dos quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

A faixa de trabalho de um método por sua vez é o intervalo entre a menor concentração a maior concentração obtida do analito na amostra do qual foi demonstrado adequadas linearidade, veracidade e precisão (INMETRO, 2016). Já a

faixa linear de trabalho é a faixa de concentração do analito é proporcional a resposta do equipamento. Além disso, a sensibilidade do método é representada pela inclinação da curva e demonstra o grau de variação na intensidade através da variação das concentrações analisadas.

A curva de calibração analítica normalmente pode ser obtida pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), no entanto isso depende da homocedasticidade do qual pode se entendido como a variância constante dos erros experimentais. Com isso a curva pode ser descrita conforme a equação **13**.

$$y = ax + b \quad \text{Eq. (13)}$$

Onde: y é o sinal do instrumento

a é o coeficiente linear

x é a concentração dos padrões utilizados

b é o coeficiente angular da reta

Tais parâmetros relacionados à linearidade podem ser vistos na Figura 3 abaixo:

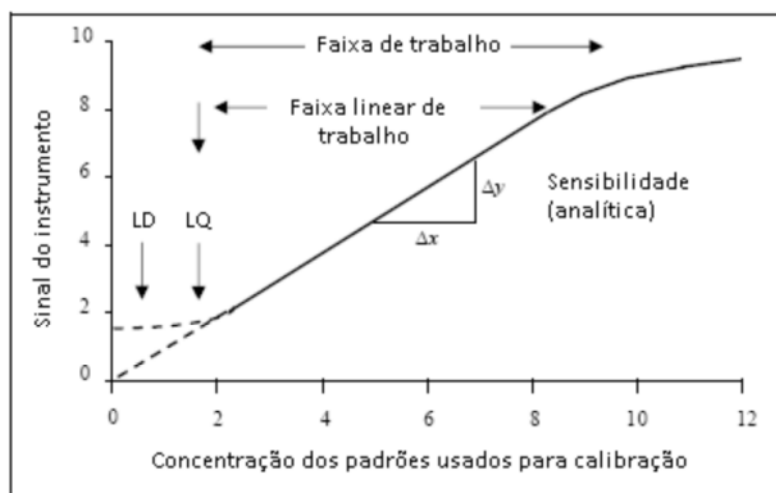


Figura 3. Representação de uma curva analítica típica e seus componentes

Fonte: (INMETRO, 2016)

2.5.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) de um procedimento analítico de acordo com (EMEA, 1995) é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Desta forma o limite de quantificação (LOQ) pode ser definido como a menor concentração quantificada com precisão e veracidade adequadas. O LOD e LOQ podem ser calculados de diferentes formas e uma dessas e normalmente utilizada é o método simples que estão descritos nas equações **14** e **15**:

$$LOD = 3,3 s/b \quad Eq. (14)$$

$$LOQ = 10 s/b \quad Eq. (15)$$

Onde: s é o desvio padrão da resposta do branco

b é o coeficiente angular da reta

2.5.4. Veracidade

A veracidade pode ser entendida como sendo um parâmetro que demonstra um grau de concordância entre um valor medido, ou seja, o resultado experimental e o valor tido como referencia da medida (INMETRO, 2016; MAPA, 2011). Tendo isso em vista a veracidade não é uma grandeza mensurável, então normalmente é estudado através de cálculos de recuperação (INMETRO, 2016). Para avaliar esse parâmetro é possível utilizar alguns processos dos quais são: uso de materiais de referencia certificados (MRC), comparação dos resultados interlaboratoriais, realização de ensaios de recuperação entre outros. A escolha do processo a ser utilizado está diretamente relacionado a disponibilidade e adequação do mesmo com o método.

A recuperação analítica pode ser obtida pela equação **16**. Os critérios de aceitação para a recuperação estão relacionados à faixa de concentração do analito ou analitos presentes na amostra (MAPA, 2011).

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad Eq. (16)$$

Onde: C_1 : concentração do analito na amostra fortificada.

C_2 : concentração do analito na amostra não fortificada.

C_3 : concentração do analito adicionado à amostra fortificada

2.5.5. Precisão

A precisão bem como a veracidade não é um parâmetro mensurado e se fundamenta de quão próximos os resultados obtidos pelas medidas repetidas se encontram. Normalmente são utilizadas três maneiras de avaliar a precisão, repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Além disso estas são expressas através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), para quantificar e avaliar a precisão, e pode ser obtido pela equação 17.

$$DPR = CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad Eq.(17)$$

Onde: s é o desvio padrão das medidas

\bar{X} é a média das medidas realizadas

A repetibilidade se baseia na medição em um conjunto de condições dos quais são o mesmo procedimento de medição, mesmo analista e mesmos equipamentos só que em curto período de tempo (INMETRO, 2016). É recomendado analisar um conjunto de amostras com no mínimo três níveis (baixa, média e alta) de concentração com no mínimo seis réplicas em cada nível, isso é devido a dificuldade de se estimar um desvio padrão confiável obtendo poucas repetições (MAPA, 2011). Os critérios de aceitação para a repetibilidade e precisão intermediária estão atrelados a concentração do analito ou analitos.

A precisão intermediária por sua vez assim como na repetibilidade avalia as medições em um conjunto de condições, porém outros parâmetros são avaliados como dias diferentes de análise, analistas diferentes ou equipamentos diferentes. De modo geral a precisão intermediária e repetibilidade expressam a variação do método no mesmo laboratório já a reprodutibilidade avalia a variação dos resultados de modo interlaboratorial. Neste caso em laboratórios distintos o

método é aplicado e os resultados são comparados também em termos do DPR (EMEA, 1995).

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

Para o preparo de amostras foi utilizado um sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas em frasco fechado (Multiwave Go Plus, Anton Paar, Graz, Áustria) contendo rotor de 12 posições.

As determinações dos macronutrientes (Ca, P, Mg, K e Fe) e micronutrientes (Cu, Mn e Zn) foram realizadas por espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, MIP OES (4200 MP AES, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) equipado com um gerador de nitrogênio N₂ (Agilent Technologies, modelo 410) e uma bomba peristáltica de cinco canais. Os comprimentos de onda selecionados e as condições operacionais podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 11. Condições operacionais para a determinação de Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Y por MIP OES.

Parâmetros instrumental	Condição operacional
Frequência micro-ondas (MHz)	2450
Potência aplicada ao plasma (kW)	1,0
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,55 (para Ca, Mg, P, Fe e Zn) 0,75 (para K, Cu, Mn e Y)
Posição de observação do plasma	10 (para Ca, Mg, K, Fe, Mn e Y) -10 (para P, Cu e Zn)
Tempo de estabilização (s)	15
Correção de fundo	Auto
Tempo de leitura (s)	3
Nebulizador	One Neb
Analitos	Comprimento de onda (nm)
Ca	396,847
Mg	279,553
K	769,897
P	214,915
Fe	371,993
Cu	327,395
Mn	403,307
Zn	481,053
Y	371,029

3.2. Reagentes e soluções padrão

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida através do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Todo o material utilizado foi previamente lavado e desmineralizado em banho de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) por 24 h, com posterior lavagem com água deionizada e desmineralizada e secagem em capela de fluxo laminar.

Para a digestão das amostras foi empregado HNO₃ (Synth, Diadema, SP, Brasil) previamente purificado em um sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição, modelo BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha) e H₂O₂ 30% (m m⁻¹) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha). As soluções utilizadas para a construção das curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir da diluição de soluções padrão comerciais de 1000 mg L⁻¹ de Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Y. Para os processos de validação do método foi utilizado o padrão comercial para o Y ao invés do óxido de ítrio, pois de acordo com WEAST (1978) em ácido diluído o óxido ítrio se solubiliza, tendo em vista que no preparo de amostra é utilizado ácido nítrico diluído então a forma majoritária do Y presente na solução digerida é dissociada.

3.3. Amostras

As amostras analisadas nesse trabalho fazem parte de um projeto de pesquisa da Embrapa Pesca e Aquicultura localizado em Palmas, TO voltado a determinar a digestibilidade aparente de ingredientes e dietas avaliando a sua correlação metabólica para o tambaqui, sob a coordenação da pesquisadora Ana Paula Oeda Rodrigues.

Inicialmente foi preparada uma dieta referência contendo proteína bruta e energia bruta e a partir desta foram feitas dietas experimentais com 69,9% da dieta referência mais 30% do ingrediente teste dos quais são farelo de soja, concentrado proteico de soja, glúten de milho 22%, glúten de milho 60%, farinha de resíduo de pescado, farinha de vísceras de frango, farinha de penas hidrolisada, farinha de carne e ossos, farinha de sangue, milho, milheto, farelo de arroz integral, sorgo e farelo de trigo juntamente com 0,1% de óxido de ítrio.

Foram usados cerca de 400 alevinos de tambaqui com peso aproximado de 50 g dos quais foram distribuídos em 10 tanques cilíndricos-conicos de 200 L em sistema contínuo de circulação de água. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até saciedade aparente, em que os mesmos foram adaptados às rações experimentais por 15 dias. Passado esse período de adaptação as fezes foram coletadas duas vezes ao dia em tubos plásticos de 50 mL acoplados na parte inferior dos tanques, em intervalos de tempo de 30 min durante 3 h.

As amostras de fezes foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente liofilizadas seguido da moagem. Já as amostras dos ingredientes e dietas foram secas e moídas em moinho tipo Willey, com peneira de 2 mm.

Materiais de referência certificados (CRMs) de folhas de macieira (SRM 1515) e folhas de tomateiro (SRM 1573a) foram utilizados para avaliar a veracidade do método de preparo para as amostras de ração e fezes de peixe

3.4. Preparo de amostras

3.4.1. Procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas

As amostras de ração e de fezes de peixe, bem como os materiais de referência certificados foram digeridos em triplicata, em forno assistido por radiação micro-ondas com sistema fechado. Foram utilizados 120 mg de amostra, com a adição de 6,0 mL de HNO_3 a $7,0\text{ mol L}^{-1}$ e 2,0 mL de H_2O_2 30% (m m^{-1}). O uso do ácido diluído foi empregado como modificação do protocolo originalmente estabelecido para validação de método para digestão assistida por micro-ondas (EDGEELL, 1989). O seguinte programa de aquecimento foi aplicado: rampa de 10 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, um patamar de 10 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ posteriormente uma rampa de 10 min a $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e patamar de 10 min a $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 10 min de resfriamento Após o término das digestões, os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno e avolumados para 30 mL com água deionizada.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação do método

4.1.1. Limite de detecção e de quantificação

Todo o processo de validação e cálculos apresentados seguiram documento orientador de validação do INMETRO (2016). Desta forma para o cálculo de LOD e LOQ através do método simplificado seguem as equações 14 e 15 apresentadas no item 2.5.3, levando em consideração a resposta de 12 brancos. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 12. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a determinação de Y por MIP OES.

	Y
	48,7
	79,84
	62,94
	25,09
	52,43
	70,15
	63,15
	78,37
	48,93
	26,99
	58,16
	38,29
Média (mg L⁻¹)	54,42
S (mg L⁻¹)	18,01
LOD (mg kg⁻¹)	0,66
LOQ (mg kg⁻¹)	1,99

4.1.2. Linearidade

A linearidade pode ser definida como sendo a capacidade do método de gerar resultados que são linearmente proporcionais a concentração do analito (BRITO et al., 2003). Com isso, a linearidade pode ser avaliada através do coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r^2). Essa avaliação deve ser feita com no mínimo 5 níveis de concentrações distintas, para este trabalho foram utilizadas 6 níveis de concentrações.

Na Tabela 12 são apresentados os dados para a avaliação da linearidade do Y, a equação da reta obtida a partir dos dados além dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

Tabela 13. Dados para linearidade do ítrio determinado por MIP OES.

Ítrio	
Concentração (mg L⁻¹)	Intensidade (cps)
1,5	34484,45
2,5	57630,94
5	118040,9
10	240569,6
20	456976,6
30	676769,7
Equação	$y = 136042,5x - 5459,82$
Coeficiente de Correlação (r)	0,9997
Coeficiente de Determinação (r^2)	0,9995

Na Tabela 13 são apresentados os testes estatísticos aplicados demonstrando a homogeneidade da variância dos resíduos. Na Figura 4 é possível ver a plotagem dos resíduos os quais não apresentam tendência, nem valores discrepantes.

Tabela 14. Testes estatísticos para a Linearidade do ítrio.

Avaliação da Homocedasticidade (Teste Cochran)				
C calculado	0,3575	C tabelado	0,4447	Homocedástico
Teste de Normalidade para Resíduos (Teste Shapiro-Wilk)				
W calculado	0,955	W tabelado	0,4447	Os resíduos possuem distribuição normal
Distribuição normal dos resíduos (Teste Anderson-Darling)				
p-valor	0,195	Valor de α	0,05	Os resíduos apresentam distribuição normal
Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)				
D calculado	2,21	D tabelado	1,11	Independente
Teste ANOVA				
F calculado	4,42	F tabelado	2,76	Y varia em função de X efetivamente

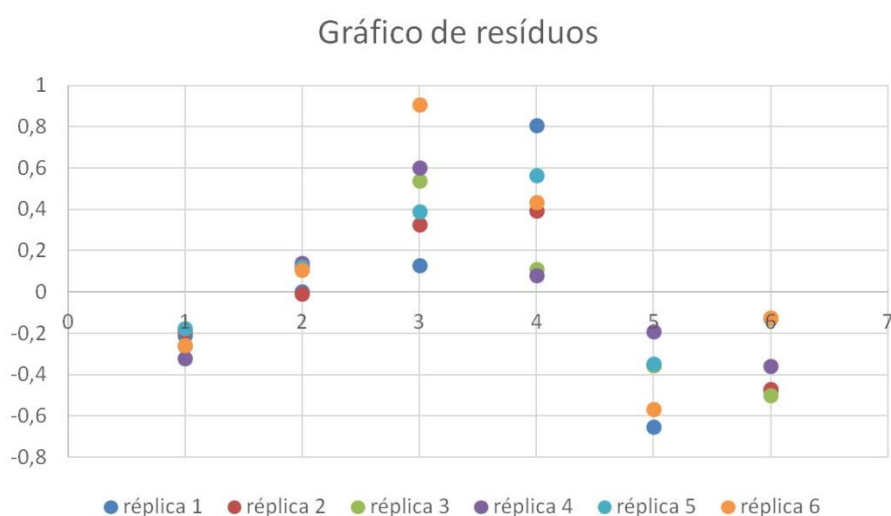


Figura 4. Resíduos da regressão linear do Y

A partir dos resultados obtidos pelos testes estatísticos é possível afirmar que para o Teste C de Cochran, que se baseia na verificação da homogeneidade das variâncias e uma vez que se tais dados não forem homogêneos pode resultar em erros no método (NOGUEIRA e PEREIRA, 2013). Para que seja homogêneo é necessário $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$, o que ocorre no presente trabalho (AOAC, 2002). Para avaliar se os dados seguem uma distribuição Normal foram feitos dois testes sendo o Teste de Shapiro-Wilk em que $W_{\text{calculado}} > W_{\text{tabelado}}$ demonstra a distribuição normal dos resíduos (BARBOSA et al., 2014). Para o teste de Anderson-Darling é calculado o p-valor e para verificar a normalidade o p-valor deve ser maior que o valor de alfa devido ao nível de significância (BARBOSA et al., 2014).

O teste de Durbin-Watson é utilizado para avaliar a autocorrelação dos resíduos nas análises e quando $D_{\text{calculado}} > D_{\text{tabelado}}$ os resíduos são independentes. Por fim para verificar o quão adequado é o modelo é feito o Teste F a partir de uma tabela ANOVA e quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ como foi obtido, o modelo consegue explicar a variação dos dados experimentais com o nível de significância de 95%.

4.1.3. Seletividade

Para a avaliação da seletividade foi feita a avaliação do efeito de matriz, visto que essa é uma forma de análise da seletividade. De acordo com INMETRO (2016) devem ser avaliadas duas curvas distintas, uma com a presença da matriz e outra sem a matriz com no mínimo 3 replicatas por nível. Neste trabalho foram avaliados 6 réplicas, e a partir do teste F e do teste t é possível concluir sobre a influência da matriz na determinação dos analitos. Os resultados dos testes estatísticos estão resumidos na Tabela 14.

Tendo em vista que para todos os níveis de concentrações tanto o teste F quanto o teste t demonstraram não haver diferenças significativas, visto que o valor calculado é menor que o tabelado. Portanto a matriz não causa efeito em relação à precisão, bem como não causa efeito sobre o resultado na determinação do analito.

Tabela 15. Testes F (Snedecor) e Teste t para avaliar o efeito de matriz.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Teste F		Teste t	
	F calculado	F tabelado	t calculado	t tabelado
1,5	0,66	4,96	1,08	2,57
2,5	4,16	4,96	0,33	2,57
5	4,86	4,96	1,73	2,57
10	0,12	4,96	0,39	2,57
20	2,72	4,96	0,33	2,57
30	0,87	4,96	0,21	2,57

4.1.4. Repetibilidade

Os resultados das 6 réplicas analisadas para cada nível de concentração bem como os coeficientes de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) estão descritos na Tabela 15. Devido a faixa de concentração estudada (100 mg kg⁻¹), o CV máximo aceitável seria de 7,3% e para os níveis médio e alto o máximo aceitável é de 5,3% (INMETRO, 2016). A partir dos resultados obtidos (1,8-3,3%), é possível afirmar que o método apresenta repetibilidade adequada.

Tabela 16. Coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade.

Nível de concentração	Concentração (mg L ⁻¹)						CV (%)
Baixo	2,45	2,32	2,25	2,33	2,22	2,32	3,34
Médio	5,07	4,99	4,63	4,84	4,84	4,87	3,11
Alto	9,03	8,87	9,08	9,30	8,96	9,25	1,82

4.1.5. Precisão Intermediária

Para a avaliação desse parâmetro utiliza-se os mesmos critérios da repetibilidade, dos quais os resultados estão apresentados na Tabela 16 composto por resultados do primeiro dia de análise e de outro dia próximo. Considerando a faixa de concentração estudada (100 mg kg^{-1}), o CV máximo aceitável é 7,3% e para os níveis maiores o máximo aceitável é de 5,3% (INMETRO, 2016). Os resultados obtidos (3,9-4,9%) é possível afirmar que o estudo de precisão intermediária apresentou resultados adequados.

Tabela 17. Coeficiente de variação para avaliação da precisão intermediária.

Nível de concentração	Dia	Concentração (mg L^{-1})						CV (%)
Baixo	1º	2,45	2,32	2,25	2,33	2,22	2,32	4,32
	2º	2,16	2,15	2,17	2,16	2,26	2,27	
Médio	1º	5,07	4,99	4,63	4,84	4,84	4,87	3,91
	2º	4,87	4,58	5,06	4,73	4,53	4,68	
Alto	1º	9,03	8,87	9,08	9,30	8,96	9,25	4,92
	2º	9,53	9,77	10,3	9,66	10,1	9,92	

4.1.6. Veracidade

Apesar do documento proposto pelo INMETRO (2016) apresentar o termo exatidão, neste trabalho esse termo foi substituído por veracidade de acordo com o VIM (2012). Com isso para a avaliação da veracidade o INMETRO (2016) sugere a utilização de materiais de referência, no entanto não existem valores certificados para ítrio. Desta forma a veracidade foi avaliada com o emprego de ensaio de adição e recuperação. Os ensaios foram realizados a partir da fortificação das amostras com quantidades conhecidas de Y em três níveis (baixo, médio e alto). Apesar de ser adicionado o óxido de ítrio nas dietas estudadas, para a avaliação desse parâmetro foi

adicionado ítrio a partir de uma solução padrão de ítrio, conforme já apresentado em Materiais e Métodos.

Os resultados descritos na Tabela 17 foram calculados a partir da Equação 16, sendo obtidas recuperações de 93,4%, 98,4% e 91,7% respectivamente para os níveis de concentração baixo, médio e alto. Todas as recuperações estão dentro da faixa de 80% a 110% de recuperação de acordo com a tabela de critério de aceitação para recuperação do INMETRO (2016), demonstrando então que o método possui uma boa veracidade.

Tabela 18. Recuperações obtidas na avaliação da veracidade.

Nível de concentração	Concentração (mg L ⁻¹)						Recuperação (%)
Baixo	2,45	2,32	2,25	2,33	2,22	2,32	93,4
Médio	5,07	4,99	4,63	4,84	4,84	4,87	98,4
Alto	9,03	8,87	9,08	9,30	8,96	9,25	91,7

4.2. Aplicação analítica

4.2.1. Limite de detecção e quantificação

A partir das equações 14 e 15 foram calculados os LOD e LOQ de cada analito a ser determinado nas matrizes de dietas e fezes de peixe dos quais estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 19. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as determinações por MIP OES.

Analito	Fração de massa (g kg ⁻¹)	
	LOD	LOQ
Ca	0,11	0,38
Mg	0,01	0,05
K	0,41	1,37
P	1,75	5,83
Fração de massa (mg kg ⁻¹)		
Fe	18,03	60,11
Cu	2,23	7,42
Mn	0,94	3,14
Zn	14,03	46,78

4.2.2. Linearidade e faixa dinâmica linear

A avaliação da linearidade pode ser feita através do coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R²). A partir da determinação de no mínimo 5 níveis de concentração distintas o critério mínimo aceitável é 0,99 para R e 0,98 para R² (INMETRO, 2016). Tendo em vista que a faixa dinâmica linear corresponde à faixa de concentração, esta pode ser determinada com a faixa de calibração linear.

Os resultados estão apresentados na Tabela 19, em que pode ser visto uma boa linearidade para todos os analitos, com valores de R² superiores a 0,999.

Tabela 20. Equações das curvas analíticas obtidas para os elementos analisados em amostras de ração e fezes de peixe e determinados por MIP OES.

Analitos	Equação da reta	R²	Faixa dinâmica linear (mg L⁻¹)
Ca	$y = 136042,5x - 5459,82$	0,9998	2,5 - 20
Mg	$y = 64273,11x + 18262,92$	0,9991	2,5 - 20
K	$y = 13094,68x + 1570,85$	0,9995	2,5 - 20
P	$y = 54,71x + 6,92$	0,9994	2,5 - 30
Fe	$y = 3679,26x - 263,72$	0,9993	1,5 - 30
Cu	$y = 20073,05x + 8,31$	0,9998	1,5 - 25
Mn	$y = 11422,69x - 355,97$	0,9995	1,5 - 30
Zn	$y = 146,12x + 14,93$	0,9995	1,5 - 25

4.2.3. Veracidade

Neste trabalho, a veracidade do método foi avaliada através da análise de materiais de referência certificado de folha de maçã (NIST SRM 1515) e folha de tomateiro (NIST SRM 1573a). Os CRMs citados foram utilizados para avaliar a veracidade do método, pois não há material de referencia certificado de fezes de peixe. Foram escolhidos estes em função da presença das fibras similares às amostras.

Os valores determinados e os certificados para todos os CRMs estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. O teste t não pareado com nível de confiança de 95% mostrou que não houve diferença significativa entre os valores certificados e determinados. As recuperações foram satisfatórias das quais variaram na faixa de 84 a 117%, demonstrando que o método proposto apresenta veracidade adequada para os analitos estudados.

Tabela 21. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de macieira (NIST SRM 1515) determinados por MIP OES.

Analitos	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor determinado (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	15250 ± 100	14894 ± 680	98
Mg	2710 ± 120	2241 ± 333	83
K	16080 ± 210	14831 ± 196	92
P	1593 ± 68	1835 ± 142	115
Fe	82,7 ± 2,6	72 ± 4,4	87
Cu	5,69 ± 0,13	4,93 ± 1,3	87
Mn	54,1 ± 1,1	53,4 ± 3,5	99
Zn	12,45 ± 0,43	10,91 ± 1,46	88

Tabela 22. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de tomateiro (NIST SRM 1573a) determinados por MIP OES.

Analitos	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor determinado (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	50450 ± 550	44272 ± 675	88
Mg	12000	10106 ± 4198	84
K	26760 ± 480	23623 ± 430	90
P	2161 ± 28	1918 ± 732	89
Fe	367,5 ± 4,3	309 ± 7,4	84
Cu	4,70 ± 0,14	5,50 ± 0,1	117
Mn	246,3 ± 7,1	234,6 ± 5,1	95
Zn	30,94 ± 0,55	29,03 ± 5,97	94

4.2.4. Resultados

O procedimento de preparo de amostras foi aplicado em todas as amostras da avaliação de digestibilidade, as quais se classificam em ingredientes, dietas com a presença do marcador e fezes. As amostras foram codificadas para otimizar a identificação desta forma tem-se: amostras das dietas (1894 a 1903), amostras dos ingredientes (1904 a 1915) e amostras de fezes (1916 a 1955 e 2729 a 2759).

As amostras foram digeridas em triplicata, como descrito no item 3.4.1 . Os teores de Y, Zn, Cu, Mn, Fe, P, Ca, Mg e K foram determinados por MIP OES. As frações de massa dos macronutrientes (média \pm desvio padrão, n = 3) das amostras estão apresentadas na Tabela 22 e micronutrientes e ítrio (média \pm desvio padrão, n = 3) estão apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23. Frações de massa dos macronutrientes (média ± desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes determinados por MIP OES.

Amostra	Ca(mg kg⁻¹)	P(mg kg⁻¹)	Mg(mg kg⁻¹)	K(mg kg⁻¹)	Fe(mg kg⁻¹)
1894	9214.8 ± 527.1	11031.6 ± 250.4	178.3 ± 53.1	4962.2 ± 133.4	265.9 ± 26.8
1895	8715.0 ± 482.4	9761.7 ± 294.5	119.2 ± 66.1	5192.8 ± 385.8	256.4 ± 27.7
1896	25765.1 ± 1034.5	21994.7 ± 2922.8	< LOQ	3237.8 ± 190.3	265.8 ± 31.5
1897	10471.2 ± 311.3	6005.8 ± 1878.3	< LOQ	2776.6 ± 146.3	263.5 ± 18.1
1898	8152.3 ± 343.1	9739.3 ± 399.0	202.3 ± 57.2	4610.5 ± 250.6	244.0 ± 12.2
1899	7666.3 ± 242.2	< LOQ	< LOQ	2377.8 ± 69.4	235.1 ± 26.5
1900	9866.5 ± 262.2	< LOQ	< LOQ	2803.0 ± 83.3	302.9 ± 15.5
1901	13096.3 ± 452.7	< LOQ	< LOQ	3449.5 ± 89.8	303.7 ± 41.4
1902	11732.8 ± 256.5	< LOQ	< LOQ	3932.4 ± 73.6	598.9 ± 245.0
1903	18994.4 ± 1099.7	7564.0 ± 178.1	< LOQ	3250.7 ± 232.9	363.9 ± 118.9
1904	< LOQ	< LOQ	1006.2 ± 71.1	5441.6 ± 325.0	139.7 ± 9.4
1905	< LOQ	< LOQ	448.3 ± 134.4	7314.0 ± 259.9	129.4 ± 24.6
1906	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	84.8 ± 5.6
1907	< LOQ	< LOQ	3446.4 ± 121.0	4188.1 ± 127.5	760.1 ± 51.5
1908	< LOQ	< LOQ	1176.7 ± 91.6	3855.3 ± 253.9	717.9 ± 49.2
1909	2698.3 ± 220.9	21195.3 ± 1940.7	2232.5 ± 269.9	15624.5 ± 279.1	206.8 ± 4.6
1910	< LOQ	11217.3 ± 2339.7	< LOQ	1717.4 ± 152.1	< LOQ
1911	1300.9 ± 32.4	15435.0 ± 1738.7	1909.9 ± 247.1	14698.0 ± 50.8	140.5 ± 2.8
1912	31739.5 ± 1843.7	44833.4 ± 3555.2	99.1 ± 60.4	5597.5 ± 133.0	68.5 ± 2.0
1913	4851.3 ± 977.0	12402.5 ± 1329.5	< LOQ	< LOQ	151.3 ± 13.2
1914	3887.0 ± 981.2	11204.2 ± 2209.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1915	66805.4 ± 2272.6	74189.3 ± 443.9	1131.6 ± 130.6	3727.7 ± 223.0	127.1 ± 3.6
1916	160808.1 ± 4133.7	142533.7 ± 5534.2	3003.9 ± 187.4	< LOQ	1574.1 ± 172.2
1917	103981.3 ± 2100.0	97225.2 ± 3473.9	2689.5 ± 58.3	< LOQ	2450.7 ± 181.1
1918	168090.9 ± 6674.1	142930.5 ± 2269.6	1795.7 ± 268.9	< LOQ	1498.8 ± 468.5
1919	59411.8 ± 787.7	57636.0 ± 798.6	622.5 ± 21.1	< LOQ	1803.1 ± 185.2
1920	115572.2 ± 4970.4	111019.5 ± 2118.5	1177.1 ± 78.8	< LOQ	1719.7 ± 129.2
1921	72535.3 ± 3224.3	55620.2 ± 713.2	255.7 ± 81.1	< LOQ	2052.3 ± 36.8
1922	33784.6 ± 1216.6	40143.3 ± 1875.4	2243.2 ± 91.7	< LOQ	1032.2 ± 7.1
1923	57036.8 ± 954.9	57724.4 ± 1437.7	2829.1 ± 110.9	< LOQ	< LOQ
1924	70134.1 ± 2591.8	62491.0 ± 2915.5	133.7 ± 97.2	< LOQ	1830.0 ± 84.4
1925	52820.8 ± 249.9	53268.7 ± 1342.5	2458.5 ± 278.9	< LOQ	2441.7 ± 153.9
1926	69005.3 ± 434.2	68605.5 ± 3434.6	301.8 ± 101.0	< LOQ	1657.7 ± 34.3
1927	56557.7 ± 814.5	48624.0 ± 2632.3	< LOQ	< LOQ	2340.2 ± 34.0
1928	33374.5 ± 947.3	37536.6 ± 1612.5	1668.5 ± 97.7	< LOQ	2205.5 ± 388.1
1929	52026.0 ± 1363.5	49142.6 ± 1277.4	1793.1 ± 128.0	< LOQ	1147.2 ± 36.8
1930	66796.0 ± 2207.0	53252.5 ± 3225.7	105.4 ± 41.3	< LOQ	1801.1 ± 150.2
1931	116762.2 ± 1786.5	112215.6 ± 5048.0	1144.7 ± 68.9	< LOQ	2232.6 ± 489.6
1932	58225.0 ± 162.4	55830.9 ± 1359.2	2702.7 ± 306.3	< LOQ	2135.5 ± 159.6
1933	151758.1 ± 952.1	131444.0 ± 3476.2	2891.0 ± 28.8	< LOQ	2425.7 ± 1020.4
1934	174257.5 ± 2909.5	144425.2 ± 1507.7	1827.7 ± 163.7	< LOQ	1624.8 ± 58.4
1935	96153.5 ± 1696.6	88640.3 ± 2754.2	1500.3 ± 189.8	< LOQ	1266.1 ± 173.0
1936	55630.7 ± 240.6	52795.6 ± 2819.7	404.1 ± 13.5	< LOQ	2315.9 ± 92.2
1937	72956.5 ± 5463.0	65728.1 ± 2898.8	318.9 ± 92.8	< LOQ	1963.2 ± 165.0
1938	98154.7 ± 2518.9	97143.5 ± 1894.7	2350.9 ± 93.7	< LOQ	2667.6 ± 129.7
1939	70271.7 ± 1404.6	70945.2 ± 934.0	620.8 ± 37.1	< LOQ	2232.9 ± 142.1
1940	166630.1 ± 2709.8	144874.8 ± 2918.9	2146.5 ± 267.4	< LOQ	1196.6 ± 75.0

Tabela 23. Frações de massa dos macronutrientes (média ± desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes determinados por MIP OES (continuação).

Amostra	Ca(mg kg⁻¹)	P(mg kg⁻¹)	Mg(mg kg⁻¹)	K(mg kg⁻¹)	Fe(mg kg⁻¹)
1941	48761.1 ± 739.0	45572.6 ± 1417.3	1662.2 ± 261.1	< LOQ	1661.5 ± 79.8
1942	165838.9 ± 10226.3	141313.6 ± 6012.8	2991.0 ± 136.0	< LOQ	1511.1 ± 88.3
1943	32613.4 ± 378.3	45106.3 ± 1545.1	1957.1 ± 208.4	< LOQ	1129.5 ± 19.5
1944	53487.8 ± 1446.9	57207.7 ± 3924.1	2186.8 ± 291.9	< LOQ	1693.9 ± 71.9
1945	136639.0 ± 2199.0	113859.1 ± 4000.6	1909.6 ± 118.9	< LOQ	2445.3 ± 489.6
1946	55542.3 ± 708.2	33217.1 ± 2056.7	1993.3 ± 180.8	< LOQ	1790.8 ± 102.6
1947	161839.5 ± 8472.9	118439.3 ± 2895.6	2840.4 ± 98.8	< LOQ	1511.7 ± 82.1
1948	122986.5 ± 1014.6	100173.5 ± 2004.0	1811.6 ± 229.7	< LOQ	2189.1 ± 113.1
1949	174304.0 ± 7373.0	134247.9 ± 4220.2	2277.1 ± 131.0	< LOQ	1411.5 ± 280.6
1950	53381.6 ± 2787.1	31574.2 ± 4589.3	273.1 ± 161.7	< LOQ	1876.5 ± 129.0
1951	50563.1 ± 1494.9	33220.2 ± 3038.4	2151.7 ± 303.6	< LOQ	1662.8 ± 73.1
1952	69286.7 ± 4200.1	42727.2 ± 993.7	386.1 ± 83.5	< LOQ	2057.1 ± 363.4
1953	91697.2 ± 2030.7	66598.0 ± 1019.8	1817.2 ± 183.9	< LOQ	2599.5 ± 40.8
1954	35569.7 ± 2678.6	22750.6 ± 1834.5	2995.6 ± 418.5	< LOQ	1138.1 ± 4.4
1955	65919.0 ± 64.6	43830.5 ± 2154.1	311.3 ± 26.0	< LOQ	2344.8 ± 15.7
2729	15897.1 ± 508.6	17852.8 ± 1294.2	15897.1 ± 508.6	13716.3 ± 923.7	434.1 ± 42.8
2730	14450.1 ± 125.9	14852.9 ± 483.3	14450.1 ± 125.9	12322.9 ± 315.4	496.1 ± 7.8
2731	15831.6 ± 1107.8	12038.7 ± 857.0	15831.6 ± 1107.8	10039.7 ± 116.6	455.8 ± 72.9
2732	11262.0 ± 643.4	11875.1 ± 551.9	11262.0 ± 643.4	9541.5 ± 380.5	354.1 ± 11.2
2733	8335.7 ± 721.5	10699.9 ± 775.3	8335.7 ± 721.5	9587.6 ± 428.8	410.0 ± 19.8
2734	9524.8 ± 300.7	16549.1 ± 1159.3	9524.8 ± 300.7	13119.4 ± 1043.3	511.7 ± 15.7
2735	25653.9 ± 987.0	22175.4 ± 873.3	25653.9 ± 987.0	< LOQ	2143.0 ± 210.2
2736	23125.4 ± 765.0	24828.5 ± 2385.7	23125.4 ± 765.0	< LOQ	2199.0 ± 121.7
2737	29818.1 ± 9402.6	33358.9 ± 4942.5	29818.1 ± 9402.6	< LOQ	2229.0 ± 244.2
2738	< LOQ	24827.2 ± 1843.8	< LOQ	< LOQ	1711.0 ± 171.6
2739	11907.0 ± 1076.0	23167.2 ± 309.1	11907.0 ± 1076.0	< LOQ	2087.3 ± 139.8
2740	< LOQ	14101.5 ± 912.3	< LOQ	< LOQ	3093.7 ± 280.7
2741	< LOQ	16154.0 ± 2138.4	< LOQ	< LOQ	3344.8 ± 122.2
2742	22974.0 ± 1312.1	34780.3 ± 3303.7	22974.0 ± 1312.1	< LOQ	6366.5 ± 363.9
2743	10270.3 ± 52.9	21967.4 ± 1981.3	10270.3 ± 52.9	< LOQ	5275.8 ± 105.7
2744	12929.3 ± 1320.6	22058.2 ± 1620.0	12929.3 ± 1320.6	< LOQ	5607.0 ± 74.5
2745	6576.1 ± 442.6	21840.7 ± 725.7	6576.1 ± 442.6	< LOQ	5313.5 ± 359.5
2746	9852.3 ± 609.6	25393.8 ± 581.9	9852.3 ± 609.6	< LOQ	4449.6 ± 135.1
2747	29051.8 ± 2000.8	34769.1 ± 5013.5	29051.8 ± 2000.8	< LOQ	6141.9 ± 582.5
2748	25033.3 ± 1104.0	22807.3 ± 1380.2	25033.3 ± 1104.0	< LOQ	4067.3 ± 205.3
2749	19989.6 ± 815.6	20112.8 ± 2405.2	19989.6 ± 815.6	< LOQ	2758.6 ± 141.6
2750	32964.6 ± 705.6	25360.0 ± 456.8	32964.6 ± 705.6	< LOQ	5601.2 ± 233.7
2751	31336.2 ± 1635.1	25515.1 ± 1992.2	31336.2 ± 1635.1	< LOQ	6487.6 ± 318.4
2752	21361.1 ± 783.1	27564.6 ± 2375.1	21361.1 ± 783.1	< LOQ	5791.6 ± 627.5
2753	13747.5 ± 894.1	28958.1 ± 3054.7	13747.5 ± 894.1	< LOQ	4293.3 ± 125.3
2754	14549.1 ± 1172.0	30017.9 ± 1020.7	14549.1 ± 1172.0	< LOQ	5824.8 ± 514.1
2755	8043.1 ± 349.5	22839.8 ± 812.4	8043.1 ± 349.5	< LOQ	3750.3 ± 352.3
2756	8865.8 ± 191.2	36089.8 ± 4598.1	8865.8 ± 191.2	< LOQ	5616.9 ± 488.1
2757	5064.2 ± 195.1	24293.1 ± 1473.3	5064.2 ± 195.1	< LOQ	5608.0 ± 427.1
2758	2254.6 ± 96.8	24315.9 ± 1456.7	2254.6 ± 96.8	< LOQ	5010.0 ± 516.1
2759	1134.8 ± 123.3	23438.9 ± 1563.6	1134.8 ± 123.3	< LOQ	4896.7 ± 309.3

Tabela 24. Frações de massa dos micronutrientes e Y (média ± desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes determinados por MIP OES.

Amostra	Y(mg kg⁻¹)	Zn(mg kg⁻¹)	Cu(mg kg⁻¹)	Mn(mg kg⁻¹)
1894	832.8 ± 33.3	233.8 ± 5.0	42.1 ± 5.5	58.7 ± 5.8
1895	842.4 ± 30.5	241.5 ± 7.2	38.9 ± 1.1	56.6 ± 8.0
1896	901.3 ± 43.5	252.0 ± 12.9	38.5 ± 2.0	59.4 ± 7.2
1897	871.2 ± 42.9	236.9 ± 12.5	35.7 ± 1.7	52.4 ± 3.2
1898	841.3 ± 45.8	252.8 ± 15.9	38.4 ± 3.0	49.9 ± 2.5
1899	899.3 ± 48.2	249.0 ± 14.0	42.5 ± 2.2	47.1 ± 5.6
1900	959.9 ± 65.9	275.9 ± 16.1	49.5 ± 2.9	59.9 ± 3.0
1901	894.2 ± 52.4	258.6 ± 14.4	51.4 ± 2.6	62.9 ± 9.8
1902	928.4 ± 41.4	347.4 ± 15.7	53.3 ± 2.3	131.3 ± 59.7
1903	876.4 ± 39.3	277.4 ± 12.3	37.5 ± 1.5	81.2 ± 28.9
1904	< LOQ	73.8 ± 7.2	6.6 ± 0.6	31.5 ± 1.9
1905	< LOQ	< LOQ	8.3 ± 2.4	29.4 ± 5.1
1906	< LOQ	< LOQ	6.0 ± 0.5	20.8 ± 0.8
1907	< LOQ	52.3 ± 4.2	11.2 ± 0.6	162.6 ± 8.8
1908	< LOQ	86.5 ± 7.5	14.6 ± 0.9	148.9 ± 9.2
1909	< LOQ	< LOQ	8.7 ± 0.3	44.8 ± 2.2
1910	< LOQ	< LOQ	< LOQ	11.9 ± 0.3
1911	< LOQ	< LOQ	7.9 ± 0.6	31.9 ± 1.3
1912	< LOQ	86.9 ± 7.1	48.0 ± 4.8	18.1 ± 1.4
1913	< LOQ	84.8 ± 3.7	38.3 ± 1.2	34.9 ± 0.8
1914	< LOQ	< LOQ	< LOQ	10.0 ± 0.3
1915	< LOQ	127.2 ± 7.5	< LOQ	30.7 ± 0.5
1916	4614.5 ± 87.1	1357.4 ± 21.5	155.3 ± 8.0	320.1 ± 4.0
1917	6371.9 ± 231.2	2167.3 ± 75.3	287.8 ± 1.7	523.8 ± 22.4
1918	3927.3 ± 172.6	1100.4 ± 18.3	152.4 ± 5.7	306.7 ± 103.5
1919	5805.3 ± 153.1	1394.9 ± 38.1	217.8 ± 6.6	360.6 ± 53.9
1920	5927.7 ± 9.7	1528.4 ± 31.0	289.2 ± 11.8	353.7 ± 7.1
1921	7427.4 ± 84.2	1659.5 ± 23.2	208.6 ± 4.3	401.5 ± 14.1
1922	3651.9 ± 71.9	776.7 ± 12.4	56.5 ± 2.6	221.2 ± 9.0
1923	5240.1 ± 170.6	1177.8 ± 19.7	< LOQ	353.1 ± 27.7
1924	8061.9 ± 459.0	1968.0 ± 32.9	137.0 ± 7.8	463.9 ± 33.2
1925	5316.2 ± 92.4	1120.9 ± 25.8	184.7 ± 7.0	330.8 ± 11.1
1926	8446.3 ± 173.5	2144.9 ± 42.3	111.9 ± 2.5	480.6 ± 19.0
1927	6502.4 ± 98.3	1622.9 ± 17.5	309.2 ± 9.0	463.2 ± 111.8
1928	4014.1 ± 55.7	864.0 ± 25.0	268.8 ± 7.6	224.8 ± 11.1
1929	5021.7 ± 270.3	1278.6 ± 14.3	77.0 ± 3.2	361.5 ± 15.7
1930	7973.4 ± 92.1	1768.9 ± 21.5	174.5 ± 3.2	478.3 ± 97.4
1931	6004.4 ± 433.3	1756.2 ± 54.5	245.7 ± 10.6	405.6 ± 23.3
1932	5387.2 ± 85.8	1233.6 ± 15.2	328.9 ± 11.6	471.2 ± 171.4
1933	4390.7 ± 324.3	1430.9 ± 39.6	146.9 ± 2.8	318.4 ± 24.2
1934	3719.3 ± 258.6	1148.0 ± 43.1	169.7 ± 3.2	249.7 ± 34.5
1935	6395.6 ± 82.6	2425.0 ± 64.8	157.3 ± 6.8	431.4 ± 33.1
1936	5890.7 ± 150.0	1599.4 ± 18.5	332.6 ± 13.4	376.0 ± 31.3
1937	6834.7 ± 371.3	1698.1 ± 24.2	260.2 ± 1.3	414.7 ± 16.8
1938	6380.7 ± 285.5	2371.0 ± 40.6	339.4 ± 20.4	541.7 ± 29.7
1939	7971.1 ± 422.1	2132.6 ± 38.8	276.8 ± 7.6	456.4 ± 16.5
1940	3941.0 ± 172.2	1192.5 ± 29.1	155.8 ± 6.9	228.7 ± 10.4

Tabela 24. Frações de massa dos micronutrientes e Y (média ± desvio padrão, n = 3) das amostras dos ingredientes, dietas e fezes determinados por MIP OES (continuação).

Amostra	Y(mg kg⁻¹)	Zn(mg kg⁻¹)	Cu(mg kg⁻¹)	Mn(mg kg⁻¹)
1941	5424,3 ± 105,8	1320,4 ± 37,0	167,7 ± 10,0	342,0 ± 3,2
1942	4330,4 ± 197,9	1477,1 ± 25,0	177,7 ± 9,1	322,6 ± 7,3
1943	3911,6 ± 190,7	870,0 ± 43,5	71,1 ± 2,8	222,6 ± 12,5
1944	5024,5 ± 85,3	1273,4 ± 18,2	189,7 ± 1,4	342,8 ± 13,0
1945	5862,5 ± 180,3	1793,9 ± 52,7	328,3 ± 10,6	489,0 ± 84,9
1946	5033,5 ± 116,7	1319,3 ± 4,6	176,1 ± 2,8	367,7 ± 27,8
1947	4383,0 ± 51,1	1467,0 ± 23,8	181,0 ± 4,8	307,3 ± 16,5
1948	5636,5 ± 762,9	1799,4 ± 92,0	335,2 ± 12,9	435,6 ± 37,4
1949	3514,3 ± 65,1	1106,8 ± 23,3	153,2 ± 7,2	286,5 ± 62,1
1950	5798,7 ± 105,5	1626,0 ± 53,6	262,5 ± 6,2	387,7 ± 23,5
1951	4803,9 ± 262,3	1417,7 ± 37,4	216,8 ± 8,7	318,8 ± 3,1
1952	6656,6 ± 253,2	1616,7 ± 136,7	237,0 ± 9,4	421,7 ± 75,1
1953	6171,5 ± 82,5	2357,5 ± 73,2	323,1 ± 15,7	545,0 ± 5,4
1954	3769,3 ± 230,3	880,0 ± 19,4	76,8 ± 6,1	236,7 ± 13,6
1955	7817,3 ± 261,9	2212,4 ± 60,3	314,6 ± 6,9	482,3 ± 19,1
2729	629,1 ± 20,2	233,6 ± 5,0	30,1 ± 1,0	71,7 ± 4,1
2730	654,6 ± 28,2	245,0 ± 11,3	31,1 ± 0,8	66,3 ± 3,9
2731	591,3 ± 55,6	219,1 ± 7,7	28,9 ± 0,7	58,1 ± 5,4
2732	602,3 ± 15,1	207,1 ± 10,5	26,9 ± 2,0	45,4 ± 3,6
2733	646,7 ± 19,8	213,3 ± 13,0	29,3 ± 0,8	65,6 ± 6,9
2734	654,8 ± 32,5	308,6 ± 15,8	41,3 ± 2,5	52,5 ± 1,0
2735	3557,3 ± 334,0	1121,1 ± 65,2	129,8 ± 6,8	231,0 ± 13,2
2736	4421,2 ± 233,9	1287,5 ± 108,9	139,1 ± 11,3	257,7 ± 26,8
2737	3525,4 ± 227,2	1486,3 ± 62,9	149,9 ± 10,0	272,7 ± 28,1
2738	3303,4 ± 61,2	861,8 ± 39,6	78,6 ± 3,0	249,7 ± 9,7
2739	4215,9 ± 336,9	1232,1 ± 89,3	124,1 ± 8,0	218,8 ± 12,1
2740	929,3 ± 68,6	348,3 ± 26,5	113,4 ± 7,3	635,7 ± 52,4
2741	847,1 ± 40,9	394,2 ± 24,0	120,0 ± 1,7	808,0 ± 83,8
2742	1261,0 ± 58,7	753,6 ± 50,2	245,6 ± 8,1	1097,9 ± 116,6
2743	1513,3 ± 86,6	626,1 ± 30,0	210,4 ± 7,3	889,6 ± 49,7
2744	1573,3 ± 49,1	599,4 ± 30,4	189,0 ± 9,1	770,3 ± 55,7
2745	1621,8 ± 82,3	565,4 ± 44,7	190,0 ± 9,8	755,7 ± 17,9
2746	1176,7 ± 53,2	461,1 ± 7,3	115,5 ± 2,1	929,9 ± 29,5
2747	1202,3 ± 100,2	707,4 ± 49,2	230,5 ± 22,2	1001,7 ± 38,5
2748	1216,6 ± 116,2	416,1 ± 7,8	118,6 ± 4,8	695,1 ± 36,1
2749	1019,2 ± 34,1	373,8 ± 17,5	113,1 ± 5,7	582,9 ± 38,5
2750	2066,1 ± 109,7	665,9 ± 13,5	198,7 ± 6,0	829,3 ± 32,5
2751	2178,9 ± 108,4	679,9 ± 16,4	220,6 ± 5,4	930,6 ± 17,3
2752	1801,2 ± 24,4	611,2 ± 26,1	196,7 ± 17,2	969,1 ± 48,6
2753	1400,0 ± 47,6	448,0 ± 16,9	107,1 ± 4,6	903,1 ± 66,3
2754	1709,2 ± 69,6	587,9 ± 39,8	167,9 ± 4,1	776,8 ± 55,0
2755	1212,8 ± 121,5	408,0 ± 8,2	117,4 ± 3,8	684,4 ± 57,8
2756	1610,6 ± 67,8	720,1 ± 49,5	227,9 ± 8,4	919,7 ± 49,3
2757	1840,0 ± 41,7	627,7 ± 6,7	198,1 ± 8,6	794,1 ± 20,4
2758	1936,7 ± 79,5	593,1 ± 18,8	187,3 ± 7,5	724,6 ± 25,3
2759	1973,0 ± 33,3	603,9 ± 28,6	183,9 ± 5,8	766,7 ± 69,5

Conclusões Parciais

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O procedimento de preparo de amostras com a digestão assistida por radiação micro-ondas em meio de ácido nítrico diluído foi efetivo para a decomposição das amostras das dietas e fezes de peixes Tambaqui. O MIP OES se mostrou eficiente para a determinação de Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Cu, Zn e Y nas amostras mencionadas, com exatidão (veracidade e precisão) adequada, indicando a possibilidade de realização de maneira exata e precisa para avaliação da digestibilidade das dietas utilizando o MIP OES.

Na validação do procedimento analítico os parâmetros de desempenho como linearidade, seletividade, veracidade e precisão, avaliadas na etapa de validação do procedimento analítico se mostraram satisfatórias tanto para as amostras analisadas quanto para os elementos determinados, cumprindo todos os critérios estabelecidos no Documento Orientativo do INMETRO DOC-CGRCE-08.

Esses resultados são disponíveis para o projeto de pesquisa da Embrapa Pesca e Aquicultura cujo objetivo é avaliar a digestibilidade aparente dos ingredientes proteicos e energéticos adicionados a dietas oferecidas a peixes da espécie Tambaqui. A introdução dessas novas informações contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre a digestibilidade de ingredientes nutricionalmente adequados e com uso na indústria de ração, para alimentação do Tambaqui.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do procedimento de digestão de amostras de sorgo com a utilização de HBF_4 para a determinação de Si foi adequado. A comparação entre o método de digestão em solução alcalina e o proposto apresentaram alta correlação. Tendo em vista as condições de equilíbrio das reações envolvidas é formado HF, conseqüentemente deve-se ter cuidados para evitar danos nos componentes do equipamento.

Em relação a validação do procedimento analítico desenvolvido para a determinação de Y por MIP OES os parâmetros de desempenho cumpriram os critérios estabelecidos. A análise dos analitos inorgânicos nas amostras de dietas e fezes de peixe tambaqui por MIP OES proporcionaram veracidade e precisão adequadas. Portanto o emprego de ácido diluído para o preparo de amostras para amostras de ração e fezes bem como a determinação dos analitos por MIP OES em amostras provenientes de pesquisa agropecuária se mostrou adequado e efetivo.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, T. S.; YTRESTØY, T.; SIXTEN, H. J.; HILLESTAD, M.; SVEIER, H.; ÅSGÅRD, T. Physical feed properties affect gastrointestinal passage rate in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 27:2, 2020, p. 386-394.
- ACKER, J.; HENßGE, A. Chemical analysis of acidic silicon etch solutions: II. Determination of HNO₃, HF, and H₂SiF₆ by ion chromatography. *Talanta*, 72:4, 2007, p. 1540-1545.
- AGILENT TECHNOLOGIES. Espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas Agilent 4200. Agilent Technologies, Inc., 2015.
- AHMED, M.; CHIN, Y. H.; GUO, X.; ZHAO, X. Microwave assisted digestion followed by ICP-MS for determination of trace metals in atmospheric and lake ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 55 (2017), p. 1-10.
- ALMEIDA, L. G. F. DE; PARELLA, R. A. DA C.; SIMEONE, M. L. F.; RIBEIRO, P. C. DE O.; SANTOS, A. S. DOS; COSTA, A. S. V. DA; GUIMARÃES, A. G.; SCHAFFERT, R. E. Composition and growth of sorghum biomass genotypes for ethanol production. *Biomass and bioenergy*, 122(2019), p. 343-348.
- ALTHOFF, A. G.; WILLIAMS, C. B.; MCSWEENEY, T.; GONÇALVES, D. A.; DONATI, G. L. Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES) and Standard Dilution Analysis to Determine Trace Elements in Pharmaceutical Samples. *Applied spectroscopy*, 71 (2017), p. 1-7.
- ÁLVAREZ-FLÓREZ, J.; EGUSQUIZA, E. Analysis of damage caused by siloxanes in stationary reciprocating internal combustion engines operating with landfill gas. *Eng. Fail. Anal.*, 50 (2015), p. 29-38.
- AMAIS, R. S.; DONATI, G. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 106 (2013), p. 318-322.
- AMAIS, R. S.; AMARAL, C. D. B.; FIALHO, L. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of P, S and Si in biodiesel, diesel and lubricating oil using ICP-MS/MS. *Anal. Methods*, 6 (2014), p. 4516-4520.

- AMDRADE, J. O.; BRANDÃO, L. V.; RAMOS, F. M. "Manejo alimentar para o Tabaqui". IN: Aquicultura e Pesca: Adversidades e Resultados 2. SILVA, F. F. (Orgs.). Ponta Grossa, Atena Editora, 2 (2019), p. 237-247.
- ANJOS, S. L. DOS; ALVES, J. C.; SOARES, S. A. R.; ARAUJO, R. G. O.; OLIVEIRA, O. M. C. DE; QUEIROZ, A. F. S.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate optimization of a procedure employing microwave-assisted digestion for the determination of nickel and vanadium in crude oil by ICP OES. *Talanta*, 178 (2017), p. 842-846.
- ARAI, Y.; SATO, S.; WAGATSUMA, K. Emission Spectrometric Analysis Using an Okamoto-cavity Microwave-induced Plasma with Nitrogen-Oxygen Mixed Gas. *ISIJ International*, 53:11, 2013, p. 1993-1999.
- ARAUJO, G. C. L.; GONZALES, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. N. A. e NOBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Parte B: Atomic Spectroscopy*, 57(2002), p. 2121-2132.
- ARAÚJO, F. C. D.; CRUZ, M. G.; BALIEIRO, J. C. C.; MENEZES, M. L.; MOREIRA, C. G.; GIUNCO, C.; CORREA, G. F.; BRANDI, R. A. Effect of odontoplasty on apparent digestibility and consumption time of diet for equines. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 70:1, 2018, p. 29-36.
- ARMSTRONG, W. D.; FEATHERSTON, W. R.; ROGLER, J. C. Influence of Methionine and Other Dietary Additions on the Performance of Chicks Fed Bird Resistant Sorghum Grain Diets. *Poultry Science*, 52:4, 1973, p. 1592–1599.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. AOAC International, 2002, p. 1-12.
- ASTIGARRA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes em pastoreo. IN: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. Anais, Maringá:UEM, 1997, p.1-23.
- AURELI, F.; CIPROTTI, M.; D'AMATO, M.; SILVA, E. DO N. DA; NISI, S.; PASSERI, D.; SORBO, A.; RAGGI, A.; ROSSI, M.; CUBADDA, F. Determination of Total Silicon and SiO₂ Particles Using an ICP-MS Based Analytical Platform for Toxicokinetic Studies of Synthetic Amorphous Silica. *Nanomaterials*, 10 (2020), 888.
- AUSTRENG, E.; STOREBAKKEN, T.; THOMASSEN, M. S.; REFSTIE, S.; THOMASSEN, Y. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers

- used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture*, 188(2000), p. 65-78.
- BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; YURTSEVER, S.; KIZILDERE, M.; KURTULUS, Y. B. Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchemical Journal*, 136 (2018), p. 133-138.
- BARBOSA, J. DOS S. R. Valor nutritivo de dietas contendo sementes de urucum para ovinos em terminação. Sobral: Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA, 2012. Dissertação de Mestrado, 81 p.
- BARBOSA, T. M. C. DE C.; CARVALHO, M. DAS G.; SILVEIRA, J. N.; RIOS, J. G.; KOMATSUZAKI, F.; GODÓI, L. C.; COSTA, G. H. Y. Homocysteine: validation and comparison of two methods using samples from patients with pulmonary hypertension. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 50:6, 2014, p. 402-409.
- BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A. e KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry*, 175 (2015), p. 212-217.
- BARELA, P. S.; SILVA, N. A.; PEREIRA, J. S. F.; MARQUES, J. C.; RODRIGUES, L. F.; MORAES, D. P. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. *Fuel*, 204 (2017), p. 85-90.
- BARROS, J. A. V. A.; SOUZA, P. F. DE; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion using diluted acid and base solutions for plant analysis by ICP OES. *J. Anal. At. Spectrom.*, 31 (2016), p. 337-343.
- BATISTA, B. L. Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, 2009. Dissertação de Mestrado, 79 p.
- BEAUCHEMIN, D.; CRAIG, J. M. Investigations on mixed-gas plasmas produced by adding nitrogen to the plasma gas in ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 46:5, 1991, p. 603-614.

- BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P. DE; FURLAN, C. L. Avaliação de Indicadores Internos em Ensaio de Digestibilidade. Rev. bras. zootec., 29:3, 2000, p. 830-833.
- BERNARD, J. K.; TAO, S. Effect of brachytic dwarf forage sorghum or corn silage harvested in the summer or fall and supplemented with soybean meal or mechanically pressed cottonseed meal on performance of lactating dairy cows. The Professional Animal Scientist, 33 (2017), p. 342-348.
- BIJVELDS, M. J. C.; VELDEN, J. A. V. D.; KOLAR, Z. I.; FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. The Journal of Experimental Biology, 201 (1998), p. 1981-1990.
- BIZZI, C. A. Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas. Santa Maria: Programa de Pós-graduação em Química – UFSM, 2012. Tese de doutorado, 164 p.
- BOSCHETTI, W.; DALAGNOL, L. M. G.; DULLIUS, M.; ZMOZINSKI, A. V.; BECKER, E. M.; VALE, M. G. R.; ANDRADE, J. B. Determination of silicon in plant materials using direct solid sample analysis with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. Microchem. J., 124 (2016), pp. 380-385.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. DE A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia de discussão. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, 2003, p. 129-146.
- CARVALHO, E. V. M. M. DE. Abordagens biotecnológicas do Tambaqui (*Colossoma Macropomum*). Recife: Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – UFPE, 2007. Tese de doutorado, 110 p.
- CARVALHO, L. S. B.; SILVA, C. S.; NÓBREGA, J. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M. B.; KORN, M. G. A. Microwave induced plasma optical emission spectrometry for multielement determination in instant soups. Journal of Food Composition and Analysis, 86 (2020), 103376.
- CHOUBERT JÚNIOR, G.; NOÛE, J. DE L.; LUQUET, P. Continuous Quantitative Automatic Collector for Fish Feces. The Progressive Fish-Culturist, 41:2, 1979, p. 64-67.
- COLOMBINI, S.; GALASSI, G.; CROVETTO, G. M.; RAPETTI, L. Milk production, nitrogen balance, and fiber digestibility prediction of corn, whole plant grain

- sorghum, and forage sorghum silages in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 95:8, 2012, p. 4457-4467.
- CONAB. Análise mensal: Sorgo, 2018, p. 1-4.
- COSTA, J. I. DA; SABBAG, O. J.; MARTINS, M. I. E. G. Scale efficiency in tambaqui farming in earth ponds in the metropolitan region of Manaus-AM. *Bol. Inst. Pesca*, 46:2, 2020, p.1-7.
- CUI, X.; WANG, Y.; SHE, X. Determination of Ca, K, Mg and Fe in four fish species by FAAS. *J. ocean Univ. China*, 9 (2010), p. 235-238.
- DAVIES, S. J.; GOUVEIA, A. Comparison of yttrium and chromic oxides as inert dietary markers for estimation of apparent digestibility coefficients in mirror carp *Cyprinus carpio* fed on diets containing soybean-, maize- and fish-derived proteins. *Aquaculture Nutrition*, 12 (2006), p. 451–458.
- DOGGET, H. Sorghum. Londres: Longmans, Green and Co., 1970, p. 419.
- DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 28 (2013), p. 755-759.
- EDGELL, K. Usepa Method Study 37 sw-846 Method 3050 Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils; US Environmental Protection Agency. Environmental Monitoring Systems Laboratory: Washington, USA, 1989.
- EL OTMANI, S.; CHENTOUF, M.; HORNICK, J. L.; CABARAUX, J. F. Chemical composition and in vitro digestibility of alternative feed resources for ruminants in Mediterranean climates: olive cake and cactus cladodes. *The Journal of Agricultural Science*, 157:3, 2019, p. 1-12.
- ENT, A. V. D.; CASEY, L. W.; BLAMEY, F. P. C.; KOPITTKE, P. M. Time-resolved laboratory micro-X-ray fluorescence reveals silicon distribution in relation to manganese toxicity in soybean and sunflower. *Annals of Botany*, 126 (2020), p. 331-341.
- EPSTEIN, E. "Silicon in plants: Facts vs. concepts". IN: *Silicon in Agriculture*. DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). Elsevier Science B. V., 2001, p. 1-15.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 1995, 15 p.

- ETESAMI, H.; JEONG, B. R. Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(2018), p. 881-896.
- FAVERO, A.; RAGLAND, D.; VIEIRA, S. L.; OWUSU-ASIEDU, A.; ADEOLA, O. Digestibility marker and ileal amino acid digestibility in phytase-supplemented soybean or canola meals for growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 92:12, 2014, p. 5583-5592.
- FENG, W.; HU, X. Q.; WANG, F. C.; HUANG, F.; LIU, L.; LI, H.; LIU, H. M.; YANG, W. M. Effect of dietary iron levels on growth, iron concentration in tissues, and blood concentration levels of transferrin and hepcidin in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Aquaculture Research*, 2019, p. 1-7.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of the world fisheries and aquaculture. Roma, 2020, 224 p.
- FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F. DE; OLIVEIRA, V. DE; SILVA, W. O. Performance and nutrient digestibility of low tannin sorghum fed to pigs from 10 to 30 kg. *J. Anim. Sci.*, 82 (2004), p. 82:22.
- FILHO, V. F. N. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF), 1999, p. 1-63.
- FILHO, P. R. C. O. Coeficiente de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen*. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – UFSC, 2005. Dissertação de Mestrado, 49 p.
- FILHO, M. A. M.; ALVES, A. A.; GARCEZ, B. S.; MOREIRA, A. L.; AZEVÊDO, D. M. M. R.; PARENTE, H. N. Digestibility markers of sheep diets containing hydrolyzed sugarcane-top hay. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 18:1, 2017, p.38-49.
- FREITAS, L.C. Determinação colorimétrica do silício em solos. Jaboticabal: Programa de Pós-Graduação em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, 1973. 104 f.
- FLORES, E. M. M. F. (ed.) “Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination”. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- GHAJAR, S. M.; MCKENZIE, H.; FIKE, J.; MCINTOSH, B.; TRACY, B. F. Evaluating digestibility and toxicity of native warm-season grasses for equines. *Translational Animal Science*, 5:1, 2020, p. 1-13.

- GOKTEPE, A. E.; SELCUK, Z. Relative Feed Value and Digestibility of Caramba (*Lolium multiflorum* cv. Caramba) for Ruminants. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 17 (2017), p. 423-431.
- GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31 (2016a), p. 1097–1104.
- GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 909 (2016b), p. 24-29.
- GRASSIN-DELYLE, S.; MARTIN, M.; HAMZAOU, O.; LAMY, E.; JAYLE, C.; SAGE, E.; ETTING, I.; DEVILLIER, P.; ALVAREZ, J. A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion. *Talanta*, 199 (2019), p. 228-237.
- GREENFIELD, S.; JONES, I. L. W.; BERRY, C. T. High pressure plasmas as spectrometric emission sources. *Analyst*, 89 (1964), p. 713.
- HALL, C. R.; WATERMAN, J. M.; VANDEGEER, R. K.; HARTLEY, S. E.; JOHNSON, S. N. The role of silicon in antiherbivore phytohormonal signaling. *Front. Plant Sci.*, 10 (2019), p. 1–7.
- HAMMER, M. R. A magnetically excited microwave plasma source for atomic emission spectroscopy with performance approaching that of the inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta Part B*, 63 (2008), p. 456-464.
- HARIPRASANNA, K.; PATIL, J. V. Sorghum: Origin, Classification, Biology and Improvement. *Sorghum Molecular Breeding*, 2015, p. 3-20.
- HARPER, M. T.; OH, J.; GIALLONGO, F.; LOPES, J. C.; ROTH, G. W.; HRISTOV, A.N. Using brown midrib 6 dwarf forage sorghum silage and fall-grown oat silage in lactating dairy cow rations. *Journal of Dairy Science*, 100:7, 2017, p. 5250-5265.
- HAUPTKORN, S.; PAVEL, J.; SELTNER, H. Determination of silicon in biological samples by ICP-OES after non-oxidative decomposition under alkaline conditions. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370 (2001), p. 246-250.
- HILLESTAD, M.; ASGARD, T.; BERGE, G. Determination of digestibility of commercial salmon feeds. *Aquaculture*, 179 (1999), p. 81-94.
- HOGENDORP, B. K.; SWIADER, J. M.; CLOYD, R. A. Plant Alkaline Fusion Technique Followed by Colorimetric Procedure for the Detection and Quantification of Total

- Silicon in Ornamental Plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42 (2011), p. 75-92.
- HUI, D.; WANG, J.; LE, X.; SHEN, W.; REN, H. Influences of biotic and abiotic factors on the relationship between tree productivity and biomass in China. *Forest Ecology and Management*, 264 (2012), p. 72-80.
- HURTADO, A. C.; CHICONATO, D. A.; PRADO, R. DE M.; JUNIOR, G. DA S. S.; FELISBERTO, G. Silicon attenuates sodium toxicity by improving nutritional efficiency in sorghum and sunflower plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142 (2019), p. 224-233.
- INDEX MUNDI. Produção mundial de grãos em 2019/20. Disponível em <https://www.indexmundi.com/agriculture/?country=br&commodity=sorghum&graph=production>. Acesso em 13 de Janeiro de 2021.
- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ- CGCRE-008, 2016, p. 1-30.
- JACOBSEN, H. J.; SAMUELSEN, T. A.; GIRONS, A.; KOUSOULAKI, K. Different enzyme incorporation strategies in Atlantic salmon diet containing soybean meal: Effects on feed quality, fish performance, nutrient digestibility and distal intestinal morphology. *Aquaculture*, 491 (2018), p. 302-309.
- JANKOWSKI, K. J. e RESZKE, E. *Microwave induced plasma analytical spectrometry*. Cambridge: RSC Publishing, 2011.
- JANKOWSKI, K. J.; SOKÓLSKI, M. M.; DUBIS, B.; ZALUSKI, D.; SZEMPLIŃSKI, W. Sweet sorghum - Biomass production and energy balance at different levels of agricultural inputs. A six-year field experiment in north-eastern Poland. *European Journal of Agronomy*, 119(2020), 126119.
- JOFRE, F. C.; LARREGUI, D. N.; SAVIO, M. An eco-friendly infrared method for rapid soil sample preparation for multielemental determination by microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 159 (2020), 105448.
- JUNG, M. Y.; KANG, J. H.; CHOI, Y. S.; LEE, D. Y.; LEE, J. Y.; PARK, J. S. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chemistry*, 274 (2019), p. 20-25.

- JUNIOR VIDAL, M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. R. DE; SANTOS, L. C. DOS. Determinação da Digestibilidade da Matéria Seca e da Proteína Bruta do Fubá de Milho e do Farelo de Soja para Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Utilizando-se Técnicas com Uso de Indicadores Internos e Externos. R. Bras. Zootec., 33:6, 2004, p. 2193-2200.
- KATAGIRI, J.; BORJIGIN, S.; YOSHIOKA, T.; MIZOGUCHI, T. Formation and decomposition of tetrafluoroborate ions in the presence of aluminum. J. Mater Cycles Waste Manag., 12 (2010), p. 136-146.
- KILIC, S. e SOYLAK, M. Determination of trace element contaminants in herbal teas using ICP-MS by different sample preparation method. Journal of Food Science and Technology, 57:3, 2019, p. 927-933.
- KLEEMANN, N.; TORRES, D. P.; RIBEIRO, A. S.; BAMBERG, A. L. Cold finger with semi closed reflux system for sample preparation aiming at Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, V and Zn determination in Drinking Water Treatment Sludge by MIP OES. Analytica Chimica Acta, 1096 (2020), p. 9-17.
- KORNDÖRFER, G. H., PEREIRA, H. S., NOLLA, A. Análise de silício no solo, planta e fertilizante. Boletim Técnico n. 2, Universidade Federal de Uberlândia, 2004.
- KRACHLER, M; MOHL, C.; EMONS, H.; SHOTYK, W. Influence of digestion procedures on the determination of rare earth elements in peat and plant samples by USN-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom, 17 (2002), p. 844-851.
- KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. "Métodos de preparo de amostras para análise elementar". 2.ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.
- KUBRAKOVA, I. V.; FORMANOVSKII, A. A.; KUDINOVA, T. F. e KUZ'MIN, N. M. Microwave oxidation of organic compounds by nitric acid. Journal of Analytical Chemistry, 54 (1999), p. 460-465.
- LANNA, E. A. T.; PEZZATO, L. E.; CECON, P. R.; FURUYA, W. M.; BOMFIM, M. A. D. Digestibilidade Aparente e Trânsito Gastrintestinal em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em Função da Fibra Bruta da Dieta. R. Bras. Zootec., 33:6, 2004, p. 2186-2192.
- LE BLOND, J. S.; STREKOPYTOV, S.; UNSWORTH, C.; WILLIAMSON B. J. Testing a new method for quantifying Si in silica-rich biomass using HF in a closed vessel microwave digestion system. Anal. Methods, 3 (2011), p. 1752-1758.
- LE DU, Y. L. P.; PENNING, P. D. Animal based techniques for estimating herbage intake. IN: Herbage Intake Handbook. LEAVER, J.D. (Ed.), 1982, p. 37-1075.

- LEE, S.; CHOWDHURY, M. A. K.; HARDY, R. W.; SMALL, B. C. Apparent digestibility of protein, amino acids and gross energy in rainbow trout fed various feed ingredients with or without protease. *Aquaculture*, 524 (2020), 735270.
- LI, Y.; TIAN, D.; DING, Y.; YANG, G.; LIU, K.; WANG, C.; HAN, X. A review of laser-induced breakdown spectroscopy signal enhancement. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53 (2018), p. 1-35.
- LI, Z.; SONG, Z.; YAN, Z.; HAO, Q.; SONG, A.; LIU, L.; YANG, X.; XIA, S.; LIANG, Y. Silicon enhancement of estimated plant biomass carbon accumulation under abiotic and biotic stresses. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 2018, p. 38: 26.
- LIANG, J.; YANG, H.; LIU, Y.; TIAN L. Dietary potassium requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) based on growth and tissue potassium content. *Aquaculture Research*, 2012, p. 1-8.
- LIED, E.; JULSHAMN, K.; BRAEKKAN, O. R. Determination of protein digestibility in Atlantic cod *Gadus morhua* with internal and external indicators. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39 (1982), p. 854–861.
- LO DICO, G. M.; GALVANO, F.; DUGO, G.; D'ASCENZI, C.; MACALUSO, A.; VELLA, A.; GIANGROSSO, G.; CAMMILERI, G.; FERRANTELLI, V. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245 (2018), p. 1163-1168.
- LORENTZEN, M.; MAAGE, A.; JULSHAMN, K. Manganese supplementation of a practical, fish meal based diet for Atlantic salmon parr. *Aquaculture Nutrmon*, 2 (1996), p. 121-125.
- LOVELL, R. T. *Nutrition and Feeding of Fish*, 2 ed. Boston: Ithaca: Cornell University Press, 1994, 476 p.
- LOWERY, K. L.; MCSWEENEY, T.; ADHIKARI, S. P.; LACHGAR, A.; DONATI, G. L. Signal correction using molecular species to improve biodiesel analysis by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 129 (2016), p. 58-62.
- LUYCKX, M.; HAUSMAN, J.F.; LUTTS, S.; GUERRIERO, G. Impact of Silicon in Plant Biomass Production: Focus on Bast Fibres, Hypotheses, and Perspectives. *Plants*, 2017, p. 6: 37.

- LUZ, L. D.; KALINOVSKI, E. C. Z.; PAROLIN, M.; SOUZA FILHO, E. E. DE. Estágio atual do conhecimento sobre fitólitos no Brasil. *Terrae Didactica*, 11:1, 2015, p. 52-64.
- MAAS, R. M.; VERDEGEM, M. C. J.; SCHRAMA, J. W. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 25:10, 2019, p. 622-632.
- MACHADO, R. C.; AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65:23, 2017, p. 4839-4842.
- MACHADO, R. C.; SILVA, A. B.; DONATI, G. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Multi-energy calibration as a strategy for fertilizer elemental analysis by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33 (2018), p. 1168-1172.
- MAY, A.; SILVA, D. D. DA; SANTOS, F. C. DOS. Cultivo do Sorgo Biomassa para a Cogeração de Energia Elétrica. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013, 65 p.
- MCCUITION, K. C.; SELLE, P.H.; LIU, S. Y.; GOODBAND, R. D. "Sorghum as a Feed Grain for Animal Production". IN: *Sorghum and Millets*. TAYLOR, J. R. N. e DUODU, K. G.(Eds.). Elsevier Inc., 2018, p. 355-391.
- MENEGALE, M. L. DE C.; CASTRO, G. S. A.; MANCUSO, M. A. C. Silício: Interação com o sistema solo-planta. *Journal of Agronomic Sciences*, 4 (2015), p. 435-454.
- MENEGUIN, J. G.; BRUNS, P. H. G.; SILVA, C. T. P. DA; MOISÉS, M. P.; GUILHERME, M. R.; RADOVANOVIC, E.; RINALDI, A. W. An Optimized Process for Recycling Silicon Chemical Compounds from Agro-Industry Solid Waste. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 58 (2019), p. 4511-4517.
- MESKO, M. F.; HARTWIG, C. A.; BIZZI, C. A.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307 (2011), p. 123-136.
- MILLOUR, S.; NOEL, L.; KADAR, A.; CHEKRI, R.; VASTEL. C.; GUÉRIN, T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed vessel

- microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition Analysis*, 24 (2011), p. 111-120.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Brasília: Mapa/ACS, 2011, 72 p.
- MIRANDA, E. C. DE; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; GRANER, C. F.; ROSA, G. J.; QUINTERO-PINTO, L. G. Relação Cálcio/Fósforo Disponível em Rações para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 29:6, 2000, p. 2162-2171.
- MIZUHATA, M.; SAITO, Y.; TAKEE, M.; DEKI, S. Equilibrium of dissolving species in aqueous H_2SiF_6 solution during the liquid phase deposition reaction. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 113:7, 2009, p. 335-339.
- MOKOENA, D. P.; MNGADI, S. V.; SIHLAHLA, M.; DIMPE, M. K.; NOMNGONGO, P. N. Development of a Rapid and Simple Digestion Method of Freshwater Sediments for As, Cd, Cr, Cu, Pb, Fe, and Zn Determination by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES): An Evaluation of Dilute Nitric Acid, Soil and Sediment Contamination: *An International Journal*, 28:3, 2019, p. 323-333.
- MORAES, S. A. DE. Subprodutos da agroindústria e indicadores externos de digestibilidade aparente em caprinos. Belo Horizonte: Pós-graduação em Ciência Animal – UFMG. Tese de doutorado, 2007, 57 p.
- MORAES, G.; ALMEIDA, L. C. "Nutrition and functional aspects of digestion in fish". IN: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. BALDISSEROTTO, B.; URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. P. (Eds.), 2020, p. 251-271.
- MOSS, P. C. B. Digestibilidade aparente da dieta em equinos, estimada através de coleta total de fezes e do uso de indicadores. Belo Horizonte: Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFMG. Dissertação de Mestrado, 2012, 58 p.
- MULLAPUDI, V. B. K.; CHANDRASEKARAN, K.; VENKATESWARLU, G.; KARUNASAGAR, D. Development of a simple and rapid microwave-assisted extraction method using very dilute solutions of perchloric acid and hydrogen peroxide for the multi-elemental analysis of food materials by ICP-OES: A green analytical method. *Microchemical Journal*, 146 (2019), p. 807-817.
- MULLER, E. I.; SOUZA, J. P.; MULLER, C. C.; MULLER, A. L. H.; MELLO, P. A. e BIZZI, C. A. Microwave-assisted wet digestion with H_2O_2 at high temperature and

- pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*, 156-157, 2016, p. 232-238..
- MULLER, E. I.; MULLER, C. C.; SOUZA, J. P.; MULLER, A. L. H.; ENDERS, M. S. P.; DONEDA, M.; FROHLICH, A. C.; IOP, G. D.; ANSCHAU, K. F. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. *Microchemical Journal*, 134 (2017), p. 257- 261.
- NAKADIA, F. V.; PRODANOVA, C.; BOSCHETTIA, W.; VALEA, M. G. V.; WELZ, B.; ANDRADE, J. B. Determination of silicon in biomass and products of pyrolysis process via high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry *Talanta* 179 (2018) 828–835.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrients requirements of horses. National Academy Press, Washington, D.C., 5. Ed., 1989. 100 p.
- NAZLI, R. I. Evaluation of different sweet sorghum cultivars for bioethanol yield potential and bagasse combustion characteristics in a semiarid Mediterranean environment. *Biomass and Bioenergy*, 139 (2020), 105624.
- NETO, H. B.; GRANER, C. A. F.; PEZZATO, L. E.; PADOVANI, C. R.; CANTELMO, O. A. Diminuição do Teor de Óxido de Crômio (III) Usado como Marcador Externo. *R. Bras. Zootec.* 32:2, 2003, p. 249-255.
- NETO, C. F. DE O.; NOGUEIRA, G. A. DOS S.; SOUZA, L. C. DE; SOUSA, L. I. S. DE; PAIVA, A. P. DE. “Benefícios do silício como atenuador de estresses nas plantas”. IN: *Genética e Melhoramento de Plantas e Animais*. CAMPOS, M. DE A.; MAIA, R. T. (Orgs.). Atena Editora, 2019, p. 59-71.
- NGUYEN, V. T.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; KOTANI, T. Effect of zinc and manganese supplementation in *Artemia* on growth and vertebral deformity in red sea bream (*Pagrus major*) larvae. *Aquaculture*, 285 (2008), p. 184–192.
- NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A. DE; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61:5, 2006, p. 465-495.
- NOGUEIRA, D. A.; PEREIRA, G. M. Desempenho de testes para homogeneidade de variâncias em delineamentos inteiramente casualizados. *Sigmae*, 2:1, 2013, p. 7-22.
- NUR, K. U.; ADAMS, L.; STONE, D.; SAVVA, N.; ADAMS, M. Comparison of three inert markers in measuring apparent nutrient digestibility of juvenile abalone under

- different culture condition and temperature regimes. The 2nd International Symposium on Marine and Fisheries Research, 139 (2018), p. 1-8.
- O'CONNOR, G.; EVANS, E. H. "Fundamental Aspects of Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS)". IN: Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications. HANDLEY, A. J.; CHALMERS, J. M. (Eds.), Blackwell Publishing Ltd., 2007, p. 1-443.
- OETTING, L. L. Avaliação de diferentes marcadores para a determinação da digestibilidade e taxa de passagem do alimento em suínos. Piracicaba: Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP. Dissertação de Mestrado, 2002, 57 p.
- OHATA, M.; OTA, H.; FUSHIMI, M.; FURUTA, N. Effect of adding oxygen gas to a high power nitrogen microwave-induced plasma for atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 55:10, 2000, p. 1551-1564.
- OLIVEIRA, A. A. DE. Determinação de iodo por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial. São Carlos: Programa de Pós-graduação em Química – UFSCAR, 2009. Dissertação de Mestrado, 92 p.
- O'QUINN, P. R.; KNABE, D. A.; GREGG, E. J. Efficacy of Natuphos in sorghum-based diets of finishing swine. *Journal of Animal Science*, 1997, 75:5, p. 1299-1307.
- OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 200 (2016), p. 245-248.
- OZBEK, N.; TINAS, H.; ATESPARE, A. E. A procedure for the determination of trace metals in rice varieties using microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 144 (2019), p. 474-478.
- PARDINHO, R. B.; DALLA VECCHIA, P.; MENDES, A. L. G.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A.; DUARTE, F. A. e FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure. *Food Chemistry*, 263 (2018), p. 37-41.
- PARRELLA, R. A. DA; MENEGUCI, J. L. P.; RIBEIRO, A.; SILVA, A. R.; PARRELLA, N. N. L. D.; RODRIGUES, J. A. DOS S.; TARDIN, F. D.; SCHAFFERT, R. E. "Desempenho de cultivares de sorgo sacarino em diferentes ambientes visando a produção etanol". XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010, p. 2858-2866.

- PENG, J.; LIU, F.; ZHOU, F.; SONG, K.; ZHANG, C.; YE, L.; HE, Y. Challenging applications for multi-element analysis by laser-induced breakdown spectroscopy in agriculture: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 85 (2016), p. 260-272.
- PEPETA, B. N. Use of inert markers to predict diet composition, forage intake, digestibility and passage rate in sheep. Pietermaritzburg: School of Agriculture, Earth and Environmental Sciences – UKZN, 2019. Dissertação de Mestrado, 105 p.
- PEREIRA, L. DE A. Desenvolvimento de Metodologias Espectrométricas para Determinação de Metais em Água, Sedimento e Peixe Empregando Suspensões e Solubilização Alcalina. Belo Horizonte, Departamento de Química – UFMG, 2010. Tese de Doutorado, 139 p.
- PERES, M. T. P.; BATISTA, R.; TWARDOWSKI, T. DE S.; FILHO RIBEIRO, H. M. N.; MONTEIRO, A. L. G. Titanium dioxide (TiO₂) as a marker to estimate fecal output in sheep. *Ciência Rural*, 49:12, 2019, p. 1-4.
- PERKINELMER. Sensitivity, Background, Noise, and Calibration in Atomic Spectroscopy: Effects on Accuracy and Detection Limits. PerkinElmer, Inc., 2017, p. 1-11.
- PIRES, L. N.; DIAS, F. DE S.; TEIXEIRA, L. S. G. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1090 (2019), p. 31-38.
- QUINTERO-PINTO, L. G.; PARDO-GAMBOA, B. S.; QUINTERO-PARDO, A. M. C.; PEZZATO, L. E. Exigências e disponibilidade de fontes de fósforo para tilápias. *Vet. Zootec.*, 5:2, 2011, p. 30-43.
- REED, T. B. Induction coupled plasmas. *J. Appl. Phys.*, 32 (1961), p. 821–824.
- REED, T. B. Plasma torches. *Int. Sci. Tech.*, 6 (1962), p. 42.
- REIDINGER, S.; RAMSEY, M. H.; HARTLEY, S. E. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. *New Phytologist*, 195:3, 2012, p. 699-706.
- RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. Á.; SOARES, J. M.; CASELA, C. R. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *Eur. J. Plant Pathol.*, 124 (2009), p. 533-541.

- REZENDE, M. L.; RICHARDSON, J. W. Risk analysis of using sweet sorghum for ethanol production in southeastern Brazil. *Biomass and bioenergy*, 97(2017), p. 100-107.
- RIETIG, A. E ACKER, J. Development and validation of a new method for the precise and accurate determination of trace elements in silicon by ICP-OES in high silicon matrices. *J. Anal. At. Spectrom.*, 32 (2017), p. 322–333.
- ROCHA, M. K. H. R. Cálcio e fósforo para juvenis da Tilápia-do-Nilo. Botucatu: Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UNESP, 2016. Tese de doutorado, 76 p.
- RODRIGUES, A. P. O. Nutrição e alimentaçaõ do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Bol. Inst. Pesca*, 40:1, 2014, p. 135-145.
- SALMAN, A. K. D.; FERREIRA, A. C. D.; SOARES, J. P. G.; SOUZA, J. P. DE. Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2010, 21 p.
- SAMARAPPULI, D.; BERTI, M. T. Intercropping forage sorghum with maize is a promising alternative to maize silage for biogas production. *Journal of Cleaner production*, 194 (2018), p. 515-524.
- SANTOS, J. E. P.; HUBER, J. T.; THEURER, C. B.; NUSSIO, L. G.; NUSSIO, C. B.; TARAZON, M.; LIMA-FILHO, R. O. Performance and Nutrient Digestibility by Dairy Cows Treated with Bovine Somatotropin and Fed Diets with Steam-Flaked Sorghum or Steam-Rolled Corn During Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82:2, p. 404–411.
- SANTOS, F. W. B. “Nutrição de peixes de água doce: definições, perspectivas e avanços científicos”. *Anais do I Simpósio sobre Nutrição e Alimentação Animal*. Fortaleza - CE, 2007, 36 p.
- SANTOS, H. M.; COUTINHO, J. P.; AMORIM, F. A. C.; LÔBO, I. P.; MOREIRA, L. S.; NASCIMENTO, M. M.; JESUS, R. M. DE. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. *Food Chemistry*, 273 (2019), p. 159-165.
- SANTOS, M. A., SILVA, A. B. S., MACHADO, R. C., DIAS, E. A., BARROS, J. A. V. A. NOGUEIRA, A. R. A. Silicon determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry: considerations and strategies for the use of tetrafluorboric acid and sodium hydroxide in sample preparation procedures. *Spectrochimica Acta part B*, 167 (2020) 105842.

- SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; NARABE, Y.; WATANABE, T. Effects of depletion of several trace elements from fish meal diets on growth and mineral composition of rainbow trout fingerlings. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49(1943), p. 1090–1916.
- SAVIO, M.; FIALHO, L. L.; NÓBREGA, J. A. Greening microwave-assisted acid digestion of animal feed samples. *Analytical Methods*, 11 (2019), p. 5857-5863.
- SERRAPICA, F.; MASUCCI, F.; RAFFRENATO, E.; SANNINO, M.; VASTOLO, A.; BARONE, C. M. A.; DI FRANCIA, A. High Fiber Cakes from Mediterranean Multipurpose Oilseeds as Protein Sources for Ruminants. *Animals*, 9: 918, 2019, p. 1-11.
- SHABESTARI, A. B.; ADERGANI, B. A.; SHEKARCHI, M.; MOSTAFAVI, S. M. Development of Environmental Analysis for Determination of Total Mercury in Fish Oil Pearls by Microwave Closed Vessels Digestion Coupled with ICPOES. *Ekoloji*, 27:106, 2018, p. 1935-1943.
- SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; JÚNIOR, A. J. A.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES Setorial*, 35 (2010), p. 421-463.
- SIDRA. Tabela da Produção da aquicultura, por tipo de produto (IBGE). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>. Acesso em 14 de Janeiro de 2021.
- SILVA, S. S. DE; ANDERSON, T. A. *Fish Nutrition in Aquaculture*. London: Chapman e Hall, 1998, 319 p.
- SILVA, J. A. M. DA; FILHO, M. P.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. DE. Frutos e Sementes Consumidos pelo Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Incorporados em Rações. Digestibilidade e Velocidade de Trânsito pelo Trato Gastrointestinal. *R. Bras. Zootec.*, 32:6, 2003, p. 1815-1824.
- SILVA, I. J. S. DA; LAVORANTE, A. F.; PAIM, A. P. S.; SILVA, M. J. DA. Microwave-assisted digestion employing diluted nitric acid for mineral determination in rice by ICP OES. *Food Chemistry*, 319 (2020), 126435.
- SIQUEIRA, T. V. DE. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. *R. BNDES*, 25:49, 2018, p. 119-170.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. “Fundamentos de química analítica”. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.
- SOUZA, L. A.; SOUZA, T. L.; SANTANA, F. B.; ARAUJO, R. G. O.; TEIXEIRA, L. S. G.; SANTOS, D. C. M. B.; KORN, M. G. A. Determination and in vitro bioaccessibility

- evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame. *Microchemical Journal*, 137 (2018), p. 8-14.
- SOUZA, P. F.; SANTOS JÚNIOR, D.; CARVALHO, G. G. A.; NUNES, L. C.; GOMES, M. S.; GUERRA, M. B. B.; KRUG, F. J. Determination of silicon in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, 2013, 83–84, p. 61–65
- STATISTA. Produção de sorgo no Brasil. Disponível em <https://www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/>. Acesso em 05 de Janeiro de 2021.
- STICKNEY, R. Aquaculture. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2 (2001), p. 182-208.
- SUCHAROVÁ, J.; SUCHARA, I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 576 (2006), p. 163-176.
- SUGIURA, S. H.; HARDY, R. W.; ROBERTS, R. J. The pathology of phosphorus deficiency in fish – a review. *Journal of Fish Diseases*, 27 (2004), p. 255-265.
- TACON, A. G. J. Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. *FAO Fish Technical Paper*, 330 (1992), 75 p.
- TAFUR-MARINOS, J. A.; GINEPRO, M.; PASTERO, L. Digestion Procedures for the Elemental Analysis of Wood by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *Analytical Letters*, 2016, 49:11, p. 1722-1733.
- TARANTINO, T. B.; BARBOSA, I. S.; LIMA, D. DE C.; PEREIRA, M. DE G.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A. Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid for Multi-element Determination in Rice by ICP OES and ICP-MS. *Food Anal. Methods*, 10 (2017), p. 1007-1015.
- TAVARES, S. S. M.; SCANDIAN, C.; MACÊDO, M.C.S. DE; PARDAL, J.M.; SILVA, F. J. DA. Failure of tube used in high pressure steam generator due to incrustation deposits. *Engineering Failure Analysis*, 35 (2013), p. 25-32.
- TEIXEIRA, C. G.; JARDINE, J. G.; BEISMAN, D. A. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em microdestilaria. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 17:3, 1997.
- TRIPATHI, D. K.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K.; RAI, A. K. LIB spectroscopic and biochemical analysis to characterize lead toxicity

- alleviative nature of silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Photochemistry e Photobiology, B: Biology*, 154 (2016), p. 89-98.
- TÜRKMEN, M.; TÜRKMEN, A.; TEPE, Y.; TÖRE, Y.; ATEŞ, A. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chemistry*, 113 (2009), p. 233-237.
- TYLER, G.; YVON, J. ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared. Technical Note, Horiba Group, 2003, p. 1-11.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. 1996, p. 1-20.
- VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: Cornell University Press, 1994, 476 p.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; HALL, M. B.; BARRY, M. C. Klason lignin is a nutritionally heterogeneous fraction unsuitable for prediction of forage neutral detergent fibre digestibility in ruminants. *British Journal of Nutrition*, 124:7, 2020, p. 1-22.
- VIM. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012. 94 p.
- WADE, N. M.; BOURNE, N.; SIMON, C. J. Influence of marker particle size on nutrient digestibility measurements and particle movement through the digestive system of shrimp. *Aquaculture*, 491 (2018), p. 273-280.
- WEAST, R. C. CRC Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press, Filadelfia, edition 58th, 1978.
- WILLIAMS, C. B.; AMAIS, R. S.; FONTOURA, B. M.; JONES, B. T.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *Trends in Analytical Chemistry*, 116 (2019), p. 151-157.
- WILSON, R. W.; GROSELL, M. Intestinal bicarbonate secretion in marine teleost fish—source of bicarbonate, pH sensitivity, and consequences for whole animal acid–base and calcium homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1618 (2003), p. 163-174.
- WOYNÁROVICH, A.; ANROOY, R. V. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 624 (2019), 132 p.

- YIN, W.; ZHANG, L.; DONG, L.; MA, W.; JIA, S. Design of a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy System for On-Line Quality Analysis of Pulverized Coal in Power Plants. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63:8, p. 865-872.
- YOUNG, K. E.; EVANS, C. A.; HODGES, K. V.; BLEACHER, J. E.; GRAFF, T. G. A review of the handheld X-ray fluorescence spectrometer as a tool for field geologic investigations on earth and in planetary surface exploration. *Applied Geochemistry*, 72 (2016), p. 77-87.
- YU, L. L.; FASSET, J. D.; LINDSTROM, A. P. Determination of Si in Standard Reference Material SRM 295x Silica-on-Filter. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003), p. 738-741.
- YUE, Y.; SINGH, H.; SINGH, B., MANI, S. Torrefaction of Sorghum Biomass to Improve Fuel Properties. *Bioresource Technology*, 232 (2017), p. 372-379.
- ZAFARZADEH, A.; BAY, A.; FAKHRI, Y.; KERAMATI, H.; POUYA, R. H. Heavy metal (Pb, Cu, Zn, and Cd) concentrations in the water and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) fish and associated non-carcinogenic risk assessment: Alagol wetland in the Golestan, Iran. *Toxin Reviews*, 37:2, 2017, p. 1-7.
- ZHU, C.; DONG, S.; WANG, F.; ZHANG, H. Effects of seawater potassium concentration on the dietary potassium requirement of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258 (2006), p. 543-550.

