



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Trabalho de Conclusão de Curso

VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE MACRO E
MICRONUTRIENTES EM RAÇÃO DE PEIXES POR
ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM
PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS (MIP OES)

Amauri Garcia Filho

Orientador(a): **Edenir Rodrigues Pereira Filho**
Ana Rita de Araujo Nogueira

São Carlos – SP

2022



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP
13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 26/2022/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMAURI GARCIA FILHO

**VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES EM
RAÇÃO DE PEIXES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM
PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS (MIP OES)**

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos - Campus São Carlos

São Carlos, 20 de setembro de 2022

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
Membro da Banca 1	Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Membro da Banca 2	Dr. Avelardo Urano de Carvalho Ferreira



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva, Professor(a)**, em 27/09/2022, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0829852** e o código CRC **5D7DA319**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.035557/2022-13

SEI nº 0829852

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Resumo

Os trabalhos com metodologias analíticas vem adquirindo grande relevância e alvo de alta procura na área de pesquisas e desenvolvimento agropecuário. Desse modo, esse trabalho, busca ofertar opções minuciosas em estudos de monitoramento alimentação de peixes. Primeiramente foi proposto uma metodologia para preparo de amostras. A carência ou abundância de alguns nutrientes podem acarretar prejuízos ao animal e também a cadeia produtiva da piscicultura. Apesar da existência de outros procedimentos, o método de digestão definido empregou 150 mg de analito, pesadas diretamente nos frascos de PTFE modificado, em seguida adicionamos de 3,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ 30% (m/m) e 3,0 mL de H₂O para digerir os exemplares de ração de peixes para determinar macro e micronutrientes. Após as digestões a solução final foi avolumada para 30 mL com água. O processo de leitura dos nutrientes foi executada por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). A veracidade, verificada com o utilização de MR e testes de adição e recuperação, apresentou valores entre 82 e 108%. Os dados de frações mássicas de Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Na encontradas nas amostras de ração de peixe analisadas são de : 17,38 g kg⁻¹ P; 26,30 g kg⁻¹ Ca; 5,79 g kg⁻¹ K; 1,6 g kg⁻¹ Mg; 1,89 g kg⁻¹ Na; 106,81 mg kg⁻¹ Zn; 197,93 mg kg⁻¹ Fe; 9,05 mg kg⁻¹ Cu; 19,93 mg kg⁻¹ Mn. Após o preparar e determinar foi realizado a etapa de validar a metodologia para a quantificar e detectar macro e micronutrientes por MIP OES. O estudo colocado apresentou linearidade satisfatória quando analisados seus valores de r². Já a seletividade analisada no trabalho, quando relacionada aos efeitos de matriz obteve resultados satisfatórios. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram, respectivamente 0,001 mg kg⁻¹ e 0,005 mg kg⁻¹. Os resultados demonstram que o procedimento de validação é de suma importância para a manutenção e monitoramento das dietas de peixes. Ademais a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) é uma alternativa econômica na análise de nutrientes em rações de peixes. Apesar da importância nutricional, a apresentação dos teores dos demais nutrientes inorgânicos por parte dos fabricantes não é exigida pela legislação.

Abstract

The work with analytical methodologies has acquired great relevance and target of high demand in research and agricultural development. Thus, this work seeks to offer detailed options in fish feeding monitoring studies. First, a methodology for preparing samples was proposed. The lack or abundance of some nutrients can cause damage to the animal and the production chain of the psychoculture. Despite the existence of other procedures, the defined digestion method employed 150 mg of analyte, weighed directly in the vials of modified PTFE, then added 3.0 mL of HNO₃, 2.0 mL of H₂O₂ 30% (m/m) and 3.0 mL of H₂O to digest the fish feed specimens to determine macro and micronutrients. After the digests the final solution was soured to 30 mL with water. The nutrient reading process was performed by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). The veracity, verified with the use of MR and addition and recovery tests, presented values between 82 and 108%. The results of mass fractions of Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn and Na found in the fish feed samples analyzed are: 17.38 g kg⁻¹ P; 26.30 g kg⁻¹ Ca; 5.79 g kg⁻¹ K; 1.6 g kg⁻¹ Mg; 1.89 g kg⁻¹ Na; 106.81 mg kg⁻¹ Zn; 197.93 mg kg⁻¹ Fe; 9.05 mg kg⁻¹ Cu; After preparing and determining, the stage of validating the methodology to quantify and detect macro and micronutrients by MIP OES was performed. The study presented satisfactory linearity when analyzing its r² values. On the other hand, the selectivity analyzed in the study, when related to the matrix effects obtained satisfactory results. The limits of detection and quantification obtained were, respectively, 0.001 mg kg⁻¹ and 0.005 mg kg⁻¹. The results show that the validation procedure is of paramount importance for the maintenance and monitoring of fish diets. In addition, microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) is an economical alternative in nutrient analysis in fish feed. Despite the nutritional importance, the presentation of the contents of other inorganic nutrients by manufacturers is not required by legislation.

Sumário

1. Introdução	5
2. Revisão Bibliográfica	6
- 2.1 Métodos e Procedimento de preparo de amostras	6
- 2.1.1. Micro-ondas	7
- 2.1.2. Fornos de micro-ondas	7
- 2.2. Digestão empregando ácido diluído	9
- 2.3. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)	10
- 2.3.1. Estrutura Instrumental	11
- 2.3.2 Relevância da determinação de nutrientes inorgânicos	12
- 2.4.1 Seletividade	16
- 2.4.2. Linearidade e Faixa de trabalho	17
- 2.4.3. Limites de Detecção e Quantificação	18
- 2.4.4 Veracidade	19
- 2.5.5. Precisão	19
- 2.5.6 Incerteza	21
3. Objetivos	22
- 3.1. Objetivos específicos	22
4. Material e Métodos	22
- 4.1 Instrumentos	22
- 4.2. Reagentes	23
- 4.2.1. Amostra - Digestão	24
5. Resultados	24
- 5.1 Aplicação analítica	24
- 5.1.1 Limites de Detecção e Quantificação	24
- 5.1.2 Linearidade	25
- 5.1.3 Veracidade	26
6. Conclusões	27
7. Bibliografia	27
8. Agradecimentos	28

1. Introdução

A piscicultura brasileira está se desenvolvendo de maneira robusta e crescente nos últimos anos, com significativos avanços em termos de ampliação do rendimento e profissionalização dos trabalhadores do setor. Esse desenvolvimento pode ser associado com a alta demanda do mercado doméstico. Em 2019 cerca de 1% das 579 mil toneladas produzidas pela piscicultura brasileira foi destinada à exportação (IBGE/PPM, 2019; CIAQUI, 2019).

Neste sentido, é fundamental conhecer as características do mercado nacional para itens da piscicultura, de modo a torná-los mais competitivos no que se em relação as mercadorias concorrentes, tais como os peixes importados, itens da pesca extrativa e outras proteínas animais. Segundo Sonoda et al. (2012), entender a demanda dos consumidores de pescado e como ela se relaciona com outros tipos de proteínas e alimentos é fundamental para assegurar um aumento do consumo de peixes.

A composição do mercado brasileiro de peixes é variado e complexo, haja vista seu enorme tamanho e a grande diversidade socioeconômica verificada entre as várias regiões do país (FLORES e PEDROZA, 2014). Soma-se desse modo a grande diversidade de espécies cultivadas, sendo que mais de 25 são comercialmente produzidas na aquicultura do Brasil (HARVEY e colaboradores, 2017). Muitas dessas espécies não são conhecidas nacionalmente, tal como é o caso do tambaqui, apresentando assim um consumo regionalizado no Centro-Oeste e Norte do país.

As mudanças socioeconômicas e culturais verificadas nas últimas décadas no Brasil, tais como o acréscimo de renda, a emancipação feminina, a urbanização e a redução do tamanho das famílias, têm se refletido nos hábitos de consumo de peixes. Como resultado dessas mudanças, os consumidores de pescado têm aumentado a busca por mercadorias de mais fácil preparo como cortes, pratos pré-prontos, peças com embalagens mais funcionais e porções de menor tamanho.

Neste contexto, os supermercados têm se consolidado como o principal canal de varejo de pescados em todo o Brasil e isso impõe a obrigatoriedade de melhor conhecer os hábitos dos consumidores deste segmento de mercado (SEBRAE, 2015; PEDROZA e colaboradores, 2014).

Atendendo o contexto descrito anteriormente, o estudo apresenta resultados de uma pesquisa realizada pela Embrapa junto a supermercados de uma cidade representativa de cada uma das cinco localidades brasileiras. Os resultados abordam diferentes aspectos, tais como preferências e percepções dos consumidores quanto aos itens da piscicultura, nível de conhecimento quanto às principais espécies, hábitos de consumo e características socioeconômicas dos consumidores. Outro ponto importante avaliado é a qualidade das rações fornecidas aos peixes criados em cativeiro. O controle do produto fornecido ao longo do tempo torna-se fundamental para a qualidade e produção dos peixes. Teores de proteína, gordura e nutrientes devem ser conhecidos. Em virtude da escassez de estudos dessa natureza no Brasil, as informações aqui apresentadas serão de grande importância não apenas para as empresas do setor, mas para as instituições públicas voltadas para a piscicultura. Neste enfoque, foi proposto e validado uma via para preparar exemplares de ração de peixe visando a discriminar nutrientes por MIP OES. A MIP OES foi elencada como eficiente e compatível com os propósitos pretendidos.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Métodos e Procedimentos para planejamento de amostras

Esse procedimento está relacionado a uma metodologia que consiste na retirada do conteúdo orgânico e solubilizar os analitos por meio de promover uma hipertermia ou pressões altas. Dentre os métodos a altas temperaturas empregados em via úmida destacam-se o aquecimento por convecção (blocos digestores, chama ou fornos convencionais) e por micro-ondas, normalmente empregando ácidos minerais oxidantes e H_2O_2 . Métodos em via úmida a baixas temperaturas também são empregados, como reação de Fenton (formação de radical partindo da reação entre Fe^{2+} e H_2O_2), métodos enzimáticos,

decomposição com surfactantes e irradiação por ultravioleta (KRUG e ROCHA, 2019).

2.1.1. Micro-ondas

Estas fazem parte das ondas eletromagnéticas que cobrem uma faixa de frequência do espectro eletromagnético que varia de 300 a 300.000 MHz. Quando um material não transparente às micro-ondas absorve essa classe de radiação, o material pode sofrer um aumento considerável na sua temperatura, devido, principalmente, à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando migração iônica e rotação de dipolos. A ocorrência destes dois processos, que acontecem quando as micro-ondas interagem com a solução de um ácido (ou mistura de ácidos) usado com a finalidade de digerir a exemplar de interesse, resulta em um movimento molecular no material, que também favorece com o aquecimento do mesmo (KINGSTON & JASSIE, 1988).

2.1.2. Fornos de micro-ondas

Aqui estão os instrumentos que são constituídos basicamente de um formador de micro-ondas, um condutor para guiar as frequências geradas, uma cavidade ressonante, uma fonte, um sensor e um controlador. Existem no mercado sistemas fechados, os chamados sistemas de digestão tipo cavidade. Os sistemas com micro-ondas focalizadas, que trabalha com frascos abertos a pressões próximas à ambiente foram descontinuados. A triagem do melhor forno de micro-ondas deve levar em consideração os frascos de digestão oferecidos (desenho, capacidade, durabilidade e custo), os sensores de temperatura e de pressão (custo, durabilidade e tempo de resposta), os programas para o controle e aquisição de dados, a opção para secagem dos digeridos e os dispositivos de segurança.

Os fornos de micro-ondas com cavidade, por operarem com recipientes fechados apresentam como potencialidades (KINGSTON & HASWELL, 1997):

- Maior eficiência na dissolução em temperaturas elevadas.
- Opção de utilizar somente ácido nítrico para decompor da amostra.
- Reduzido risco de perdas de analitos por volatilização.
- Risco reduzido de contaminações devidas ao ambiente de trabalho.

O sistema utilizado combina algumas características dos sistemas de aquecimento com aplicação da radiação microondas em monomodo e multimodo (Anton Paar, modelo Multiwave Go com sistema DMC, Directed Multimode Cavity) em um modelo compacto e com um rotor relativamente leve, de 5 kg (imagem 1). Esse sistema possui frascos de PTFE-TFM e tem a viabilidade de ser operado com apenas um frasco (sem o carecimento de balanceamento do rotor com os demais frascos). Assim, as micro-ondas são direcionadas para um frasco como se fosse um sistema monomodo e, como em uma esquemática multimodo, até 12 exemplares podem ser decompostas simultaneamente. O esquema da parte interna do instrumento e modelo de forno micro-ondas utilizado estão ilustrados na imagem 2.

O sistema usa apenas um magnetron e, de maneira similar a outros sistemas comerciais, permite a depressurização controlada em cada frasco durante o aquecimento. Possui, também, uma esquematização de resfriamento rápido, permitindo a diminuição da temperatura de 180 para 70 °C em menos de 8 min.



Imagem 1. Anton Paar GmbH, modelo Multiwave Go com sistema DMC - Directed Multimode Cavity.

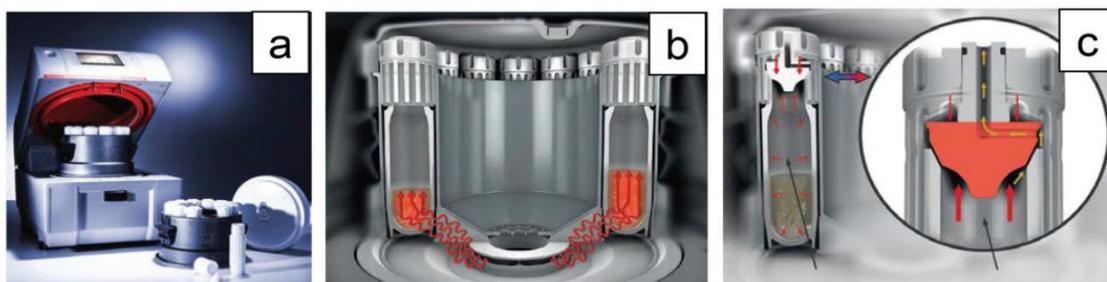


Imagem 2. (a) Sistema para decomposição com radiação micro-ondas no modelo de cavidade com (b) dispositivo multimodo direcionado e (c) sistema de alívio de pressão durante a decomposição (Anton Paar GmbH, modelo Multiwave Go com sistema DMC - Directed Multimode Cavity).

2. 2. Digestão empregando ácido diluído

Dentro do âmbito científico foram propostos diversos métodos visando a decompor de substâncias sólidas adotando o modelo que usa de reagentes oxidantes. Além disso, era comum a adoção de quantidades elevadas de reagentes. Diante da alta utilização de artigos laboratoriais e a baixa frequência de amostragem, os mecanismos de decomposição sendo gradativamente aperfeiçoados dentre as orientações mais impactantes, temos a empregabilidade de processos laboratoriais que não agridem o meio ambiente (MESKO e colaboradores, 2011; BARBOSA e colaboradores, 2015). A utilização e viabilidade de novas metodologias está associada aos desenvolvimentos “técnico-científicos” dos instrumentos empregados em separar amostras, pois possibilita conquistar maior aumento de pressão e temperatura de maneira prudente (KRUG e ROCHA, 2019).

Quando se trata da metodologia antiga envolvemos alto dispêndio de itens e maior volume de substratos ácidos. A prática de adotar HNO_3 diluído vem se mostrando bastante viável. Apesar de ter uma menor capacidade oxidante, apresenta satisfatória efetividade na segregação (ARAUJO e colaboradores, 2002; KUBRAKOVA e colaboradores, 1999). Se o contexto é a efetividade da decomposição com a aplicação de soluções diluídas de HNO_3 , deve se salientar a sua propriedade regenerativa que é viabilizada pela associação das moléculas

de óxido de oxigênio e NO_2 existentes na parte interna da cela ou recipiente (KRUG e ROCHA, 2019).

Portanto, desta maneira a existência de O_2 na área interna do recipiente é essencial para que a reestruturação do ácido aconteça. Então, com base no excerto anterior, é cabível adotar H_2O_2 como reagente contribuinte o qual, além agente oxidante, também age como gerador de oxigênio, aumentando a capacidade de decomposição (KRUG e ROCHA, 2019).

No trabalho publicado por BIZZI et al. (2012) foi investigada a perspectiva de unir O_2 e H_2O_2 como reagentes que auxiliam a decomposição empregando HNO_3 diluído para decompor analitos por micro-ondas (via úmida). Após os experimentos as respostas evidenciaram que o conjunto reacional contendo oxigênio e peróxido de hidrogênio proporcionam eficiência similares quando confrontado com a prática de decompor aplicando ácido concentrado. Ademais, a capacidade cinética sobre a reestruturação do ácido na cavidade interna do recipiente é potencializado com o aquecimento sustentado que as micro-ondas proporcionam.

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

Quando nos referimos a metodologia de gases ionizantes (plasmas) induzidos por micro-ondas temos que ter em mente que sua introdução foi realizada no meio científico em meados de 1950. Entretanto, naquele momento e devido à tecnologia disponível na época os instrumentos apresentavam pouco sensíveis e com complicações na estabilização do plasma quando eram utilizadas amostras líquidas. Tais problemas ocorriam devido à dificuldades na potência do instrumento (200 - 300 Watt) e forma não anelar do plasma. Outras propostas de instrumentos foram sugeridos com o intuito de amenizar ou erradicar esses efeitos, no entanto adversidades como interações gás ionizante com os exemplares líquidos que refletiam em empecilhos com a matriz consideráveis. Outro problema encontrado foi com plasma ter temperaturas baixas. A partir destas ocorrências inúmeros planejamentos instrumentais entraram em pauta, porém o instrumento comercializado que se mostrou mais adequado e estável foi colocado no mercado em 2012 pela empresa Agilent

Technologies (versão 4100 MP-AES). Este equipamento é construído com base na cavidade osciladora “*Hammer*”, empregando uma válvula eletrônica, o “*Magnetron*” o qual é o propulsor do estímulo. Ademais a operação se dá com o uso de nitrogênio gasoso (HAMMER, 2008, JANKOWSKI e RESZKE, 2011; WILLIAMS e colaboradores, 2019). Esta ideia de arquitetura apresentou diversas vantagens, como o tamanho reduzido do instrumento, facilidade de operação e menos custoso.

2.3.1. Estrutura Instrumental

O gás de excitação é mantido por N₂, o qual pode ser oriundo atmosféricamente por meio de uma esquemática que separa o gás de interesse dos demais contidos no ar (GONÇALVES e colaboradores., 2016a). Na imagem 3 são descritos os itens primordiais do MIP OES. A princípio existe o módulo responsável por introduzir a amostra (a) bomba peristáltica (b) nebulizador e (c) câmara de nebulizadora ciclônica. Na sequência está presente a tocha de quartzo (d) ligada ao aparato responsável por inserir o N₂, o guia de ondas responsável por gerar campos eletromagnéticos e posteriormente promover o plasma estável e a resposta transmitido pela amostra. Nesta modelagem a tocha tem orientação em formato vertical e a visão é axial, a radiação está posicionado com o apoio de um concerto de espelhos para um monocromador sequencial Czerny-Turner (e). Após o arranjo anterior temos uma rede de difração que nos possibilita realizar leituras em certas faixas de comprimentos de ondas (178 a 780 nm) está que seleciona intensidades da escolha do analista que são identificados com auxílio do (f) sensor semiconductor para captação de imagens (CCD) (GONÇALVES e colaboradores, 2016).

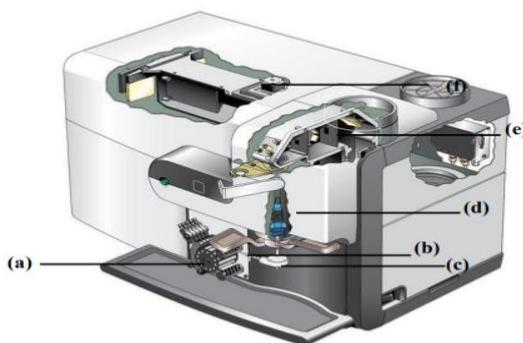


Imagem 3. Estrutura e itens do MIP OES.

Nos instrumentos de espectrometria de emissão óptica com emprego de plasma induzido por micro-ondas em referência aos outros instrumentos apresenta benefícios como operação com pouco dispêndio financeiro, possibilidade de determinações multielementar, tranquila manipulação e não opera com gases inflamáveis. O gás ou plasma que fomenta a excitação a base de N_2 opera em temperaturas da ordem de 5000 K que é superior que do N_2O empregado na espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Apesar disso os níveis térmicos do plasma de N_2 é inferior da gerada por um de argônio utilizado no ICP OES convencional. Assim, uma das desvantagens é o instabilidade no plasma por conta dos rearranjos que podem desencadear nesse ambiente. A geração do plasma em MIP OES pode ocorrer de formas distintas. No modelo da Agilent, ela ocorre dentro de um aparato chamado de cavidade Hammer. É um guia de ondas no qual as micro-ondas atravessam e, pelo seu desenho, há promoção do campo eletromagnético que sustenta a excitação do gás do plasma, neste caso o N_2 .

Além disso, substâncias orgânicas colaboram com o acúmulo de carbono na tocha, sendo também plausível a deposição em seu sistema óptico. Determinados estudos (AMAIIS e colaboradores, 2013; DONATI e colaboradores, 2013) reportarem empregar em seus ensaios um complemento denominado “EGCM” que permite a injeção de ar no plasma, reduzindo o sinal de fundo, equilibrando o plasma quando ocorre a inserção de analitos orgânicos.

2.3.2 Relevância da determinação de nutrientes inorgânicos

Quando se trata da administração e trato dos peixes é de grande impacto prontificar da presença ou necessidade de algumas substâncias inorgânicas. A despeito de não se determinar sua total necessidade, consumir e absorver diversos nutrientes é fundamental para homeostase do fisiológica e saúde do peixe (MORAES e ALMEIDA, 2020).

Minerais e as vitaminas são nutrientes imprescindíveis para o normal funcionamento dos processos biológicos e para a manutenção da higidez animal. A exigência nutricional em minerais dos peixes é atendida, em grande parte, pela absorção pelas brânquias e pele. Esta absorção pode ser afetada pela composição química da água e pelas características das espécies (NRC, 1993).

Existem suplementos minerais e vitamínicos comerciais específicos para peixes nas suas diferentes fases do ciclo de vida. No entanto, há necessidade de pesquisas para o melhor entendimento da ação de minerais e vitaminas sobre o crescimento, ciclo reprodutivo e higidez dos peixes.

As substâncias inorgânicas são conhecidos como macroelementos que estão e são quantitativamente mais requisitadas pelo organismo, já os microelementos são requisitados em menor teor (TÜRKMEN e colaboradores, 2009). Também neste pressuposto, o monitoramento dos teores desses nutrientes influenciam no funcionamento e controle dos sistemas e organismo do animal. Sobre esses componentes foram colocadas e analisadas importâncias fisiológicas de alguns nutrientes como o Ca, P, Mg, Na, K e Fe, Mn, Zn e Cu.

Se o tema a ser discutido é cálcio (Ca), que é considerado um agente imprescindível metabolicamente. Este nutriente detém funções como desenvolver e crescer estruturas esqueléticas, coagular o sangue, controlar atividades musculares e hormonais (MORAES e ALMEIDA, 2020). Segundo estudos, os peixes podem obter o cálcio via alimentação pela absorção no intestino ou na água. Com isso quantidades descontroladas e elevadas de cálcio segundo WILSON e GROSELL (2003) acumula-se como CaCO_3 e expelido com a finalidade de proteção renal, entretanto a excreção em excesso pode acarretar nefro litíase. A ausência de Ca tem como consequência a ocorrência de anorexia, restrição do crescimento e redução na eficiência alimentar.

Entre os minerais, o fósforo é o gerador de maior número de pesquisa. Os peixes podem absorver da água praticamente 100% dos minerais que necessitam para o conforto fisiológico exceto o fósforo, mas existem evidências que os minerais disponíveis na água não são suficientes para satisfazer os elevados níveis de exigência nutricionais impostos pelos sistemas de produção, sendo necessário suplementá-los por meio da ração, principalmente o fósforo (Miranda e colaboradores. 2000; Furuya et al., 2001b).

O fósforo (P) é um outro nutriente de grande impacto no animal, pois sua presença no organismo considerada primordial para estruturação óssea, está contido na estrutura da adenosina trifosfato e age como auxiliar nos

controlador do pH fisiológico. Assim quando a administração ou existência deste nutriente é nula distúrbios como deformação no esqueleto, carência de minerais nos ossos, redução no crescimento e a eficácia alimentar são evidenciados (ROCHA, 2016; SUGIURA e colaboradores., 2004).

Segundo QUINTERO-PINTO e colaboradores (2011) o fator junção e correlação de cálcio e fósforo é primordial para qualidade do organismo dos peixes. Estes elemento são os mais presentes na constituição óssea, eles também marcam presença em diversas etapas da fisiologia dos animais. Desta maneira existe uma atenção sobre a composição das dietas no que tange ao teor de Ca/P ao dispor, como representado no trabalho de MIRANDA e colaboradores (2000) estudaram Ca/P em rações dadas a *Oreochromis niloticus* (tilápia). Dentro deste projeto foi constatado que a administração de Ca e P na ração contribui significativamente de forma positiva na performance estrutural e metabólica do animal. Há relatos que ambos, cálcio e fósforo, desempenham função de grande impacto em manter o equilíbrio da estrutura dos ossos, em outros termos, da modelagem dos ossos.

O elemento potássio é um agente que realiza a conservação da célula, gerador dos estímulos nervosos e também estabiliza líquidos fisiológicos (SANTOS, 2007; LIANG e colaboradores, 2012). Também foi elaborado uma abordagem para casos da ausência desses elementos e uma anorexias podem ser geradas. Outro ponto denotado foi sua capacidade de afetar no desenvolvimento sendo também já contatados o aumentos de casos de óbito (LIANG e colaboradores, 2012; TACON, 1992). Conforme ZHU e colaboradores. (2006) em rios, lagos ou represas doce a fração viável de potássio é baixa. Seguidamente o término do ensaio, a conclusão dada pelos pesquisadores foi de que nutrir com potássio as águas é de extrema importância para as necessidades do animal, portanto a administração via dieta é de pequena relevância.

A deficiência nutricional em ferro resulta em redução da hemoglobina, hematócrito, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média, indicando ocorrência de anemia microcítica e hipocrômica. Ao generalizar a ausência de Fe ocasiona na diminuição do crescimento e eficácia nutricional além de promover anorexia, convulsões e morte (FENG e colaboradores, 2019).

O seguinte nutriente que tem grande relevância é o magnésio, pois exerce papel impreterível no movimento de geração de massa óssea, manutenção metabólica celular e na ação das enzimas (BIJVELDS e colaboradores, 1998; SANTOS, 2007). Quando ocorre a carência de sua administração consequências como anormalidade no conteúdo ósseo e por consequência no crescimento além de causar anorexia, convulsões e catarata podem ser constatadas(TACON, 1992).

Quando se refere ao manganês temos uma gama de relações envolvendo muitos fenômenos bioquímicos, como ser um constituinte importante de enzimas como no caso da arginase, a mesma que é uma enzima fundamental para o processo de Detoxi do organismo (LORENTZEN e colaboradores, 1996). Em momentos da sua ausência o crescimento é reduzido, também o apetite, mal formação de partes corporais e óbitos (LORENTZEN e colaboradores, 1996; TACON, 1992). Sobre o zinco temos que constar sua relação com a insulina, além disso é também responsável no estímulo de desenvolvimento estrutural do animal (NGUYEN e colaboradores, 2008; TACON, 1992). De acordo com SATOH e colaboradores (1983) um organismo animal com carência de zinco poderá encontrar problemas como redução em processos crescimento, apetite, dificuldade em se curar e acréscimo na taxa de mortalidade.

Alguns trabalhos envolvendo a análise das concentrações de zinco e cobre nos protocolos alimentares e nas regiões musculares dos peixes estão voltados para os seus teores, pois em elevadas concentrações indícios de toxicidade são constatados. Em um estudo produzido por ZAFARZADEH e colaboradores (2017) ao analisar teores de chumbo, zinco, cádmio e cobre em amostras coletadas de "Cyprinus carpio" (carpas) notaram grandes teores especialmente para o zinco, Cobre e chumbo. Porém o cobre papel no metabolismo do sistema enzimático e quando não suplementado ou em situações de ausência, é constatado uma redução no crescimento e agente causador de catarata (SANTOS, 2007; TACON, 1992). Em espécies como as tilápias a deficiência ou o demasia de cobre (320 mg Cu kg⁻¹) na dieta não determinam alterações no desempenho produtivo e na hematologia, mas as quantidades de cobre no fígado é influenciada pelos níveis desse mineral na dieta. A concentração elevada do cobre na dieta induz alterações hepáticas e o

tempo é fator determinante da ação detrimental do cobre para respostas fisiológicas do peixe (Ferrari e colaboradores, 2004).

Se temos o caso de trabalhos envolvendo o zinco, em determinadas espécies participa como componente ativo ou cofator para importantes sistemas enzimáticos. A exigência em zinco para ganho de peso em “*Oreochromis niloticus*” (tilápia) foi estimada em 79,5 mg Zn kg⁻¹ e sua deficiência altera negativamente os parâmetros hematológicos, a atividade da fosfatase alcalina e os níveis plasmáticos do mineral, havendo variação na sua absorção de acordo com a fonte utilizada (Sá et al., 2005).

Se orientando com demandas atuais contagem das concentrações das espécies inorgânicas é necessária. Para determinar com emprego de técnicas espectroscópicas em específico o MIP OES as amostras precisam estar na líquidas. Dessa maneira, neste estudo desenvolvido com proveito de ácido diluído para a digerir rações de peixes e determinar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, considerando outras substâncias foi priorizada, foi planejado e validado um processo para preparar amostras de rações de peixe com o propósito de determinar macro e micro componentes.

Para tornar autêntico um procedimento laboratorial quando há interesse de afirmar que a metodologia é adequada e ampla na prática escolhida (INMETRO, 2016). Por normativa validar ou autenticar é designado como confirmar por exame e fornecer evidência que os requisitos específicos para um dado é atendido (ABNT NBR ISO:IEC 17025). Neste âmbito são analisados algumas normas performáticas tal qual são a seletividade, limites de detecção e de quantificação, precisão, veracidade, linearidade e faixa de trabalho.

2.4.1 Seletividade

Refere-se a competência do processo científico em identificar e quantificar o analito escolhido previamente pelo analista na presença dos demais componentes da amostra. Quando é referenciado os métodos de identificação, pode ser traduzido como a verificação de um sinal positivo para o componente escolhido e um sinal negativo para os demais componentes da matriz. Deste modo. Por conseguinte, a seletividade é o indicador que demonstra a

competência do método em aferir o analito ou mesmo na presença de supostos interferentes presentes na matriz (INMETRO, 2016; MAPA, 2011).

Com base nisso para uma considerável e aceitável análise da seletividade em termos quantitativos é acompanhado ou atrelado a alguns pontos a serem seguidos. Uma maneira de analisar a performance é promovendo um estudo do efeito matricial, este dado fundamenta-se em promover a estruturação de uma curva apresentando o analito e matriz e a outra ausente de ambos.

2.4.2. Linearidade e Faixa de trabalho

Para a examinar a linearidade segundo EMEA (1995) é considerado a capacidade da metodologia analítica, quando se considera um intervalo onde os dados obtidos pelas leituras detém uma proporcionalidade com base nos teores dos elementos presentes nas amostras.

Se estamos considerando uma determinada faixa de estudo ou trabalho para uma metodologia, nos referimos um máximo ou mínimo da mesma, ou seja, o teor obtido da substância no exemplar do qual foi demonstrado tem que prover adequadas linearidade, veracidade e precisão (INMETRO, 2016). Já quando o assunto é a faixa linear de trabalho, temos que encontrar uma coerência entre concentração e resposta do instrumento. Outrossim, o quão sensível pode ser considerado o método é demonstrada ou evidenciado matematicamente pela inclinação da curva e apresenta o grau de variação na intensidade por meio da variação das concentrações analisadas.

Sobre a curva de calibração, ela comumente é adquirida com emprego do método dos mínimos quadrados (MMQ). Portanto é apresentada pela equação 1.

$$Y= ax + b \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde:

- Y resposta instrumental
- a é o coeficiente linear x é a teores dos padrões adotados
- b é o coeficiente angular da reta

Características ligadas a linearidade está ilustrado na imagem 4:

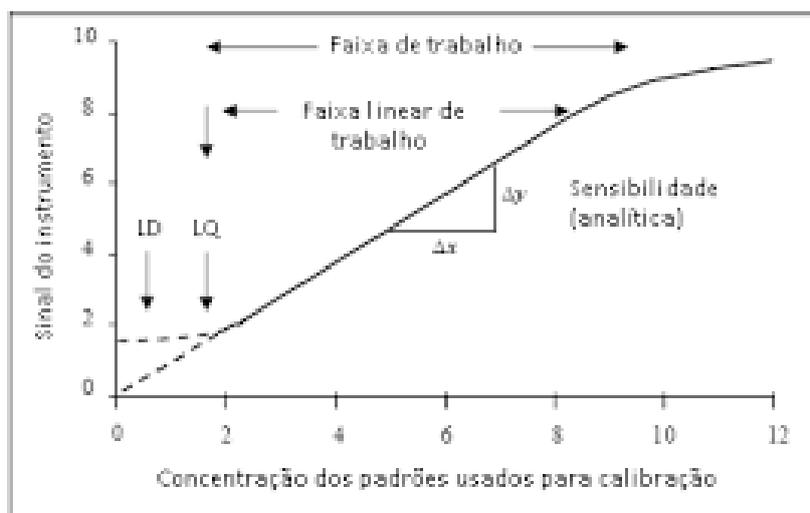


Imagem 4. Ilustração de uma curva analítica padrão e seus principais fatores. Fonte: (INMETRO, 2016).

2.4.3. Limites de Detecção e Quantificação

Sobre o limite de detecção (LOD) de um procedimento analítico segundo EMEA (1995) é a mínima quantia do analito na amostra que é identificada, isso não implica que é aquela quantificada. Conseqüentemente o limite de quantificação (LOQ) é definido como a parcela mínima que é quantificada com excelentes performance de precisão e veracidade. As equações A e B são as comumente adotadas para determinar os limites de detecção e quantificação.

$$(A) LOD = 3,3 s/b \quad \text{Eq.(2)}$$

$$(B) LOQ = 10 s/b \quad \text{Eq.(3)}$$

Onde: s é o desvio padrão da leitura do branco b é o coeficiente angular da reta.

2.4.4 Veracidade

O manual de metrologia define a veracidade como o estágio de relação entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Logo, ela pode ser caracterizada como a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (INMETRO, 2016; MAPA, 2011). A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção. A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade. Não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra, com base nisso não podemos considerá-la uma grandeza estimável, por isso é realizado a análise levando em conta os cálculos de recuperação (INMETRO, 2016). Por isso recomenda-se fortemente que seja empregado na determinação analítica um Padrão Interno (composto, comumente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito). Para opção de uma melhor procedimento é considerados os fatores adequados para o método.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq.(4)}$$

O valores a serem analisados podem ser obtido pela equação 4. A aceitação devem seguir alguns requisitos com base recuperação, portanto estão atrelados à faixa de concentração de um ou mais componentes contidos na amostra (MAPA, 2011).

Onde:

C1: teor do analito no exemplar tratado.

C2: teor do analito no exemplar não tratado.

C3: teor do analito aplicado ao exemplar tratado.

2.5.5. Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou

padrões, em condições definidas. As três formas de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou interlaboratorial) e da reprodutibilidade. A reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada através da participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo.

O padrão de aceitação da precisão é justificado por análises estatísticas, como no caso desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), este ponto é o fator que possibilita a fazer a análise e quantificação sobre a precisão. A maneira matemática de obter este desvio é utilizando a equação (5).

$$\text{DPR} = \text{CV} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ Eq.(5)}$$

Onde:

- S implica no desvio padrão das medidas.
- \bar{x} é a média das leituras efetuadas.

Para se determinar a repetitividade deve-se preparar e analisar um grupo de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar. Para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes. Posteriormente é recomendado calcular a concentração determinada para cada amostra replicada, as concentrações médias, os desvios-padrão de repetitividade e os coeficientes de variação de repetitividade das amostras fortificadas em cada nível de concentração. Determinar também, por nível, a concentração média, o desvio padrão de repetitividade e o coeficiente de variação (CV) para as amostras fortificadas em cada nível de concentração

Quando o assunto é precisão intermediária assim como a repetibilidade, ela faz denota as análises das leituras de acordo com alguns requisitos, como a variação de alguns fatores como variar o responsável pela leitura, a data da leitura e se viável o instrumento de análise. Portanto podemos considerar ambas como uma via para demonstrar (precisão intermediária e repetibilidade) como as responsáveis por determinar variabilidade do procedimento no mesmo laboratório. No caso da reprodutibilidade temos como resposta uma variação dos resultados de forma interlaboratorial. Assim sendo em laboratórios diferentes a

metodologia é adotada e comparamos os dados obtidos com base em DPR (EMEA, 1995).

2.5.6 Incerteza

A incerteza de medição é o parâmetro associado a um dado obtido e que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mesmo (VIM, 2007). A incerteza associada ao valor medido é resultante de erros originados nos vários estágios da amostragem, da preparação de amostra, da análise e do conhecimento imperfeito de fatores que afetam o resultado contribuindo para que ele se desvie do valor verdadeiro. Assim sendo, a incerteza de medição caracteriza a faixa de valores, dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança específico, sendo essa expressa como um desvio-padrão ou um múltiplo calculado do desvio-padrão.

A necessidade dos laboratórios de ensaios em implementar um procedimento sistemático para estimar a incerteza em suas medições fez com que surgisse o documento de referência denominado Guia para Expressão da Incerteza de Medição da ISO, conhecido como ISO GUM. Esse documento demonstra que a incerteza de valores medidos incorpora diferentes fontes de incerteza que surgem de efeitos aleatórios e para as quais são atribuídos valores de contribuição (variâncias). O ISO GUM propõe a aplicação da lei da propagação da incerteza na combinação dessas diferentes fontes para se obter um valor global denominado de incerteza combinada. O procedimento descrito no ISO GUM é válido na maioria dos casos, porém pode se tornar complexo em modelos de resposta não lineares, quando o número de graus de liberdade não podem ser obtidos (inaplicabilidade da fórmula de Welch-Satterthwaite) e quando a contribuição tem distribuição de saída (distribuição de probabilidade) cujo valor de variância não possa ser facilmente obtido para um dado faixa de aceitabilidade (BIPM, 2007).

3. Objetivos

Realizar a validação de uma metodologia de preparo de amostras de rações de peixe, com intuito de qualificar e quantificar os macros e micronutrientes em MIP OES e gerar dados pertinentes a componentes e elementos.

3.1. Objetivos específicos

- Elaborar e validar procedimento para o preparo e determinar de macro e micro componentes em amostras de ração de peixe por MIP OES;
- Realizar a determinação de compostos inorgânicos (Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Zn e Cu) contidos em dietas;
- Seguir as normas de redução na demanda reagentes, aplicando os protocolos ambientalmente favoráveis;
- Fazer análises de macro e micronutrientes nas amostras de ração e de peixe.

4. Material e Métodos

4.1 Instrumentos

No experimento utilizou-se um aparelho de digestão sustentado por radiação micro-ondas em ambiente fechado (Multiwave Go Plus, Anton Paar, Graz, Áustria) que detém de 12 posições em seu rotor. As respostas das leituras foram feitas MIP OES (4200 MP AES, Agilent Technologies, Melbourne, Australia), o qual tem acoplado em sua estrutura um maquinário que fornece o nitrogênio N₂ (Agilent Technologies, modelo 410) e um sistema de bombeamento de soluções que suporta cinco canais. Inicialmente para análise e leitura experimental foi estudado 2 comprimentos de ondas para cada analito. Os comprimentos de onda escolhidos para análise estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Comprimentos utilizados para cada um dos analitos.

<i>Analitos</i>	<i>Comprimentos de ondas (nm)</i>
Ca	317.933
P	213.618
Mg	279.553
Na	568.820
K	766.491
Cu	327.993
Mn	403.076
Fe	371.993
Zn	213.857

4.2. Reagentes

Para conclusão deste estudo preparou-se usando água deionizada adquirida de um maquinário purificador de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) as soluções de análise. Os materiais empregados na análise foram previamente lavados e desmineralizados imersos em HNO₃ 10% (v/v) após um período de 24 horas, e posteriormente a lavagem foi feita com água deionizada e desmineralizada e secagem em capela de fluxo com trajetórias de deslocamento em linhas paralelas.

Na etapa de digestão foi empregado HNO₃ ultrapuro, obtido por um aparelho do modelo BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha) (Fig. 4) e H₂O₂ 30% (m/m) (30%., Sigma-Aldrich, Alemanha). Já as soluções empregadas nas construções das curvas analíticas de calibração foram feitas diluindo as soluções padrão comerciais de 1000 mg L⁻¹ de Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Na. No procedimento de validar a metodologia foi feito o emprego do padrão MR-Agro E1002a. O ácido nítrico empregado no procedimento foi purificado para ser utilizado em alta pureza, a imagem 5 apresenta o instrumento utilizado para sua destilação.

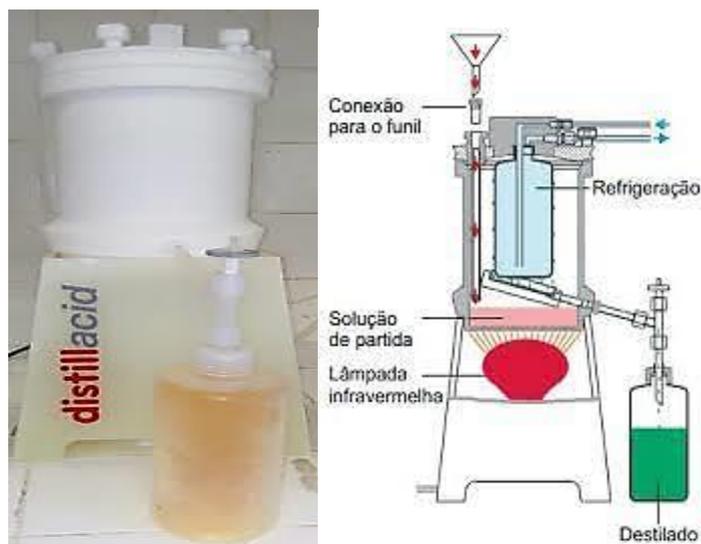


imagem 5. Equipamento de purificação por destilação subboiling (distillacid- Berghof) e seu processo gerador de ácidos de alta pureza o qual é empregado na determinação de elementos em níveis de ultra traços.

4.2.1. Amostra - Digestão

Amostra do CRM de ração de peixe produzida pela Embrapa (MR-Agro E1002a) foi digerida em seis replicatas em forno sustentado por radiação micro-ondas com aparato selado. Foram usados 150 mg do exemplar, 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}).

A adoção do ácido diluído foi feito como alternância das normas originalmente definidas para validar a metodologia de digestão assistida por micro-ondas (EDGELL, 1989). Posteriormente os parâmetros de aquecimento usada foram: subida por 10 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, estágio de 10 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Seguidamente uma subida de 10 min a $185 \text{ }^\circ\text{C}$ e estágio de 10 min a $185 \text{ }^\circ\text{C}$ e 10 min de redução de temperatura. Após digerir, os produtos foram colocados em frascos de polipropileno e preenchidos até 30 mL com água deionizada.

5. Resultados

5.1 Aplicação analítica

5.1.1 Limites de Detecção e Quantificação

A metodologia de validação empregada e seus respectivos cálculos foram ilustrados e apresentados, além disso estão de concordância com a referência orientadora “INMETRO (2016)”. Com base nisso para calcular LOD e

LOQ empregando a metodologia simplificada utiliza as equações 2 e 3 que estão elencadas no item 2.3.3, aqui 10 respostas de brancos foram consideradas. As respostas das medidas efetuadas estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as determinações por MIP OES.

Elementos	LOD (g kg ⁻¹)	LOQ (g kg ⁻¹)
Ca	0,01	0,03
P	0,06	0,20
Mg	0,001	0,005
Na	0,01	0,05
K	0,01	0,02
	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Cu	0,34	1,13
Mn	0,04	0,14
Fe	0,77	2,56
Zn	1,43	4,73

5.1.2 Linearidade

Quando nos referimos a linearidade podemos a definir como forma da metodologia reproduzir dados lineares e estatisticamente seguindo uma proporção ao teor do analito (BRITO et al., 2003). Então, podemos avaliar se a metodologia é linear com base no coeficiente de determinação (r^2).

Neste sentido a realização do experimento deve ser prosseguido com no mínimo 5 níveis de concentrações diferentes, neste estudo foram utilizados 8 níveis de concentrações para macro e micronutrientes, respectivamente. Na Tabela 3 apresenta os dados para a avaliar a linearidade dos analitos, a equação da reta determinada a partir dos dados além dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

Tabela 3. Curvas e suas respectivas equações para os analitos analisados nas amostras de MR-Agro E1002a de ração peixe e determinados por MIP OES.

Elementos	Equação da reta	R ²	Faixa dinâmica linear (mg L ⁻¹)
Ca	Y= 552,88x + 343,69	0,9981	0,5 - 20
P	Y= 380,001x + 14,37	0,9941	0,5 – 20
Mg	Y= 31920x + 3137,5	0,9999	0,5 – 20
Na	Y= 331,21x + 23,25	0,9932	0,5 – 20
K	Y=86669x + 22615	0,9990	0,5 – 20
Cu	Y= 106425x + 994,6	0,9952	0,1 – 10
Mn	Y= 70030x + 2739,6	0,9983	0,1 – 10
Fe	Y= 27531x + 527,64	1,0000	0,1 – 10
Zn	Y= 15230x + 554,72	0,9986	0,1 - 10

5.1.3 Veracidade

No estudo realizado, analisamos a veracidade do método com base nos valores dos CRMs de ração de peixe (MR-Agro E1002a). Os valores obtidos e os de referência para CRMs estão elencados nas Tabela 3. As respostas de recuperações obtidas foram satisfatórias das quais variam entre 82 e 108%, o que demonstra que o estudo promovido apresenta veracidade considerável para os nutrientes escolhidos para análises.

Tabela 4. Resultados dos dados de referência e os da leitura para CRM de ração de peixe (MR-Agro E1002a) obtidos via MIP OES.

Elementos	Dados de referência (g kg ⁻¹)	Dados da leitura (g kg ⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	28,65 ± 1,84	26,30 ± 1,72	91,82
P	16,06 ± 0,97	17,38 ± 0,90	108,21
Mg	1,55 ± 0,16	1,53 ± 0,05	98,88
Na	2,16 ± 0,19	2,31 ± 0,03	107,08
K	5,86 ± 0,31	5,79 ± 0,08	98,87
	Dados de referência (g kg⁻¹)	Dados da leitura (g kg⁻¹)	
Cu	10,51 ± 0,87	9,05 ± 0,26	86,17
Mn	19,46 ± 2,12	19,93 ± 0,91	102,46
Fe	231, 97 ± 20,17	197,93 ± 8,37	85,32

Zn	129,56 ± 6,79	106,81 ± 4,00	82,43
----	---------------	---------------	-------

6. Conclusões

Sendo a alimentação o item de dispêndio de maior custo e fundamental em uma piscicultura, o conhecimento dos principais modelos de validações de dos protocolos alimentares e suas formas de processamento é de grande impacto e interesse para julgar se ração é a mais adequada em uma piscicultura.

O protocolo escolhido para o trabalho com a digestão assistida por radiação micro-ondas em meio de ácido nítrico diluído foi considerável eficácia quando nos referimos na capacidade de decompor amostras de rações de peixes. O equipamento de análise MIP OES se apresentou eficiência para determinar os macros e micronutrientes escolhidos nas amostras selecionadas, com rigor apropriado, apresentando um indicativo viável para avaliar dietas utilizando o MIP OES.

Portanto, por proporcionar veracidade e precisão satisfatórias, o estudo dos analitos inorgânicos nas amostras de rações de peixe por MIP OES supriram as exigências e normas regulamentais com êxito. Logo a desta metodologia para o preparar amostras de ração e também possibilitar a leitura do elementos por MIP OES em amostras revelou-se apropriada e eficaz.

7. Bibliografia

Autoria: PEDROZA FILHO, M. X.; FLORES, R. M. V.; ROCHA, H. S.; SILVA, H. J. T. da; SONODA, D. Y.; CARVALHO, V. B. de; OLIVEIRA, L. de; RODRIGUES, F. L. M. – piscicultura

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215540/1/CNPASA-2020-bpd25.pdf>

KRUG, F. J.; ROCHA; F. R. P. Métodos de Preparo de Amostras para análise Elementar, 2ª. Ed. SBQ, São Paulo, 2019.

GONZALEZ, MH; SOUZA, G.B.; OLIVEIRA, R.V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A. R. A. Procedimentos de digestão assistida

por microondas para amostras biológicas com ácido nítrico diluído: Identificação de produtos da reação. Talanta, 79 (2009), 396 – 401.

Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias / T113 Editor Wilson M. Furuya.
-- Toledo: GFM, 2010. 100 p.

AGILENT TECHNOLOGIES. Espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas Agilent 4200. Agilent Technologies, Inc., 2015.

ARAUJO, G. C. L.; GONZALES, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. N. A. e NOBREGA, J. A. efeito da concentração de ácido na digestão assistida por microondas em frascos fechados de materiais vegetais. Spectrochimica Acta Parte B: Espectroscopia Atômica, 57(2002), p. 2121-2132.

BIZZI, C. A. Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação microondas. Santa Maria: Programa de Pós-graduação em Química – UFSM, 2012. Tese de doutorado, 164 p.

DIAS, E. A. LANDGRAF, R. L. RODRIGUES, A. P. O. NOGUEIRA, A. R. de A. Desenvolvimento e validação de método para a determinação de ítrio empregado como marcador em estudos de nutrição de peixes.- <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1134371>.

VIM, 2007 - VIM – GUIA ISO/IEC 99:2007.

BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP e OIML. “Avaliação de dados para medição – Guia para a expressão de incerteza na medição”, JCGM 100:2008, 2008b.

8. Agradecimentos

- GAIA
- Embrapa Pecuária Sudeste
- CNPq.
- FAPESP.
- BRS Aqua.
- INCTAA
- UFSCar.