

DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE COBRE EM RAÇÕES DE PEIXES UTILIZANDO-SE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO E DETERMINAÇÃO POR GFAAS

Vanessa Rosa Loureiro, Pedro de Magalhães Padilha, Paula Martin Moraes, Mayra Anton Dib Saleh, Fábio Arlindo Silva, Luiz Edvaldo Pezzato. - Biológicas – Zootecnia – Departamento de Química e Bioquímica – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

Os tecidos animais possuem minerais em proporções e quantidades variáveis os quais são componentes essenciais ao metabolismo, refletindo na maior ou menor produtividade do animal. Nos estudos de biodisponibilidade dos minerais na nutrição animal é necessária a determinação das concentrações desses nutrientes nas rações utilizadas na dieta e nas fezes do animal e da concentração de um marcador biológico que não é absorvido pelo animal (geralmente Cr_2O_3). A quantificação dos microminerais apresenta dificuldades nos procedimentos de mineralização das amostras, que é feita por aquecimento lento ($60\text{-}80^\circ\text{C}$) em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica. Este procedimento além de demorado, apresenta o inconveniente de produzir nos extratos ácidos íons $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, espécie altamente tóxica (SULLIVAN & REIGH, 1995). Neste contexto, a determinação de micronutrientes metálicos em amostras biológicas (vegetais, sangue, fezes de animais, alimentos, etc.) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) proporciona diversas vantagens, como alta sensibilidade, limites de detecção em níveis de ng Kg^{-1} , utilização de pequenos volumes de amostra, determinação de uma ampla variedade de elementos traços e considerando-se que o atomizador pode agir como um reator químico, tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de decomposição prévia da amostra. Desta forma, procedimentos utilizando amostragem de sólidos na forma de suspensão, permitem obter vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito por manipulação excessiva, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista (BENDICHO & LOOS-VOLLEBERGT, 1991). Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de cobre em suspensões de amostras de rações e fezes de peixes por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), de modo a eliminar a etapa de mineralização das amostras e permitir a estimativa da biodisponibilidade desse micronutriente metálico em amostras de rações utilizadas na nutrição de peixes.

Após a moagem criogênica, 5 mg de amostras de ração ou fezes de peixes, isentas de Cu, foram transferidas para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica Shimadzu AA 6800. Em seguida, volumes de 4, 8, 16, 20 e 40 μL de solução padrão contendo 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, 5 μL de HNO_3 concentrado suprapuro, 50 μL de Triton X-100 foram transferidos para os copos do autoamostrador. O volume final foi acertado para 1000 μL com água ultrapura, de modo que as concentrações de cobre nas suspensões ficassem na faixa de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após agitação durante 40 s por sonificação, alíquotas de 20 μL foram injetados para dentro do tubo de grafite do espectrômetro de absorção atômica. Os parâmetros avaliados no processo de atomização do cobre foram: temperatura de pirólise e de atomização, sinais de absorção atômica (AA) e fundo (BG). Soluções padrão aquosas, em meio de HNO_3 10% v/v e contendo a mesma faixa de concentração de cobre das suspensões padrão, foram também utilizadas no preparo de curvas analíticas para determinação desse micronutriente nas amostras rações e fezes previamente mineralizadas por digestão ácida utilizando forno de microondas.

Para determinação de cobre foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada e recobertos internamente com W^0 e Pd^0 foram utilizados nas determinações.

O comportamento eletrotérmico do cobre nas amostras biológicas foi avaliado por meio de curvas de temperatura de pirólise e de atomização, utilizando-se W^0 (massa depositada = 250 μg) como modificador permanente acompanhado da co-injeção de Pd(II) (massa depositada = 250 μg). Procurou-se nesses estudos, otimizar programas de aquecimento de modo a definir os parâmetros de

tempo e temperatura para as etapas de secagem, pirólise e atomização. A temperatura de secagem foi fixada em 90 – 250 °C, variando-se o tempo. A avaliação da temperatura ótima de pirólise foi feita variando-se em intervalos de 200 °C a partir de 200 °C, até um máximo de 1800 °C. A temperatura de pirólise considerada ótima foi à temperatura que permitiu a máxima eliminação de concomitantes da matriz e a estabilização térmica do cobre. A avaliação da temperatura de atomização foi feita variando-se também em intervalos de 200 °C a partir de 1800 °C até 2800 °C. Na escolha da temperatura ótima de atomização foi considerado principalmente o melhor sinal transiente com o posterior retorno à linha de base, para um tempo de integração de 5 s. Outros parâmetros avaliados na otimização das condições instrumentais foram a sensibilidade e o perfil do sinal atômico transiente. A sensibilidade foi medida calculando-se as massas características (m_0 em pg) para ambos os sistemas estudados. O perfil do sinal atômico transiente permite avaliar a cinética de atomização entre os analitos, em função do tempo de aparecimento do sinal e do tempo de retorno à linha de base.

Os programas de aquecimento otimizados compreenderam três etapas de secagem, duas etapas de pirólise, uma etapa de atomização e uma etapa de limpeza. Deve-se destacar que a agitação por ultra-som foi fundamental para se obter uma boa homogeneização das suspensões dos materiais biológicos. As ondas ultra-sônicas além de favorecerem a homogeneidade da suspensão, promovem a extração dos analitos da matriz e podem também contribuir na dispersão da amostra dentro do tubo de grafite, devido à atuação das ondas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, diminuindo o tamanho destas ou mesmo destruindo-as (ROSA et. al., 2002).

As influências das temperaturas de pirólise e de atomização sobre sinal de absorvância do cobre nas suspensões padrão são mostradas nas Figuras 1(1) e 1(2). As temperaturas de pirólise e atomização que apresentaram as menores massas características ($m_0 = 29$ pg, fezes e $m_0 = 30$ pg, rações) e os menores sinais de fundo (Figuras 2), foram de 1600 e 2400 °C respectivamente, sendo as temperaturas utilizadas para dar continuidade ao trabalho. A Tabela 1 mostra o programa de aquecimento otimizado para a atomização do cobre.

Tabela 1. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de cobre em suspensões de amostras de fezes e rações.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	10	0	1
Secagem	150	10	5	1
Secagem	250	10	5	1
Pirólise	1600	10	20	1
Pirólise	1600	5	10	1
Atomização	2400	1	5	0
Limpeza	3000	5	0	1

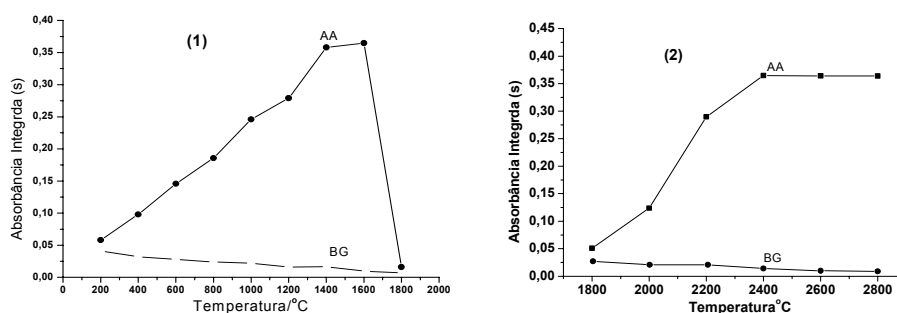


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise (1) e atomização (2) das suspensões de amostras de fezes e ração contendo 3 µg L⁻¹ de cobre.

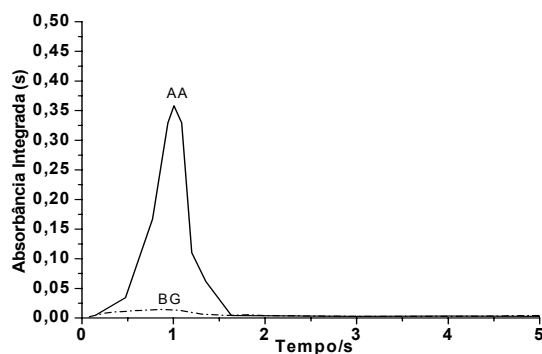


Figura 2. Sinais de absorção atômica (AA) obtidos na atomização do cobre na suspensão de ração de peixes contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito e empregando W^0 como modificador permanente com co-injeção de Pd(II) .

Considerando-se os parâmetros otimizados, temperatura de pirólise e atomização, e o perfil de sinal de absorção obtidos utilizando-se W^0 com co-injeção de Pd(II) , curvas analíticas foram construídas utilizando-se suspensões padrão de fezes e ração de peixe contendo cobre na faixa de concentração de $1,00 - 10,00 \mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 3 mostra a curvas analítica das suspensões padrão de fezes e rações com as suas respectivas equações das retas.

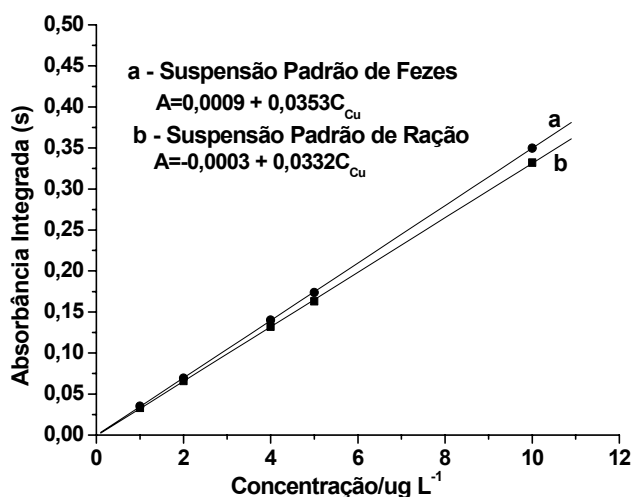


Figura 3. Curvas analíticas obtidas a partir de suspensões padrão de fezes e rações de peixes contendo $1,00 - 10,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

A calibração dos sistemas estudados via compatibilização de matriz, proporcionou a degradação e a eliminação quantitativa dos concomitantes da matriz. Pode-se observar, analisando-se a Figura 3, que comparando-se as curvas analíticas das suspensões padrão de fezes com as preparadas com suspensões padrão de rações, estas apresentam perfis semelhantes. Os limites de detecção e de quantificação calculados, considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das suspensões padrão e as inclinações das curvas analíticas ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ e $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$), foram de $0,24$ e $0,79 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu para as suspensões padrão de fezes e de $0,26$ e $0,87 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu para as suspensões padrão de ração (ROSA et. al., 2002). Os limites de detecção obtidos pelo método proposto mostraram-se equivalentes ao obtido por GFAAS utilizando padrões aquosos ($0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu). O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 572 queimas.

O método desenvolvido foi aplicado na determinação da biodisponibilidade de cobre de quatro amostras de suplementos alimentares utilizadas na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo (COMBS et. al., 1984). A Tabela 2 mostra os valores dos coeficientes de biodisponibilidade calculados a partir das determinações de cobre utilizando-se o método proposto e por GFAAS após mineralização das amostras de rações e fezes em forno de microondas.

Tabela 2. Coeficiente de biodisponibilidade de cobre de diferentes fontes alimentares utilizados na dieta de alevinos de Tilápia do Nilo.

	Fontes de Alimentares							
	Levedura		Milho		Farelo de soja		Farelo de arroz	
Coeficiente de biodisponibilidade (%)	68±2*	66 ± 1 [#]	67 ± 1*	68 ± 2 [#]	71 ± 2*	69 ± 1 [#]	74 ± 2*	71 ± 2 [#]

*Cálculo baseado na % cobre determinado pelo método proposto

[#] Cálculo baseado na % cobre determinado por GFAAS após mineralização das amostras em forno de microondas

Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 2, que o método proposto para determinação da biodisponibilidade de cobre em amostras de rações de peixes, utilizando-se amostragem na forma de suspensões, 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.

BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBERGT, M.T.C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. **Journal Analytical Spectrometry**, v.6, p.353-358, 1991.

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.

COMBS, G.F.; LIU, C.H.; LU, Z.H.; SU, Q. Uncomplicated selenium deficiency produced in chicks fed a corn-soy-based diet. **Journal of Nutrition**, v.114, p.964-976, 1984.

SULLIVAN, J.A.; REIGH, R.C. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Aquaculture**, v.138, p.313-322, 1995.

Bolsa: FAPESP