

## **DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO EM RAÇÕES UTILIZADAS EM PISCICULTURA UTILIZANDO-SE FAAS E EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM**

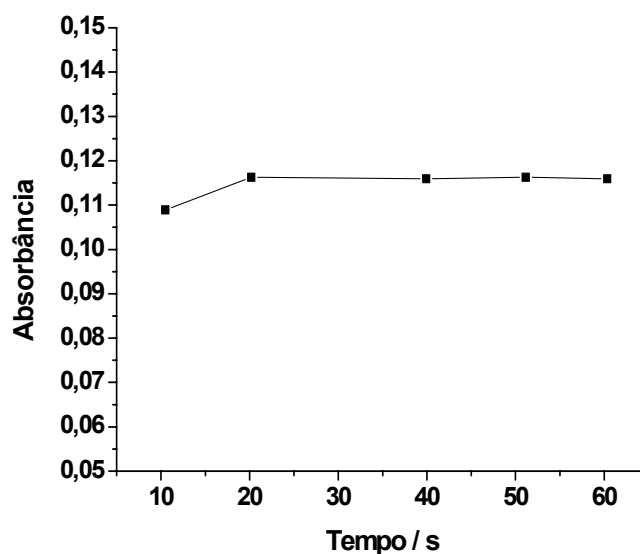
Paula Martin Moraes, Pedro de Magalhães Padilha, Vanessa Rosa Loureiro, Renato de Cássio Ferreira Neves, Margarida Maria Barros, Rafael Brunner Milantonio. - Biológicas – Zootecnia – Departamento de Química e Bioquímica – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

Nos estudos de biodisponibilidade de minerais na nutrição de peixes, utilizam-se os chamados indicadores fecais. Um dos marcadores fecais mais utilizados é o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , por ser completamente não absorvível, não ter ação farmacológica no aparelho digestório e por passar uniformemente através dele (CHO, 1987). A determinação da porcentagem de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e dos minerais nas fezes dos peixes permite estimar o coeficiente de biodisponibilidade desses nutrientes, comparando-se com a porcentagem do óxido e do mineral presente inicialmente na ração (HANLEY, 1987). A quantificação do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e dos minerais apresenta dificuldades nos procedimentos de mineralização das amostras, que é feita por aquecimento em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica. Os extratos ácidos gerados contêm íons  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , espécie altamente tóxica. Dessa forma, desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos nutrientes inorgânicos e do óxido de cromo (III) utilizado como marcador de rações, para determinação da digestibilidade nutricional aparente nos estudos de nutrição animal, particularmente nutrição de peixes, torna-se fundamental. Neste contexto, a extração do analito por ultra-som, apresenta-se como uma técnica bastante promissora, principalmente porque permite a eliminação da mineralização nítrico-perclórica das amostras das em bloco digestor e também a produção de cromo (VI) no processo, que pela metodologia clássica utilizada, constitui o principal problema. As ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos da matriz, devido à atuação das ondas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, diminuindo o tamanho destas e quebrando a ligação metal-molécula orgânica ou, dependendo da potência ultra-sônica aplicada, pode até destruir o composto orgânico (ROSA et. al., 2002). Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de ferro em amostras de rações e fezes de peixes por espectrometria de absorção atômica por chama utilizando extração por ultra-som, eliminando assim a etapa de mineralização das amostras e a formação de espécies tóxicas no extrato resultante.

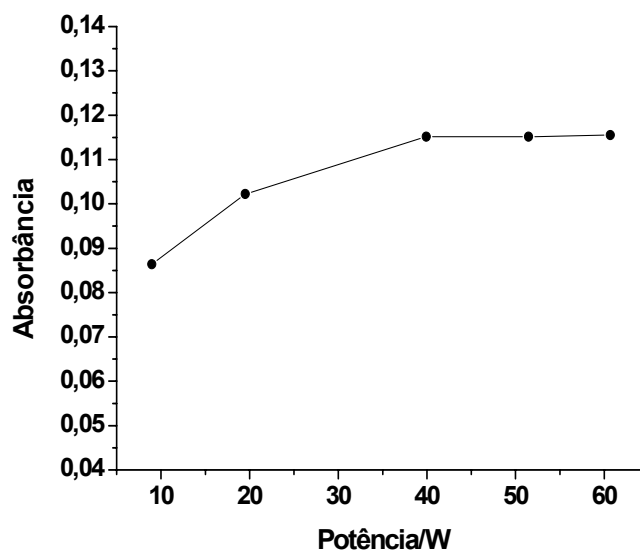
As amostras de rações e fezes de peixes foram desidratadas em estufa de recirculação forçada de ar e moídas em moinho criogênico. Após este tratamento as amostras apresentaram granulometria menor que 60  $\mu\text{m}$ . Em seguida, foram transferidos para frascos de teflon de 50 mL aproximadamente 100 mg de amostras e alíquotas de 25 mL de solução 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  de ácido clorídrico. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som para extração do nutriente inorgânico estudado. Utilizando-se este procedimento foram avaliadas diferentes concentrações de soluções de ácido clorídrico, tempos de sonificação e potências de ultra-som no processo de extração do analito de interesse. Os extratos ácidos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação.

As determinações de ferro nos extratos obtidos após o procedimento de extração por ultra-som foram feitas por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) utilizando-se soluções padrão Titrisol MERCK no preparo da curva de calibração. O equipamento utilizado foi um espectrômetro da Shimadzu modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR) e amostrador automático ASC-6400. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de ferro SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente no comprimento de onda de 248,6 nm e resolução espectral 0,5 nm. A chama utilizada foi de ar/acetileno, de estequiometria oxidante, com fluxo do gás combustível constante de 2  $\text{L min}^{-1}$  e de 0,80  $\text{L min}^{-1}$  para o gás oxidante.

A eficiência do processo de extração do ferro das amostras de rações e fezes foi avaliada variando-se o tempo de extração e a potência ultra-sônica. As Figuras 1 e 2 mostram a influência do tempo e da potência de sonificação sobre a extração do ferro das amostras.



**Figura 1.** Influência do tempo de sonificação no processo de extração de ferro de amostras de rações e fezes de peixes. Solução extratora: HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Influência da potência de sonificação no processo de extração de ferro de amostras de rações e fezes de peixes. Solução extratora: HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

Analisando-se a Figura 1, observa-se que a partir de 20 s o tempo de sonificação praticamente não influencia os sinais de absorbância. Dessa forma, este tempo foi utilizado em todos os demais experimentos. Em relação à influência da potência de ultra-som no processo de extração do ferro, pode-se observar na Figura 2, que os sinais de absorbância permanecem praticamente constante no intervalo de 40 – 60 W de potência. Optou-se então por utilizar a potência de 40 W em todos os demais experimentos. Depois de estabelecidas as condições ótimas do processo de extração do ferro das amostras biológicas, a precisão e a exatidão

do método proposto foram avaliadas utilizando-se ensaios de adição e recuperação do analito em 4 amostras de rações. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nesses experimentos.

**Tabela 1** – Resultados obtidos dos experimentos de recuperação de ferro de amostras de rações de peixes utilizando-se o método de extração por ultra-som e determinações por FAAS.

Amostras	Concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Valores Determinados	Valores Adicionados*
Ração 1	1,46 $\pm$ 0,03	1,45 $\pm$ 0,04
Ração 2	5,85 $\pm$ 0,15	5,83 $\pm$ 0,17
Ração 3	5,86 $\pm$ 0,14	5,81 $\pm$ 0,19
Ração 4	5,80 $\pm$ 0,20	5,82 $\pm$ 0,18

\*Valores determinados por FAAS utilizando-se a mineralização das amostras em forno de microondas

Observa-se que os desvios-padrão relativos calculados foram sempre menores que 5%, mostrando que o método apresenta boa repetibilidade e exatidão entre as medidas. A exatidão do método também foi verificada empregando amostra de ração certificada (Farinha de Arroz, 1568a – National Institute of Standards and Technology) contendo 90 $\pm$ 2,5 mg kg<sup>-1</sup> de ferro. O resultado dessa determinação também apresentou um desvio padrão relativo inferior a 5% e estatisticamente idêntico ao valor certificado (89 $\pm$ 1,8 mg kg<sup>-1</sup> de ferro) com 95% de confiança, o que reforça a boa exatidão do método proposto.

Utilizando-se os parâmetros otimizados para o processo de extração dos analitos, o método foi aplicado na determinação da biodisponibilidade de ferro de quatro amostras de suplementos alimentares utilizadas na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo (WATANABE et. al., 1997). A Tabela 2 mostra os valores dos coeficientes de biodisponibilidade calculados a partir das determinações de ferro utilizando-se o método de extração proposto e por mineralização das amostras em forno de microondas.

**Tabela 2.** Coeficiente de biodisponibilidade de ferro de diferentes fontes alimentares utilizadas na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo.

	Fontes de Alimentares							
	Levedura		Milho		Farelo de soja		Farelo de arroz	
Coeficiente de biodisponibilidade (%)	86 $\pm$ 2*	84 $\pm$ 1 <sup>#</sup>	87 $\pm$ 1*	85 $\pm$ 2 <sup>#</sup>	84 $\pm$ 2*	83 $\pm$ 1 <sup>#</sup>	86 $\pm$ 2*	85 $\pm$ 2 <sup>#</sup>

\*Cálculo baseado na % ferro determinado pelo método proposto

<sup>#</sup> Cálculo baseado na % ferro determinado por GFAAS após mineralização das amostras em forno de microondas

Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 2, que método proposto para determinação da biodisponibilidade de ferro de amostras de rações de peixes, utilizando-se extração por ultra-som, obteve resultados equivalentes ao método utilizando a mineralização das amostras em forno de microondas como etapa inicial. No entanto apresenta a vantagem de não gerar resíduos tóxicos que podem comprometer a saúde do analista e contaminar o meio ambiente. Além disso, como não exige a necessidade da mineralização das amostras, o tempo das determinações analíticas, é reduzido consideravelmente.

CHO, C.Y. **La energía en la nutrición de los peces**. In: Nutrición en Acuicultura II. Ed. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, Madrid-España, p. 197-237, 1987.

HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.66, p.163-179, 1987.

ROSA, C.R.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NOBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, p.517-523, 2002.

WATANABE, T.; KIRON, V; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185-207, 1997.

**Bolsa:** FAPESP