

## **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS COMO ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DE S E P EM RAÇÃO ANIMAL**

**DIOGO LA ROSA NOVO; CARLA DE ANDRADE HARTWIG; MARCELO GUERREIRO CRIZEL, RODRIGO MENDES PEREIRA, VANIZE CALDEIRA DA COSTA, MÁRCIA FOSTER MESKO**

*Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas –  
diogo.la.rosa@hotmail.com; marcia.mesko@pq.cnpq.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A saúde e o bem estar dos animais estão diretamente relacionados com seus hábitos alimentares. Macronutrientes como, por exemplo, S e P, quando absorvidos em sua forma aniônica e em concentrações elevadas, podem afetar o balanço catiônico-aniônico do organismo, aumentando a concentração de íons H<sup>+</sup> no sangue arterial e, por consequência, há precipitação de alguns sais, que ao se aglomerarem formam urólitos e provocam a obstrução do trato urinário (KANEKO et al., 1997).

Neste sentido, instituições como a Association of Analytical Communities (AOAC) desenvolveram métodos oficiais para a determinação destes ânions em ração animal (WORWITZ, et al., 2011). No entanto, estes métodos apresentam algumas desvantagens, tendo em vista que demandam um elevado volume de reagentes concentrados, além de envolver uma série de etapas para o preparo das amostras, o que pode ocasionar a perda dos analitos e/ou contaminações (FLORES et al., 2010).

Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que minimizem e/ou eliminem essas limitações. Neste contexto, uma alternativa que vem sendo proposta na literatura é a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados (MW-AD, do inglês *Microwave-Assisted Digestion*). Esse método geralmente possibilita uma decomposição eficiente da amostra em virtude de proporcionar um aquecimento mais efetivo, quando comparado a sistemas que empregam aquecimento convencional, bem como por permitir que os reagentes atinjam temperaturas mais elevadas que seus pontos de ebulição, o que está associado às pressões alcançadas pelo sistema (FLORES et al., 2010).

Além disso, também é descrito na literatura a utilização de métodos que empregam o oxigênio como auxiliar de decomposição (MW-O<sub>2</sub>-AD, do inglês *Microwave Pressure of Oxygen Assisted Digestion*) e/ou lâmpadas que emitem radiação ultravioleta (MW-UV-AD, do inglês *Microwave-Assisted Ultraviolet Digestion*) como alternativas ao uso da MW-AD. Estes métodos alternativos permitem o uso de reagentes diluídos para a decomposição das amostras, proporcionando a decomposição da matéria orgânica de forma equivalente às decomposições que utilizam reagentes concentrados (BIZZI et al., 2010; FLORIAN et al., 2001).

Com relação à quantificação de S e P, diferentes técnicas têm sido empregadas como, por exemplo, a cromatografia de íons (IC) e a espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis). Com relação à técnica de IC, é importante mencionar que esta apresenta vantagens, quando comparada à técnica de UV-Vis, por ser multielementar e, geralmente, apresentar melhores limites de detecção (LD). Contudo, a UV-Vis é uma técnica bastante utilizada, tendo em vista que apresenta baixo custo e é de fácil manipulação (NOVIC et al., 1995; BOWDEN et al., 2002).

Assim, a partir do que foi exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de decomposição de diferentes métodos de preparo de amostras por via

úmida em sistema fechado (MW-AD, MW-O<sub>2</sub>-AD e MW-UV-AD) para a subsequente determinação de S e P em ração animal.

## 2. METODOLOGIA

As amostras de ração animal, destinadas à alimentação de bovinos e equinos adquiridas em uma indústria de Pelotas-RS, foram, inicialmente, moídas em moinho de facas (Lucadema Científica – Modelo 226/5), secas em estufa (DeLeo – Modelo 400/2ND) a 65 °C por 12 h e armazenadas em frascos de polietileno. Para a otimização dos métodos de decomposição, foi utilizada a ração destinada à alimentação de equinos. As demais amostras foram usadas para avaliação do método proposto nas melhores condições estabelecidas.

Para a decomposição por MW-AD, foram transferidos 0,5 g de amostra para frascos de quartzo, no qual, posteriormente, foram adicionados 6 ml de solução de HNO<sub>3</sub> (2 ou 4 mol l<sup>-1</sup>). Em procedimento semelhante, foi avaliada a utilização de 20 atmosferas de oxigênio na pressurização do sistema (MW-O<sub>2</sub>-AD). O programa de irradiação com micro-ondas utilizado, em ambos os procedimentos, foi: i) 600 W/6 min; ii) 800 W/10 min; iii) 0 W/20 min.

Para a decomposição por MW-UV-AD, foram transferidos 0,5 g de amostra para frascos de quartzo. Posteriormente, foram adicionados 13 ml de HNO<sub>3</sub> (2 ou 4 mol l<sup>-1</sup>) e a lâmpada que emite radiação ultravioleta. O programa de irradiação empregado foi: i) 550 W/30 min; ii) 900 W/30 min; iii) 0 W/15 min.

Em ambos os métodos, as soluções obtidas após a decomposição das amostras foram recolhidas e avolumadas em frascos volumétricos de 50 ml para posterior determinação de S e P por IC e, adicionalmente, para a determinação de P por UV-Vis. A determinação de P por UV-Vis foi realizada de acordo com o método 965.17 recomendado pela AOAC.

A exatidão dos métodos foi avaliada através de um material de referência (RM NIST 8414 - *bovine muscle*), que foi submetido as mesmas condições das amostras, e por meio de adições de concentrações conhecidas de S e P durante a etapa de preparo das amostras e de determinação. Por fim, as melhores condições obtidas foram aplicadas para outras rações destinadas a alimentação de bovinos.

O método oficial descrito pela AOAC (965.17) para determinação de P em ração animal também foi utilizado para fins de comparação com os métodos propostos. Para tanto, frações de amostras moídas (2 g) e 30 ml de HNO<sub>3</sub> (65% m/m) foram adicionados em frascos digestores. Posteriormente, os frascos foram aquecidos em bloco digestor (Marconi - Modelo MA850), sob temperatura de 85 °C por 45 min. Após o resfriamento da solução até temperatura ambiente, foram adicionados 10 ml de HClO<sub>4</sub> (70% m/m) e 50 ml de água ultrapura, sendo esta novamente aquecida até a ebulição. A solução obtida foi, então, transferida para um balão volumétrico e avolumada a 250 ml. Para a determinação de P, uma alíquota de 0,2 ml da solução foi transferida para um balão volumétrico, onde foi adicionado 5 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (utilizado como reagente complexante), e a solução resultante foi avolumada a 25 ml. A determinação da concentração de P foi feita em UV-Vis (Pro-análise - modelo UV 1100) no comprimento de onda de 400 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para S e P por IC após o preparo da amostra de ração animal por MW-AD, MW-O<sub>2</sub>-AD e MW-UV-AD, utilizando diferentes concentrações de HNO<sub>3</sub>, encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Concentrações de S e P em ração animal, determinadas por IC, após decomposição por MW-AD, MW-O<sub>2</sub>-AD e MW-UV-AD, utilizando concentrações variadas de HNO<sub>3</sub> (µg g<sup>-1</sup>; n=3).

Concentração de HNO <sub>3</sub>	Método	S	P
2 mol l <sup>-1</sup>	MW-AD	2021 ± 132	18722 ± 1678
	MW-UV-AD	2457 ± 107	26212 ± 1271
	MW-O <sub>2</sub> -AD	2259 ± 101	28240 ± 772
4 mol l <sup>-1</sup>	MW-AD	2446 ± 160	27806 ± 1291
	MW-UV-AD	2365 ± 105	27798 ± 517
	MW-O <sub>2</sub> -AD	2355 ± 104	28411 ± 445

Com base na Tabela 1, pode-se observar que existem diferenças significativas (teste de *tukey*, com 95% de confiança) para as concentrações de S e P obtidas após decomposição por MW-AD utilizando HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup>, em comparação aos demais resultados. Este comportamento pode ser explicado, devido à solução obtida após o preparo da amostra apresentar um aspecto amarelado e a presença de sólidos suspensos, indicando que ocorreu uma decomposição incompleta da amostra e que, possivelmente, S e P não tenham sido totalmente disponibilizados para a solução. Contudo, este comportamento não foi observado nas demais condições para os métodos avaliados.

Diante dos resultados obtidos, é importante mencionar que para a determinação de S e P, os métodos que envolvem a decomposição por MW-UV-AD e MW-O<sub>2</sub>-AD utilizando de HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup> apresentaram resultados com uma boa precisão (RSDs < 4%), além de fornecerem soluções mais compatíveis a técnica de determinação utilizada. Assim, levando em consideração a simplicidade e baixo custo da MW-O<sub>2</sub>-AD, quando comparada a MW-UV-AD, foi avaliada a exatidão da decomposição por MW-O<sub>2</sub>-AD utilizando HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup> e posterior determinação de S e P por IC. Para tanto, foi utilizado um RM e, as concordâncias entre os valores encontrados para S e P por IC e os valores informados no RM foram superiores a 94%. Além disso, foram obtidas recuperações em torno de 102% para S e P quando concentrações conhecidas destes elementos foram adicionadas às amostras, previamente, a MW-O<sub>2</sub>-AD (HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup>) e determinação por IC.

Com relação à determinação de P pelo método oficial recomendado pela AOAC (965.17), cabe salientar que a concentração obtida foi de 6743 ± 629 µg g<sup>-1</sup>, enquanto, a concentração encontrada após a decomposição da amostra por MW-AD e determinação por UV-Vis foi de 26460 ± 200 µg g<sup>-1</sup>. Esta diferença, provavelmente, está associada a decomposição recomendada pelo órgão oficial não ser eficiente para este tipo de amostra. Contudo, cabe mencionar que os resultados obtidos para P, quando a MW-O<sub>2</sub>-AD foi associada à determinação por UV-Vis, foram concordantes aos obtidos para as determinações por IC (Tab. 1), demonstrando que a UV-Vis pode ser uma técnica alternativa para a determinação deste elemento.

Os limites de detecção obtidos para S e P para o método proposto foram 55 e 665 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Quando a amostra foi decomposta por MW-O<sub>2</sub>-AD (HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup>) e P determinado por UV-Vis o LD obtido foi de 434 mg kg<sup>-1</sup>. Neste contexto, é importante mencionar que o LD do método, quando utilizado a IC para determinação de P, foi mais elevado devido à necessidade de maior diluição para minimizar a interferência do nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no sinal do fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). O LD obtido para o método oficial para a determinação de P foi de 654 mg kg<sup>-1</sup>.

Considerando a boa exatidão e precisão obtida para as determinações de S e P por IC após a decomposição por MW-O<sub>2</sub>-AD (HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup>), foi avaliada a aplicabilidade do método para outras rações como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentrações de S e P em ração animal, determinadas por IC, após MW-O<sub>2</sub>-AD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ; n=3).

Ração	S	P
Terneiro	3334 $\pm$ 101	25243 $\pm$ 869
Bovino	2730 $\pm$ 66	28357 $\pm$ 720
Equino*	2259 $\pm$ 101	28240 $\pm$ 772

\* Amostra selecionada para a avaliação dos métodos.

Como pode ser observado na Tabela 2, as concentrações de S e P variam de acordo com a faixa etária e a espécie dos animais. Isso pode ser explicado pela necessidade de suplementação de acordo com as necessidades fisiológicas de cada faixa etária ou a finalidade que se destina o animal.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que os métodos de decomposição que empregaram o HNO<sub>3</sub> 2 mol l<sup>-1</sup> utilizando os auxiliares de decomposição (oxigênio ou lâmpadas UV), possibilitaram a quantificação dos analitos por IC de forma precisa e exata. Além disso, os métodos permitiram a determinação de P por UV-Vis, evidenciando uma alternativa para a determinação do elemento por uma técnica que apresenta baixo custo e simplicidade. Ademais, o método MW-O<sub>2</sub>-AD apresenta menor custo e maior facilidade de manuseio, além de possibilitar a utilização de ácidos diluídos, gerando assim menor quantidade de resíduos, o que favorece a redução de custos e ainda atende a um dos princípios preconizados pela Química Verde, em relação ao uso de soluções diluídas. Além disso, com o método desenvolvido foi possível determinar S e P em amostras variadas de ração animal.

Os autores agradecem a UFPEL, CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIZZI C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLOTO, R. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v.2, p.734-738, 2010.
- BOWDEN, M.; SEQUIERA, M.; KROG, J. P.; GRAVESEN, P.; DIAMOND D. Analysis of river water samples utilising a prototype industrial sensing system for phosphorus based on micro-system technology. **Journal of Environmental Monitoring**, v.4, p. 767-771, 2002.
- FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 252-275.
- FLORIAN, D.; KNAPP, G. High-Temperature, Microwave-Assisted UV Digestion: A Promising Sample Preparation Technique for Trace Element Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1515-1520, 2001.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. London:Academic Press, 1997.
- NOVIC, M. ; DOVZAN, A. ; PIHLAR, B. ; HUDNIK, V. Determination of chlorine, sulphur and phosphorus in organic materials by ion chromatography using electro dialysis sample pretreatment, **Journal of Chromatography A**, v.704(2), p. 530-534, 1995.
- WORWITZ, W.; LATIMER, G. W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2011.