

5 Materiais e métodos

5.1 Descontaminação do material

Todo o material empregado, no preparo e na análise da amostra, sofreu uma descontaminação para assegurar-se, que não houve retenção de selênio nas suas paredes. Primeiro fez-se uma boa lavagem dos mesmos, com detergente e água; a seguir, colocou-se de molho em solução a 10% de Extran por no mínimo, 24 horas. Decorrido este período, lavou-se o material com água deionizada e por fim deixou-se de molho em solução a 15% de HNO₃ por no mínimo 24 horas, ou até a hora do uso.

Tanto os frascos de digestão quanto as ponteiras e cubetas utilizadas no forno de grafite passaram por este processo antes de todas as análises.

5.2 Metodologia de coleta e preparo da amostra

Durante os anos de 2000 e 2003, foram coletadas no estuário de interesse, com auxílio da colônia de pesca da Praia de Mauá, as seguintes espécies de peixe: *Micropogonias furnieri* (Demarest, 1823) (N=34) – corvina, peixe bentônico carnívoro; *Bagre spp.* (N=14) – bagre, peixe bentônico onívoro; *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (N=31) – tainha, peixe bentônico planctívoro; e a espécie de mexilhão: *Perna perna* (Linné, 1758) (N=40) – mexilhão, bivalve filtrador, que foram obtidos em três pontos distintos da Baía de Guanabara (Marina da Glória, Praia da Boa Viagem e Ponte Rio Niterói), de modo a se poder determinar a concentração de selênio total no tecido muscular, fígado e gônada de cada peixe e nos tecidos moles de mexilhão.

Após cada coleta, os peixes foram preparados de acordo com as recomendações da FAO (FAO/SIDA, 1983). Especial atenção foi dada à limpeza e uniformidade das amostras. Os parâmetros bióticos (peso, comprimento total e

sexo) de cada indivíduo foram tomados. A seguir, foram retirados os músculos dorso laterais esquerdo, o fígado e as gônadas de cada indivíduo. As amostras de tecido muscular foram liofilizadas, perdendo aproximadamente 75% de água. A metodologia de coleta e preparo da amostra é esquematizada na Figura 16.

As amostras de mexilhão foram coletadas manualmente, com auxílio de estiletes e foram preparados de acordo com as recomendações da FAO (FAO/SIDA, 1983). Após a medida da concha e pesagem dos tecidos moles de cada indivíduo, fez-se uma amostra composta homogênea de aproximadamente 10 indivíduos por amostra. As amostras de tecidos moles foram liofilizadas, perdendo aproximadamente 80% de água. Estas então, sofreram o mesmo tratamento pré-analítico das amostras de peixe descrito na Figura 16.

5.3

Estudo do método empregado

Para se avaliar a exatidão e a precisão da metodologia empregada, realizou-se uma comparação interlaboratorial com o Dr. G. Alfthan do Finish National Public Health Institute (FNPHI), que é um laboratório de referência analítica para selênio. Com a mesma finalidade, cada batelada de análise foi acompanhada por materiais certificados de referência fornecidos pelo National Research Council Canadá (DORM-2, tecido muscular) e pelo National Institute for Science and Technology (EUA, NIST 2976, tecidos moles de mexilhão). Estes padrões, cujos teores de selênio são conhecidos, foram escolhidos por apresentarem matrizes semelhantes às dos organismos marinhos analisados neste trabalho.

5.3.1

Pré-tratamento dos padrões

Para a determinação de elementos traço em amostras biológicas, é necessário um pré-tratamento que destrua toda a matéria orgânica, mas retenha o elemento de interesse. Como qualquer procedimento analítico, este não deve introduzir erros apreciáveis. Um dos métodos bastante usados para a destruição da

matéria orgânica é a oxidação úmida (digestão ácida) que, em alguns casos, é efetuada em bomba de teflon sob pressão (Deaker & Maher, 1997). Neste trabalho aplicou-se a seguinte técnica de digestão da amostra liofilizada ou úmida para a determinação de selênio total:

- Pesar aproximadamente 0,1 g de amostra seca ou 0,2 g de massa úmida;
- Adicionar 2,0 mL de HNO₃ concentrado;
- Deixar “overnight” em tubo de pirex[®] fechado;
- Aquecer por 2 h a 60 °C em banho-maria em sistema fechado;
- Resfriar a temperatura ambiente;
- Fazer a leitura da amostra diluída 5 vezes no AAS ZEEnit 60 (Analytic

Jena).

Uma boa recuperação dos padrões foi observada, comprovando assim a eficácia da digestão aplicada (Tabela 10).

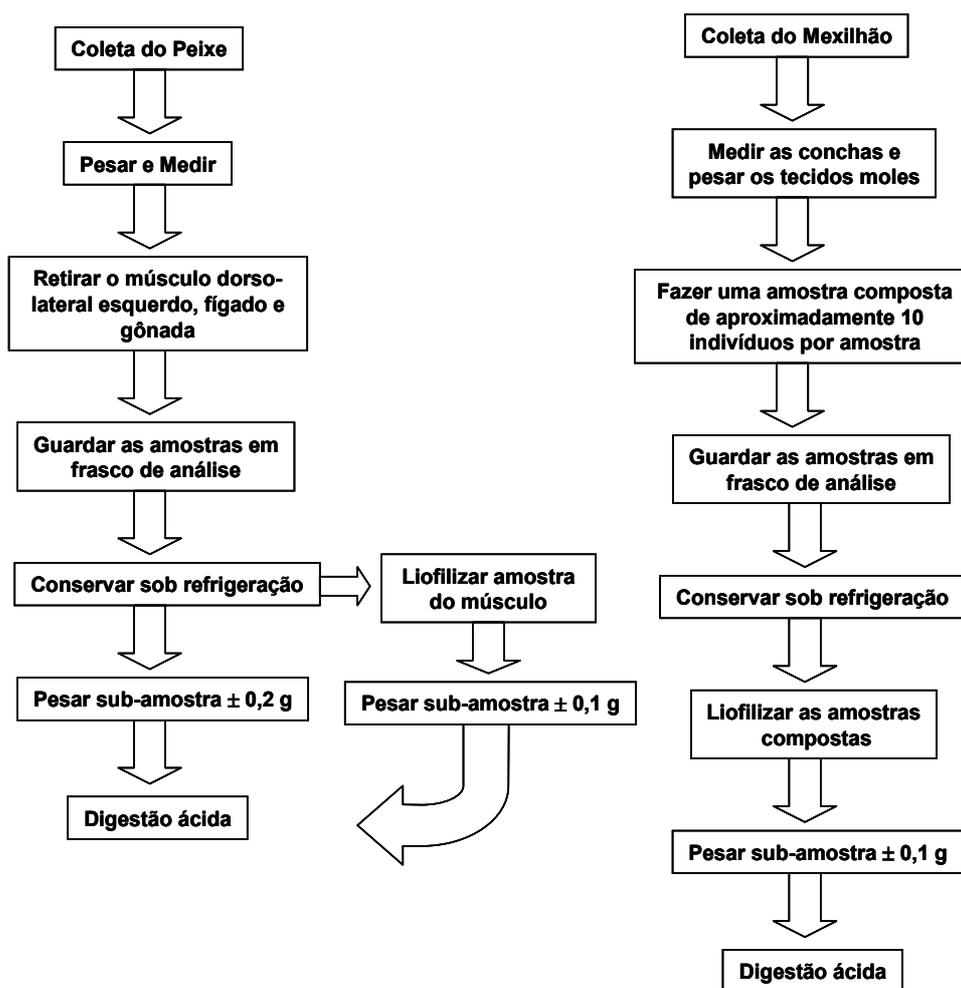


Figura 16. Metodologia de preparo das amostras.

5.3.2 Análise dos padrões

Da solução digerida preparada, descrita no item anterior, tomam-se 200 μL e colocam-se na cubeta do amostrador, adicionando-se a esta 800 μL de água milli-Q.

Foram otimizados parâmetros instrumentais e condições analíticas para a determinação de selênio no forno de grafite, visando-se à aplicação dos mais adequados em algumas amostras de material biológico contendo selênio em nível de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A metodologia analítica empregada neste estudo baseou-se naquela descrita por Deaker e Maher (1997), porém, sofreu algumas adaptações analíticas às condições de trabalho desta dissertação. Para a determinação de selênio total nas amostras foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica da Analytik Jena AG, modelo ZEE nit 60, equipado com corretor Zeeman de “background”, forno de grafite (pirolítico) com plataforma PIN e um auto amostrador AS52 calibrado para 20 μL . Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de catodo oco (LCO) operada segundo as recomendações do fabricante (Analytik Jena AG). Foi utilizado Pd modificador (Merck) como modificador químico.

A leitura, do valor de absorvância, foi feita em área, integrando-se o pulso de absorção obtido uma vez que o sinal obtido será sempre transiente, já que a massa de analito introduzida no forno é sempre uma massa definida, limitada. A integral da absorvância em relação ao tempo é proporcional ao número total de átomos no caminho ótico, enquanto que a absorvância máxima (altura) do sinal é proporcional à densidade máxima dos átomos alcançada, em um dado momento, no caminho ótico.

As condições de operação do equipamento encontram-se na Tabela 7. As etapas do programa de temperatura empregado (Tabela 8) foram otimizadas experimentalmente, por construção das respectivas curvas de pirólise e atomização (Figura 18). Na primeira curva, faz-se variar a temperatura da etapa de pirólise, enquanto a temperatura de atomização é mantida constante. O sinal obtido é lançado em um gráfico, contra a temperatura de pirólise (Curva A, da Figura 17). Na segunda curva, a temperatura de pirólise é mantida fixa, enquanto a temperatura de atomização varia; o sinal obtido é lançado em um gráfico, versus

a temperatura de atomização (Curva B, da Figura 17). A primeira curva mostra a temperatura máxima que pode ser usada sem perda do analito, chamada de temperatura ótima de pirólise (Ponto 1, na Figura 17). Também desta curva pode ser obtida a temperatura em que o elemento é totalmente volatilizado (Ponto 2, na Figura 17). A temperatura ótima é assim chamada, dado que, nela, o máximo de concomitantes será eliminado por volatilização, simplificando a matriz, mas sem perda do analito, diminuindo as chances de interferências durante a atomização. Na segunda curva pode ser destacada a temperatura em que a atomização produz o primeiro sinal, chamado de temperatura de aparecimento do sinal (Ponto 3, na Figura 17), assim como a temperatura ótima de atomização (Ponto 4, na Figura 17). Ela é chamada de ótima, pois é a mais baixa que produz o melhor sinal analítico, poupando a vida do forno, que é, sem dúvida, mais sacrificada quanto maior for a temperatura de atomização. Estas curvas (Figura 17) são necessárias para se estabelecer o programa de temperatura a ser utilizado.

Para se testar as condições de operação do instrumento e se verificar o correto funcionamento deste, podem-se comparar a massa característica obtida experimentalmente com aquela fornecida pelo manual do equipamento. A massa característica (ou concentração característica) é a massa (ou concentração) do elemento que produz 1 % de absorção, ou seja, uma absorvância igual a 0,0044. Ela é determinada pela razão entre 0,0044 e a inclinação da curva analítica (chamada de sensibilidade). Valores muito altos encontrados para a massa característica indicam que o método ou o instrumento não está otimizado, enquanto valores muito baixos indicam sinais de contaminação (Welz, 1999). Segundo Welz (1999), os limites aceitáveis de variação da massa característica experimental sob condições STPF são de $\pm 10-20$ %.

A massa característica encontrada, neste trabalho, em média nas análises realizadas foi de $1,89 \mu\text{g} / 1 \%$ A, e está dentro dos limites aceitáveis (+ 10%) quando comparado ao valor da massa característica descrita no “cookbook” do equipamento, que é de $1,7 \mu\text{g} / 1 \%$ A. Isto indica o correto funcionamento do equipamento e a correta seleção dos parâmetros utilizados durante as análises.

Verificou-se a existência de interferências multiplicativas (interferências oriundas da matriz) na amostra estudada (NIST 1976) através do teste de adição de analito. Este consiste em se comparar a inclinação da curva obtida pela técnica

de adição de analito (em que se adicionam quantidades conhecidas de analito a alíquotas de igual volume de amostra, levando-se sempre a um mesmo volume final) com aquela obtida com uma curva analítica preparada com soluções analíticas aquosas, sem a presença da matriz. Se as inclinações forem semelhantes, pode-se considerar que não há interferência multiplicativa (Figura 19). E, como se pode observar na Figura 19 não existe interferência multiplicativa na amostra estudada. Utilizou-se então para a análise das amostras a curva analítica em meio aquoso que é uma técnica mais simples e mais rápida.

Tabela 7. Condições de operação no forno de grafite.

Comprimento de onda (nm)	196,0
Largura da fenda (nm)	1,2
Corrente da lâmpada (mA)	6,0
Modo de integração	Área do pico
Tempo de integração (s)	5,0
Modo do Zeeman	2 campos
Campo máximo (T)	0,8
Volume de injeção (μL)	20,00
Gás inerte	Ar (95 % pureza)
Registro do sinal	Digital, em área do pico

Tabela 8. Programa de temperatura empregado para a determinação de selênio em amostras biológicas.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C.s⁻¹)	Hold (s)	Fluxo de argônio
1ª secagem	90	10	15	Máximo
2ª secagem	120	15	25	Máximo
Pré-pirólise	500	7	20	Máximo
Pirólise	1200	30	30	Máximo
Auto Zero	1200	0	6	Zero
Atomização	2200	2600	6	Zero
Limpeza	2500	1000	5	Médio

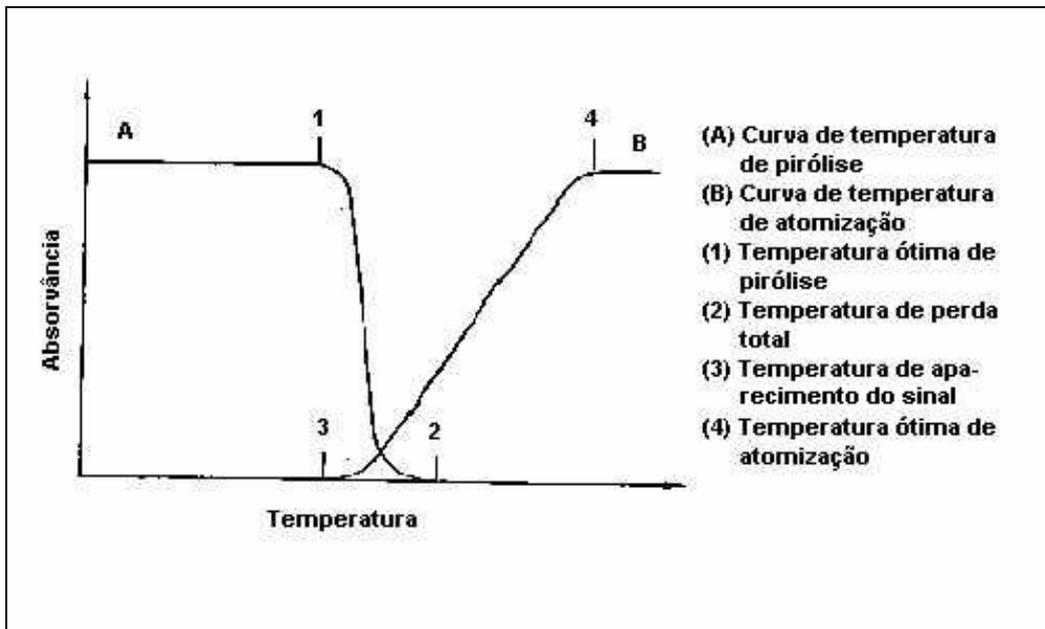


Figura 17. Curvas de temperatura.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220923/CA

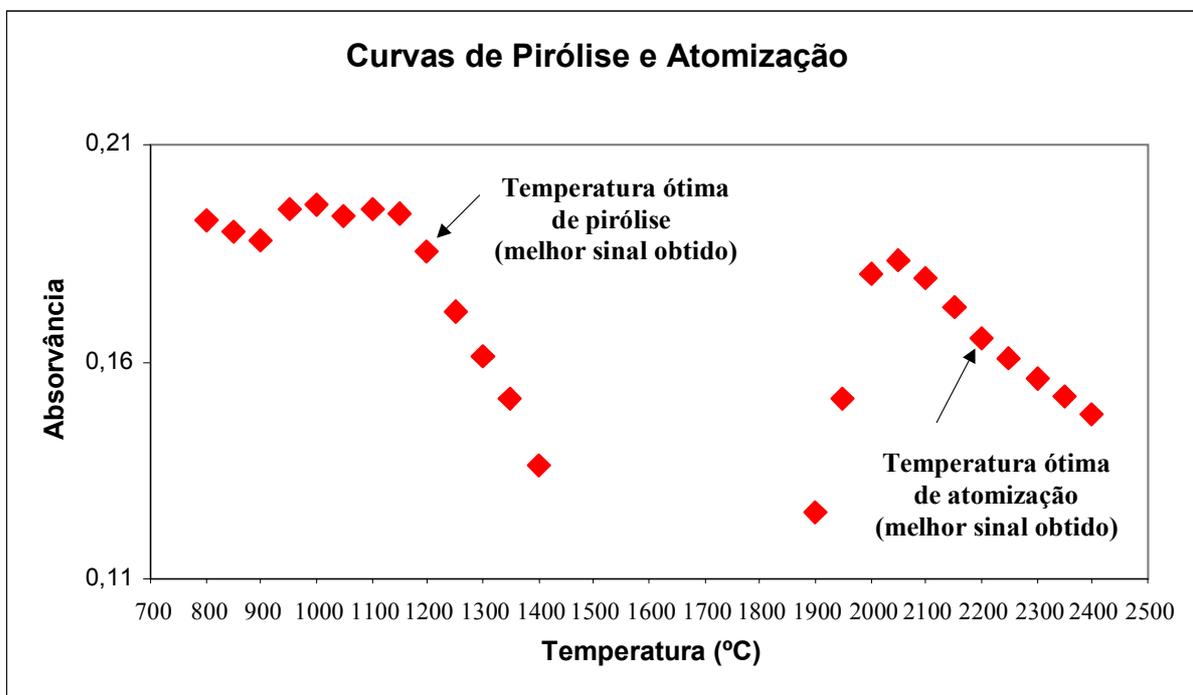


Figura 18. Curvas de Pirólise e Atomização para selênio. Padrão Certificado: NIST 2976.

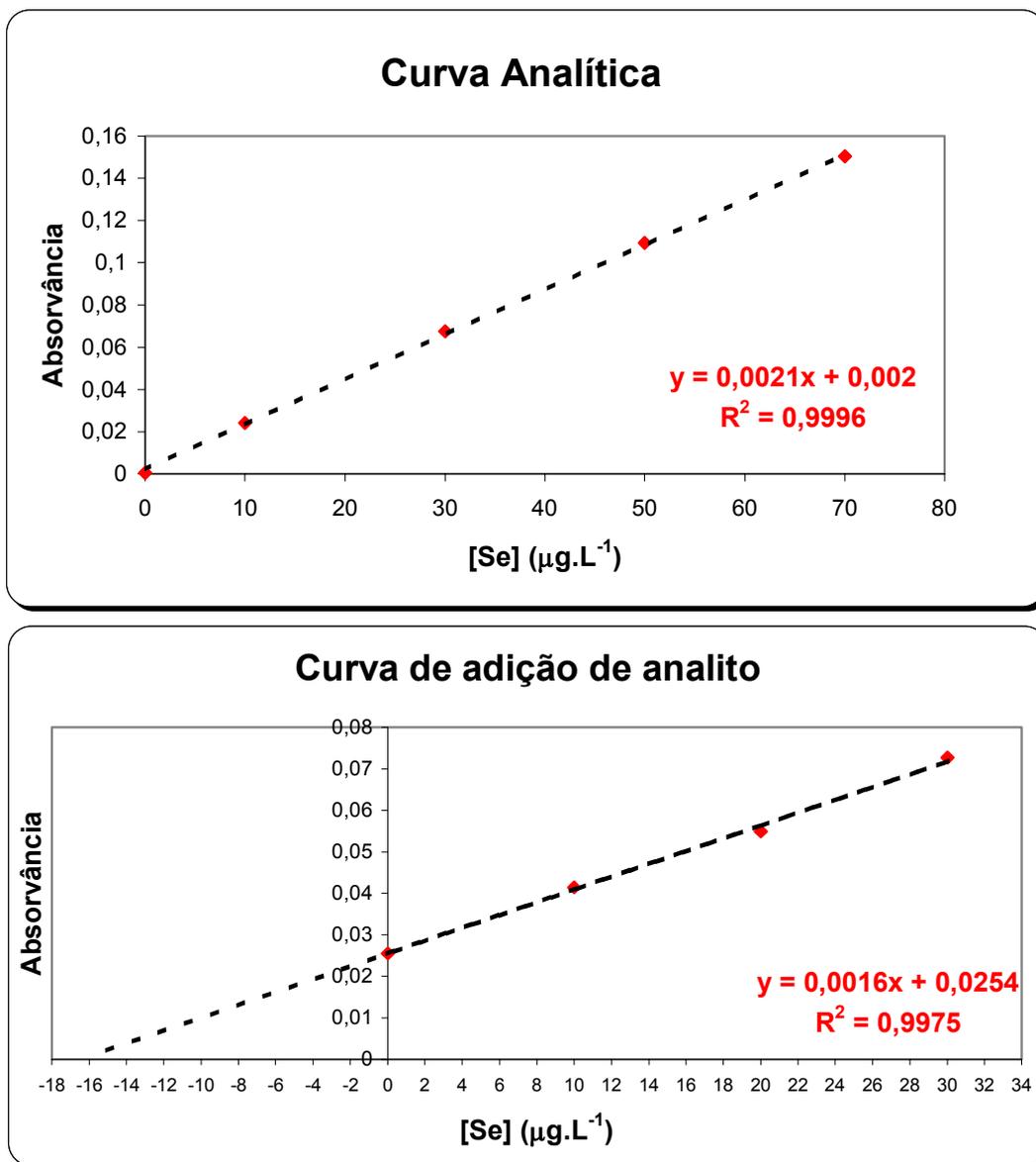


Figura 19. Teste de adição de analito. Padrão aquoso: $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de SeO_2 (Merck) em HNO_3 0,2 % utilizado nas duas curvas e NIST 1976 (material certificado) para a curva de adição de analito.

As curvas analíticas foram feitas com soluções diluídas de padrão de $5,0$ a $45,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas por diluições convenientes de uma solução estoque de selênio (SeO_2) de 1000mg.L^{-1} com uma solução 0,2 % de HNO_3 . Fez-se sempre, a leitura do branco dos reagentes. Na Figura 20, encontra-se a curva analítica que representa a figura de mérito do método.

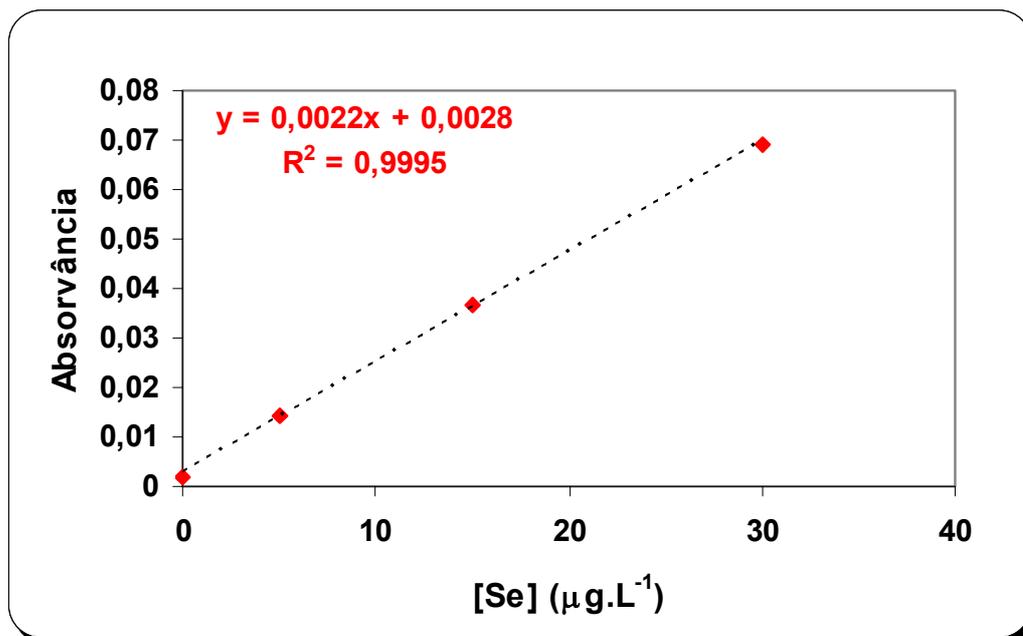


Figura 20. Figura de mérito do método.

5.4

Análise da amostra

5.4.1

Digestão da amostra e determinação do selênio total nos tecidos e órgãos

A digestão do tecido muscular, fígado e gônada do peixe, assim como, os tecidos moles do mexilhão, foram realizados como descrita no item 5.3.1 e a determinação de selênio total nos tecidos e órgãos foi feita como descrito no item 5.3.2.

Na Figura 21, encontra-se a descrição desde a digestão das amostras até a determinação de selênio total.

5.4.2

Cálculo das concentrações

Os cálculos das concentrações finais de selênio total, nos tecidos e órgãos dos organismos em microgramas por grama, foram feitos, levando-se em conta o

peso úmido da sub-amostra do organismo. Para se transformar uma concentração de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (dada pelo aparelho) para $\mu\text{g.g}^{-1}$, utilizou-se a seguinte correção:

$$\mu\text{g.g}^{-1} = \{[(\mu\text{g.L}^{-1})/1000] \times F_d \times V_f\} / (m) \quad (1)$$

Em que F_d é o fator de diluição da amostra, V_f é o volume final da amostra em mL e m é a massa de amostra pesada para a análise.

5.4.3 Análise estatística dos dados

A normalidade do conjunto total dos dados foi testada através do teste de *Shapiro-Wilk*¹ (*teste W*) ($p < 0,05$) (Miller e Miller, 1993), da análise gráfica dos resíduos e do valor da curtose² (*curtose* $> 0,00$) (Probabilidade e estatística III, disponível 'on line'). Como a distribuição das concentrações de selênio nas populações não se mostrou normal, aplicaram-se então, testes não paramétricos para a análise dos dados.

Com o objetivo de testar diferenças na concentração de selênio entre as espécies, níveis tróficos, tecidos e hábito alimentar, aplicou-se o teste não paramétrico de análise de variância (*Kruskal-Wallis* – ANOVA). O teste não paramétrico de concordância de Friedman foi aplicado para se comprovar algumas similaridades encontradas pela ANOVA. Para se comparar as concentrações do elemento estudado entre os tecidos e órgãos e também, entre alguns parâmetros bióticos dos organismos foi aplicado o teste não paramétrico de *Mann – Whitney* (*Teste U*) (Miller e Miller, 1993).

Testes de análise de regressão linear simples foram aplicados para se verificar possíveis relações entre parâmetros morfométricos e a concentração de selênio nos tecidos e órgãos estudados.

¹ Se o valor de *W* é estatisticamente significativo ($p < 0,05$), a hipótese de distribuição normal dos dados deve ser rejeitada.

² A distribuição normal padrão apresenta curtose nula. Curtose positiva significa uma curva mais “afunilada” que a normal padrão e a curtose negativa, uma curva mais “achatada”.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se a versão 5.0 do pacote estatístico STATISTICA para “Windows” (StatSoft, Inc. 1984-95).

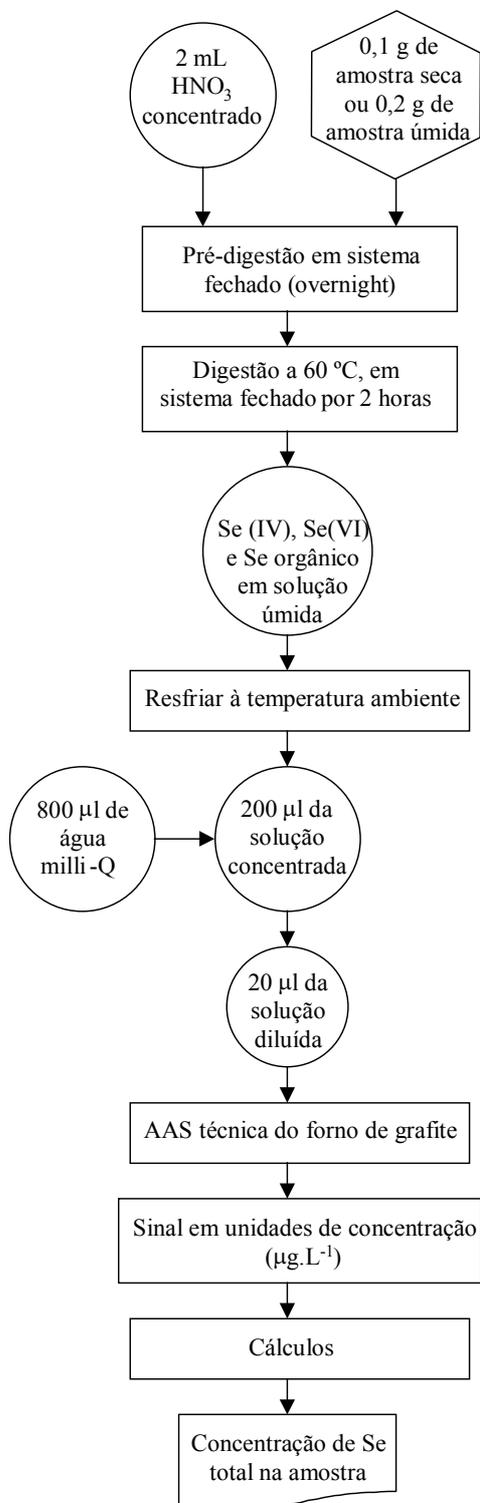


Figura 21. Digestão das amostras e determinação de selênio total (realizadas em duplicata).

5.5 Índice de condição (IC)

O índice de condição (IC) é um parâmetro utilizado na normalização de dados de acumulação de metais pesados (Joiris *et al.*, 2000), pois, através deste pode-se excluir diferenças individuais como tamanho, massa, estágio de vida e ciclo sexual que são efeitos importantes no processo de bioacumulação de metais traço em mexilhões (Wang, 1987; Cossa, 1989).

Este índice foi utilizado com o objetivo de se normalizarem os dados dos mexilhões uma vez que, alguns indivíduos coletados na Ponte Rio-Niterói eram bem maiores (80mm), do que os coletados na Marina da Glória (63 mm) e na praia de Boa Viagem (62 mm).

O IC aplicado foi o seguinte:

$$IC = \{[massa \text{ de tecidos moles (g)}] / [comprimento \text{ da concha (mm)}]\} \quad (2)$$