

ANÁLISE DE MATERIAIS BIOLÓGICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA. I. DETERMINAÇÃO DO COBRE, FERRO E ZINCO TOTAIS NO FÍGADO DE AVES NORMAIS¹

JORGE ALMEIDA GUIMARÃES², ELOI DE SOUZA GARCIA³, e FERNANDO BRAGA UBATUBA⁴

Sinopse

São apresentados os resultados obtidos na determinação do cobre, ferro e zinco, em fígado seco de frangos de corte da linhagem Shaver-Starbro, utilizando a espectrofotometria de absorção atômica como método analítico. Também são analisadas as possibilidades de estudo do metabolismo destes elementos em aves, sendo indicados alguns campos de estudo do metabolismo mineral em que as aves se prestam admiravelmente à experimentação.

Os valores encontrados nos fígados analisados (expressos em ppm no tecido seco), foram $14,4 \pm 0,85$ ppm para o cobre; $283,3 \pm 19,78$ ppm para o ferro e $130,4 \pm 4,21$ ppm para o zinco. Estes valores estão dentro dos limites indicados na escassa literatura existente a respeito.

O método utilizado foi controlado para a verificação da ocorrência de interferências, de perdas, contaminação operacional e reprodutibilidade analítica, pelas provas do erro de duplicatas e de recuperação dos três elementos, na presença e na ausência de matéria orgânica. Tais provas forneceram resultados significativos, sendo que a recuperação dos três elementos na ausência de matéria orgânica foi de 101,3% para o cobre, 102,9% para o ferro e 99,0% para o zinco; na presença de matéria orgânica os resultados foram: 92,9%, 97,7% e 98,0%, respectivamente. Não foi verificado ocorrerem interferências por parte de outros elementos presentes na cinza em grande quantidade, como o sódio, o potássio, o cálcio e o fósforo.

A prova do erro de duplicatas indicou grande uniformidade dos resultados obtidos.

A análise dos elementos presentes em tecidos e líquidos biológicos por absorção atômica se recomenda pela versatilidade, sensibilidade e comodidade para o manuseio de grande número de amostras e, principalmente, pela eliminação dos métodos de fracionamento dos componentes da mistura.

INTRODUÇÃO

O melhor conhecimento do metabolismo mineral nas aves, especialmente galinhas de corte ou poedeiras, está se impondo, inclusive por razões de ordem econômica. Os dados disponíveis na literatura, a respeito, são esparsos e, geralmente, obtidos com técnicas trabalhosas e pouco precisas em vias mesmo de serem abandonadas.

Com o advento dos modernos métodos físicos de análise química, expeditos e sensíveis, pode-se prever um rápido avanço dos conhecimentos sobre o metabolismo de vários elementos químicos, até en-

tão mal estudados nesse particular, em aves (Cunningham 1955). Acrescente-se a isso a facilidade de utilização e experimentação, sobretudo *in vivo*, que oferecem esses animais.

Aqui também, como no caso dos mamíferos, é de esperar-se que a flutuação das concentrações de determinados elementos no fígado venha a constituir um bom índice das condições de absorção, transporte, metabolismo e excreção desses elementos. Valores normais ou acima desse nível poderão não só indicar as condições de utilização metabólica do elemento, como também a sua disponibilidade alimentar.

No presente trabalho apresentamos dados sobre os níveis de concentração normal hepática de três elementos importantes sob o ponto de vista metabólico: ferro, cobre e zinco. Tal levantamento se tornou indispensável não só porque esses elementos são de significação metabólica incompletamente conhecida, como também porque permitirá, em bases seguras, o prosseguimento dos estudos sobre a sua absorção intestinal, transporte e incorporação meta-

¹ Recebido 30 out. 1969, aceito 8 set. 1970.

² Prof. Assistente do Dept.º Ciências Fisiológicas (D.C.F.) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26, e Pesquisador-Assistente, bolsista, do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) (Proc. 4.002/69).

³ Auxiliar de Ensino do DCF da UFRRJ e Pesquisador-Assistente do CNPq (Proc. 4.001/69).

⁴ Antigo Prof. Catedrático da UFRRJ, Chefe do DCF da UFRRJ e Pesquisador-Conferencista do CNPq.

bólica nas aves. Nesse particular, a espectrofotometria de absorção atômica, método que contorna os fastidiosos e pouco exatos métodos químicos de análise até então usados, vem se tornando dia a dia o método ideal de análise de misturas, sem os inconvenientes do fracionamento. Além de rápida, sensível e eficiente, ela é muito cômoda para o manuseio de grande número de amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste trabalho os fígados de 32 frangos de corte da linhagem Shaver-Starbro, machos, de 67 dias de idade, sacrificados em matadouro por decapitação e pertencentes a um lote de 550 aves, com peso médio de 1,35 kg. Os fígados foram removidos por dissecação cuidadosa, empregando-se material cirúrgico de aço inoxidável, e imediatamente transferidos para frascos de vidro Wheaton com tampa plástica de polietileno, contendo 250 ml de formol a 10%.

As amostras foram em seguida reduzidas a pequenos fragmentos com tesoura de aço inoxidável e dessecadas em placas de vidro a 150°C durante 24 horas. Cerca de 2 g de tecido seco, pesados em balança analítica ao 0,1 mg, foram em seguida mineralizados a seco em cadinhos de Vitreosil, em forno-mufla aquecido a 800-850°C até cinza branca (cerca de 4 horas). Após resfriamento do cadinho, a cinza foi dissolvida a quente (banho a vapor) em 2-4 ml de HCl concentrado e transferida a solução resultante para balão volumétrico Kimble Exax de 10 ml, com água destilada especial, suficiente para completar o volume ao traço.

A determinação dos elementos foi feita por absorção atômica utilizando-se o espectrofotômetro Perkin-Elmer 290-B com queimador "Standard", mistura combustível acetileno-ar e lâmpadas de catódio ôco P & E com janela de quartzo (Quadro 1). As leituras⁵ foram feitas calibrando-se o instrumento a

zero com "blanks" preparados de modo similar às amostras e a 100% com padrão de referência encerrando 2 µg/ml de Cu, 20 µg/ml de Fe e 3 µg/ml de Zn; para a determinação do cobre nas amostras não se usou nenhuma diluição da solução original, enquanto que para o ferro e o zinco foram feitas diluições de 1:5 e 1:10 daquela solução, conforme o caso.

As soluções estoque dos padrões de cobre, ferro e zinco foram preparadas usando-se reagentes analíticos e da seguinte forma:

Cobre (1.000 µg Cu/ml solução): 3,9298 g CuSO₄·5H₂O, Baker, p.a. foram dissolvidos e completado o volume a 1.000 ml com uma solução 0,1% (v/v) de H₂SO₄ (Merck, p.a.);

Ferro (1.000 µg Fe/ml de solução): 1,000 g de fio de ferro analítico, Merck, foi dissolvido, a quente em 50 ml de água, 5 ml de HClO₄ (70%), Merck p.a. e 2 ml de HCl concentrado, Merck, p.a.; após resfriamento o volume foi completado a 1.000 ml com água;

Zinco (1.000 µg Zn/ml de solução): 4,3982 g ZnSO₄·7H₂O, Baker, p.a., foram dissolvidos e o volume completado a 1.000 ml com uma solução de H₂SO₄ (Merck, p.a.) a 0,1% (v/v).

Os padrões de uso foram obtidos a partir dos estoques por diluições adequadas.

Tôda a vidraria e os reagentes utilizados foram cuidadosamente preparados atendendo-se aos cuidados indispensáveis à segurança da análise de oligoelementos em materiais biológicos (Thiers 1954). Quanto à água usada na rinçagem final da vidraria, antes da secagem em estufa, assim como para o preparo dos reagentes e padrões, foi ela destilada primeiramente em destilador elétrico estanhado internamente, depois lentamente deionizada em leito

⁵ Devido às variações de voltagem da rede do laboratório, às quais é bastante sensível o espectrofotômetro P & E 290-B (apesar do sistema de regulação contido no próprio circuito eletrônico do instrumento), por se tratar do modelo de um só feixe, foi intercalado na rede um regulador de voltagem (General Radio Automatic Voltage Regulator, Solid-State Servo Controlled Type 1581-A) e que assegura estabilização razoável para leituras feitas dentro de poucos segundos.

QUADRO 1. Condições instrumentais para análise de Cu, Fe e Zn por absorção atômica empregando o espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 290-B

Elemento	Lâmpada		Amortecimento do galvanômetro	Fenda		Comprimento da onda		
	N.º	mA		atual	antigo	Setor	atual	antigo
				nm	milimicro		nm	milimicro
Cobre	303-6094	10	2	0,7		280,1	324,7	
Ferro	303-6031	12	2	0,2		144,2	348,3	
Zinco	303-6081	8	2	0,7		83,5	213,8	

misto de resinas de permuta (cartucho Barnstead analítico) e em seguida destilada em aparelho de vidro pyrex, sendo o destilado coletado diretamente em botijão de polipropileno nalgene.

RESULTADOS

Os valores encontrados por nós no material analisado estão representados no Quadro 2. Exprimindo-se

QUADRO 2. Concentração de Cobre, Ferro e Zinco de frangos de corte (ppm sobre peso seco)

Fígado n.º	Elementos		
	Cu	Fe	Zn
01	12,4	250	130
02	15,2	315	130
03	17,5	208	135
04	14,5	242	127
05	9,8	210	80
06	17,0	215	154
07	11,4	230	108
08	15,8	372	124
09	22,3	289	163
10	14,0	424	157
11	11,0	324	112
12	12,8	307	131
13	16,9	278	149
14	12,7	293	160
15	11,0	454	116
16	11,1	252	137
17	10,4	143	109
18	19,1	334	184
19	10,4	140	91
20	18,2	248	94
21	9,7	651	—
22	14,7	167	140
23	14,5	152	156
24	15,4	176	140
25	15,9	368	122
26	12,4	293	118
27	16,4	519	152
28	34,6	326	139
29	9,5	203	148
30	13,6	279	119
31	11,7	186	111
32	10,3	216	106
Médias	14,4	283,3	130,4
Erro padrão	± 0,85	± 19,78	± 4,21

a concentração dos elementos selecionados, em ppm sobre peso seco de fígado, encontramos os seguintes valores médios (com erro padrão):

14,4 ± 0,85 ppm para o cobre

283,3 ± 19,78 ppm para o ferro

130,4 ± 4,21 ppm para o zinco

O controle do método, tal como foi padronizado em nosso laboratório, foi feito da seguinte maneira:

a) determinação do erro de duplicatas em 9 réplicas analíticas usando-se uma mistura de fígado seco bem homogeneizada em gral de porcelana; os resultados, bastante uniformes, estão representados no Quadro 3;

b) prova de recuperação dos três elementos na ausência de matéria orgânica, para controle dos reagentes, possibilidades de perda ou contaminação operacional e reprodutibilidade das leituras no espectrofotômetro. Os resultados estão representados no Quadro 4, tendo sido observadas ótimas recuperações em três níveis de concentração para cada elemento: 101,3% para o cobre, 102,9% para o ferro e 99,0% para o zinco;

c) prova de recuperação na presença de material biológico visando-se o controle da ocorrência de interferências e perda ou contaminação operacional como acima; os resultados, expressos no Quadro 5, são muito bons: 92,9% para o cobre, 97,7% para o ferro e 98,0% para o zinco, não tendo sido verificada a ocorrência de interferências, por parte de outros elementos presentes na cinza, alguns em grande quantidade como o Na, o K, o Ca e o P.

QUADRO 3. Erro de duplicatas (mistura de fígados)

Amostra (n.º)	Elementos (ppm sobre peso seco)		
	Cu	Fe	Zn
1	18,0	677	105
2	19,0	686	103
3	17,5	666	95
4	17,0	656	100
5	13,5	605	90
6	14,5	515	100
7	14,5	696	94
8	17,5	748	106
9	16,0	666	94
Médias	16,4	657,2	98,6
Erro padrão	± 0,72	± 21,8	± 1,86
C.V.	13,1%	9,9%	6,3%

$$\text{Erro padrão } s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$$\text{C.V. (Coeficiente de variação)} = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$$

QUADRO 4. *Provas de recuperação de Cobre, Ferro e Zinco, na ausência da matéria orgânica*

Determinação n.º	Material	Cobre (ppm)		Ferro (ppm)		Zinco (ppm)		Recuperação (%)		
		Adicionado	Achado	Adicionado	Achado	Adicionado	Achado	Cu	Fe ^a	Zn ^a
1	Solução padrão ^b	1,00	1,06	5,00	5,60	0,50	0,75	106,0	92,0	110,0
2	Solução padrão ^b	1,50	1,47	7,50	9,00	2,00	2,10	98,0	100,7	95,0
3	Solução padrão ^b	2,00	2,00	10,0	12,00	5,00	4,80	100,0	110,0	92,0
4	"Blank" total	0,0	0,00	0,0	1,0	0,0	0,20	—	—	—
Total								101,3	102,9	99,0

^a Valor corrigido.

^b Usado o padrão estoque original em diluição conveniente.

QUADRO 5. *Provas de recuperação de Cobre, Ferro e Zinco na presença de material biológico (fígado dessecado de frangos de corte)*

Determinação n.º ^a	Fígado sêco (g)	Recuperação em mg												Recuperação (%)		
		Cobre				Ferro				Zinco				Cobre	Ferro	Zinco
		Pré-exis- tente	Adicio- nado ^b	Pre- visto	Achado	Pré-exis- tente	Adicio- nado ^b	Pre- visto	Achado	Pré-exis- tente	Adicio- nado ^b	Pre- visto	Achado			
1	2.000	24,0	22,5	46,5	44,3	408	125,0	533,0	534,0	266,0	25,0	291,0	286,0	95,3	100,2	98,3
2	2.000	24,0	45,0	69,0	65,0	408	250,0	658,0	650,0	266,0	50,0	316,0	303,0	94,2	98,8	95,9
3	2.000	24,0	67,5	91,5	85,4	408	375,0	783,0	786,0	266,0	100,0	306,0	346,0	93,3	100,4	94,5
4	2.000	24,0	90,0	114,0	101,3	408	500,0	908,0	832,0	266,0	200,0	460,0	482,0	88,9	91,6	103,4
Médias														92,9	97,7	98,0

^a Média de duas determinações.

^b Usado o padrão estoque original em diluição conveniente.

DISCUSSÃO

O cobre, o ferro e o zinco são indiscutivelmente três dos mais significativos oligoelementos presentes nas células, onde exercem atividades variadas nem sempre bem conhecidas, mas indiscutivelmente ligadas à ação enzimática. A elucidação dos processos bioquímicos em que esses elementos participam torna, sem dúvida, atraente o estudo de seus metabolismos. Se bem que alguns desses papéis sejam já de conhecimento geral, há inúmeros pontos ainda não esclarecidos.

Cobre

São poucos os casos em que o papel desempenhado pelo cobre, elemento presente em todos os tecidos vi-

vos, está claramente definido. A anemia induzida por carência de cobre tem sido demonstrada em todas as espécies animais, inclusive nas aves (Underwood 1956).

As anomalias bioquímicas resultantes da deficiência de cobre têm sido, em geral, relacionadas com a atividade enzimática. Tem sido demonstrada, na deficiência de cobre, uma falta de condensação do acil-CoA com o beta-glicerofosfato para formar fosfolípidios, o que é considerado a primeira "lesão" bioquímica na produção dos fosfolípidios nas mitocôndrias hepáticas (Callagher 1957); isto, provavelmente, é a causa da lesão (degeneração) da medula espinhal, verificada em cordeiros com ataxia enzoótica (Tokarnia *et al.* 1966).

Várias observações têm mostrado que o cobre é necessário para a síntese adequada do heme. O sangue de galinhas deficientes em cobre promove, *in vitro*, uma incorporação mais baixa de radioglicina no heme do que aquela observada em aves bem nutridas; a adição de cobre ao sangue desses animais restaura a capacidade de incorporação de glicina ao heme (Anderson & Tove 1958).

Não há evidências da ocorrência de mecanismos de regulação de absorção de cobre, como parece haver para o ferro. Scheinberg e Morell (1957) revelaram, no entanto, uma influência do cobre difusível em equilíbrio com o cobre ceruloplasmínico ao nível do intestino, sobre a absorção do elemento. Em contraste com o ferro, a regulação do cobre parece ser acompanhada por um ajustamento entre as taxas de excreção e absorção (Gubler 1956).

O mínimo necessário de cobre para aves ainda não foi determinado cuidadosamente, apesar de já ter sido mostrada sua necessidade para o crescimento do animal e a formação da hemoglobina (Elvehjem & Hart 1929).

Os ovos de galinha contêm, em média, 0,03-0,06 mg de cobre, mas uma redução na concentração do elemento no ovo, suficiente para afetar sua eclodibilidade ou o desenvolvimento do embrião, não foi ainda descrita (Underwood 1956). Por outro lado, a suplementação de cobre a galinhas em postura, recebendo dieta normal, é inefetiva para aumentar a quantidade de cobre no ovo (Elvehjem *et al.* 1929). As galinhas estão entre os animais que contêm baixos valores de cobre nos tecidos, (15-30 ppm), como o homem, o coelho, o gato, o cão, o porco e o pato, enquanto que outros animais contêm altos valores de cobre (100-800 ppm), como o carneiro, o boi e os peixes.

No seu minucioso trabalho, Beck (1956) relaciona vários dados sobre os teores de cobre no fígado de galinhas de várias raças e idades, com um valor médio de $14,8 \pm 0,4$ ppm cobre sobre o tecido seco. Cunningham (1931) indica valores de 12,4 ppm e Elvehjem (1935), 18,0 ppm, ambos sobre o fígado seco, para galinhas domésticas. Nossos dados estão, pois, perfeitamente concordantes com essas indicações da literatura.

Ferro

O metabolismo do ferro, embora bem estudado no homem, cão, rato e outras poucas espécies, possui ainda muitos aspectos obscuros. No caso particular dos animais domésticos e, dentre estes, especialmente as aves, praticamente o que se conhece é por extrapolação de dados obtidos no homem e em roedores, constituindo-se mesmo num atrativo campo de trabalho aberto à investigação.

Os aspectos que ainda restam mal esclarecidos do metabolismo desse elemento, nos mamíferos onde têm sido mais estudados, são: o mecanismo de absorção, que parece envolver intimamente o potencial de redox celular, ou um mecanismo de transporte ativo onde entrariam em jogo o ácido ascórbico e alguns amino-ácidos; a existência de um mecanismo de regulação da absorção, hipótese favorecida pela eficiência do mecanismo de usura pelo organismo (praticamente só há perda de ferro quando acompanhada de perda de sangue) e pelo baixo "turnover" do elemento no organismo; o papel de transportador exercido pela siderofilina e sobretudo, sua ligação com o ferro. Apesar de não se ter conhecimento da ocorrência natural de carências de ferro em aves, seja em crescimento seja em postura, esse elemento é, sem dúvida, indispensável a esses animais; há, mesmo, grande demanda de ferro por ocasião da postura, sendo a concentração do elemento, no ovo, da ordem de 1 mg (Ramsay & Campbell 1954). A administração adicional de ferro na ração não é acompanhada de aumento do mineral no ovo, nem do nível sanguíneo de hemoglobina (Underwood 1956).

Admite-se também que, sob certas condições, a anemia seja a causa da mortalidade embrionária durante a incubação (Smith & Branion 1936).

Sabe-se, ainda, que a anemia que acompanha por vezes uma intensa produção de ovos não parece estar associada à carência do elemento (Schultze *et al.* 1936), o que mostra a participação de outros fatores ainda mal conhecidos.

Ramsay & Campbell (1954) relacionaram o conteúdo de ferro total no fígado de galinhas poedeiras com o desenvolvimento ovariano e encontraram valores de 8,2 e 6,0 mg Fe/órgão fresco e pesos médios do fígado total de 30,0 e 53,5 g para aves imaturas e em franca postura, respectivamente, o que dá uma equivalência em ppm (sobre o tecido fresco) de 273 para as aves imaturas e 114 para as galinhas em postura.

Os dados por nós obtidos ($283,3 \pm 19,78$ ppm de ferro/peso seco de órgão) pode ser considerado como abrangendo as médias obtidas por esses autores.

Zinco

O metabolismo do zinco possui muitos aspectos não esclarecidos, quer para os mamíferos, quer para as aves, sobretudo.

A importância do zinco como fator de crescimento dos seres vivos, é conhecida desde que Raulin (1869) revelou ser este oligoelemento imprescindível ao desenvolvimento do *Aspergillus niger*. Posteriormente ficou esclarecido que o zinco toma parte em vários enzimas, especialmente as peptidases e a ani-

drase carbônica que contém 0,33% de zinco (Keilin & Mann 1940). Gurd e Wilcox (1956) mostraram que a hipótese da ligação do zinco aos grupamentos imidazólicos da albumina sérica é consistente com as evidências experimentais. O Zn^{2+} na concentração 15 mA forma complexos hidrossolúveis com albuminas, lipoproteínas, glicoproteínas, fosfatase alcalina e estearase séricas. Forma complexos também com proteínas não solúveis em água: lipoproteínas, globulinas e fibrinogênio.

No soro sanguíneo o zinco se encontra em duas formas: firmemente combinada ($\pm 34\%$) e fracamente combinada ($\pm 66\%$). A primeira fração satisfaz à condição do critério de classificação como metaloproteína, mas não foi adequadamente purificada para se estabelecer qual a real percentagem de zinco que as proteínas contêm. A segunda fração pode ser considerada um complexo metaloprotéico, parecendo estar ela relacionada com o transporte de zinco pelo plasma (Vikbladh 1951).

Em aves não se tem conhecimento da ocorrência da carência natural de zinco, como ocorre em suínos (Paraqueratose). Provavelmente isto se deve à riqueza de zinco nos cereais e subprodutos que integram a ração básica desses animais. A intensa utilização do elemento pelo organismo das aves, no entanto, é bem evidenciada no ovo de galinha que encerra de 700–1.000 μg de zinco na gema e 7 μ na clara (Romanoff & Romanoff 1949).

Os aspectos nutricionais do zinco em relação à alimentação das aves são ainda escassamente conhecidos. São raros também os dados sobre concentração desse elemento em tecidos de aves normais. A bibliografia por nós consultada cita apenas valores para animais submetidos a condições experimentais variadas. Savage *et al.* (1964) encontraram no fígado de galinhas de 4 semanas de idade, submetidas à dieta experimental deficiente (8,3 μg Zn/g ração), $55,6 \pm 3,6$ ppm do elemento. Kienholz *et al.* (1964) acharam 143 ppm de zinco no fígado seco de galinhas alimentadas com ração contendo 70 μg Zn/g ração.

Os valores por nós encontrados (130,4 \pm 4,21 ppm Zn no fígado seco de frangos de corte) não se afastam significativamente dos encontrados pelos autores citados.

REFERÊNCIAS

- Anderson, R.L. & Tove, S.B. 1958. Effect of copper deficiency in synthesis of haem. *Nature* 182:315.
- Beck, A.B. 1956. The copper content of the liver and blood of some vertebrates. *Aust. J.Zool.* 4:1-18.
- Cunningham, I.J. 1931. Some physiological and biochemical aspects of copper in animal nutrition. *Biochem. J.* 25:1267-1294.
- Cunningham, I.J. 1955. Diseases caused by deficiencies of trace elements. *Adv. vet. Sci.* 2:138-181.
- Elvehjem, C.A. 1935. The biological significance of copper and its relation to iron metabolism. *Physiol. Rev.* 15:471-507.
- Elvehjem, C.A. & Hart, E.B. 1929. The relation of iron and copper to hemoglobin synthesis in the chick. *J. biol. Chem.* 84:131-141.
- Elvehjem, C.A., Kemmerer, R.R., Hart, E.B. & Halpin, J.G. 1929. The effect of the diet of the hen in the iron and copper content of the egg. *J. biol. Chem.* 85:89-96.
- Gallagher, C.H. 1957. The pathology and biochemistry of copper deficiency. *Aust. vet. J.* 33:311-317.
- Gubler, C.J. 1956. Copper metabolism in man. *J. Am. med. Ass.* 161:530-535.
- Gurd, F.R.N. & Wilcox, P.E. 1956. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and aminoacids. *Adv. Prot. Chem.* 11:311-427.
- Keilin, D. & Mann, T. 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.* 34:1163-1176.
- Kienholz, E.W., Sunde, M.L. & Hoekstra, W.G. 1964. Influence of dietary zinc, calcium and vitamin D for hens on zinc content of tissues and eggs and on bone composition. *Poult. Sci.* 43:667-675.
- Lutz, R.E. 1926. The normal occurrence of zinc in biologic materials. A review of the literature, and a study of the normal distribution of zinc in the rat, cat and man. *J. Ind. Hyg* 8:177-207.
- Ramsay, W.N. & Campbell, E.A. 1954. Iron metabolism in the laying hens. *Biochem. J.* 58:313-317.
- Raulin, J. 1869. (Citado por Lutz 1926).
- Romanoff, A.L. & Romanoff, A.J. 1949. *The avian egg*. J. Wiley, New York. 918 p.
- Savage, J.E., Yohe, J.M., Pickett, E.E. & O'Dell, D.L. 1964. Zinc metabolism in the growing chick. Tissue concentrations and effect of phytate on absorption. *Poult. Sci.* 43:420-426.
- Scheinberg, I.H. & Morell, A.G. 1957. Exchange of ceruloplasmin copper with ionic Cu^{2+} with reference to Wilson's disease. *J. clin. Invest.* 36:1193-1201.
- Schultze, M.O., Elvehjem, C.A., Hart, E.B. & Halpin, J.G. 1936. The hemoglobin content of the blood of laying hens on practical poultry rations. *Poult. Sci.* 15:9-13.
- Smith, J.B. & Branion, H.D. 1936. *Proc. 6th World's Poultry Congr.*, Berlin. 77 p.
- Thiers, R.E. 1954. Contamination in trace element analysis and its control, p. 273-375. In: Click, D. (ed.), *Methods of biochemical Analysis*. Vol. 5. Interscience Publ., New York.
- Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Canella, C.F.C. & Guimarães, J.A. 1966. Ataxia enzoótica em cordeiros na costa do Piauí. *Pesq. agropec. bras.* 1:375-382.
- Underwood, E.J. 1956. *Trace elements in human and animal nutrition*. Academic Press, New York. 430 p.
- Vikbladh, I. 1951. Studies on zinc blood. *Scand. J. clin. Invest. Suppl.* 2:9-74.

ANALYSIS OF BIOLOGICAL MATERIALS BY THE ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY. I. DETERMINATION OF TOTAL COPPER, IRON AND ZINC IN CHICKEN LIVERS

Abstract

Total copper, iron and zinc contents of male Shaver-Starbro pullet chicken livers were determined by atomic absorption spectrophotometry. In applying this method to dry ashed samples of liver tissue from 32

normal animals (1,34 mean body weight) the following values were obtained: $14,4 \pm 0,85$ for copper, $283,3 \pm 19,78$ for iron and $130,4 \pm 4,21$ for zinc (mean \pm standard deviation ppm referred to tissue dry weight).

Recovery tests were carried out to check the occurrence of metal interferences and contamination as well as analytical losses. Very good recoveries were obtained both in the absence of organic matter (101,3% for Cu, 102,9% for Fe and 99,0% for Zn) and in the presence of chicken powder (92,9% for Cu, 97,7% for Fe and 98,0% for Zn). The results of these tests excluded the eventual contamination of the samples, glassware and reagents used. There were no evidences of any spectral interference by other elements normally present in large amounts in the ashes, such as, sodium, potassium, calcium and phosphorus.

Duplicate error of analysis indicated the good reproducibility of the method.

Atomic absorption spectrophotometry quantitative analysis of the metallic elements occurring in animal tissues and body fluids is recommended in view of its sensitivity, versatility and convenience. The advantages have been emphasized particularly for surveys on trace elements deficiencies occurring in bovine and other animal species, which requires a convenient handling of large number of samples. The method offers, even so, the advantage of a direct analytical tool, free of troublesome and time consuming fractionation steps.

The simplicity of the procedure and the reproducibility and reliability of the results obtained lead to the adaption of this method for analytical studies of bovine and avian mineral metabolism undertaken in this laboratory.