

MICRODETERMINAÇÃO DE COBRE E COBALTO EM MATERIAIS BIOLÓGICOS¹

JORGE ALMEIDA GUIMARÃES²

Síntese

É apresentada uma adaptação dos métodos de dosagem de cobalto e cobre em materiais biológicos, consistindo em uma única digestão úmida sulfo-nitro-perclórica. Aliquotas são usadas para a determinação dos dois elementos:

Cobre. Tratamento com pirofosfato de sódio em meio alcalino (hidróxido de amônio) para deionização do ferro; desenvolvimento da cor com dietilditiocarbamato de sódio e extração com álcool n-amílico em funil separador; leitura da cor do dietilditiocarbamato de cobre dissolvido no álcool amílico em 440 nm;

Cobalto. Extração clorofórmica do metal complexado ao I-nitroso-2-naftol a pH 3-4; nova digestão (ácido nítrico) do complexo cobaltoso; desenvolvimento da cor com nitroso-R-sal e leitura a 530 nm.

O método dá recuperações de 93,2% para o cobalto e 94,8% para o cobre na ausência de matéria orgânica inicial e de 97,5% e 101,8%, respectivamente, na presença de apreciável quantidade de fígado seco. Os resultados obtidos recomendam a técnica como boa e indicam que não há interferência de outros elementos.

Nas provas de erro de duplicatas foram obtidos os valores de $35,61 \pm 0,56$ ppm para o cobre e de $0,394 \pm 0,006$ ppm para o cobalto, indicando ótima reprodutibilidade em ambos os casos. As leituras (densidade ótica) nas provas de "blanks" totais foram, respectivamente, de 0,029 e 0,000.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de deficiências de cobre e cobalto no Brasil vem sendo levantada por nós há cinco anos (Tokarnia *et al.* 1968), pela determinação dos níveis desses dois elementos no fígado de animais. Para essas determinações é empregada uma modificação das técnicas de Eden e Green (1940) para o cobre e de Saltzman e Kenan (1957) para o cobalto aplicadas a mineralizado a úmido com mistura sulfo-nitroperclórica. Neste trabalho são apresentados, com detalhes, a descrição da técnica usada para a determinação dos elementos, os resultados de provas de recuperação com e sem a presença de material biológico, e de reprodutividade por prova de erro de duplicatas.

MATERIAL

O material de análise é o fígado coletado dos animais necropsiados em condições adequadas para evitar contaminação química, utilizando-se instrumental de aço inoxidável. Amostras de cerca de 250 g (quantidade suficiente para a análise) são imediatamente preservadas em formol a 10% (Formaldehyde B&A code 1778) contido em frascos de vidro Wheaton de 300 ml de capacidade com tampa plástica (polietileno) e remetidos para o laboratório. A água empregada na lavagem da vidraria, preparação dos reagentes e do formol é deionizada (pela passagem em coluna de resinas de permuta "mixed bed" Barnstead Bantan Standard Demineralizer Cartridge n.º 0802) e/ou redistilada em destilador Femel de vidro Pyrex (S.M.). A lavagem da vidraria obedece à seguinte rotina: lavagem em detergente, água destilada, secagem sulfocrômica, nova lavagem exaustiva com água deionizada e/ou redistilada e finalmente secagem ao ambiente. Os demais cuidados, quanto à possibilidade de contaminação, seguiram as orientações de Thiers (1957).

A medida da absorção luminosa (densidade ótica) ao final de cada método foi feita com espectro-

¹ Recebido para publicação em 17 de novembro de 1967.

Realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, do Conselho de Pesquisas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e do Programa Nacional de Mineralização do Gado do Departamento de Promoção Agropecuária, Min. da Agricultura.

² Professor Assistente do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFRRJ, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26.

fotoômetro de rede de difração "Spectronic 20 B&L", sendo no caso do cobalto utilizado o dispositivo "Roto-Cell" o que nos possibilitou apreciável redução do volume final de reação, com economia de reagentes e grande melhoria na sensibilidade do método. Para o cobre foi usada a cubeta cilíndrica "standard" do aparelho.

MÉTODOS

No laboratório as amostras de fígado são cortadas em pequenos fragmentos e secas em estufa a 105°C durante 24 horas em frascos de vidro neutro.

Para a determinação dos dois elementos são pesadas cerca de 10 g da amostra seca e transferidas para frascos de Kjeldahl de 250 ml de capacidade. A mineralização do material é feita segundo a técnica de Marston e Dewey (1940) com algumas modificações, tratando-se o tecido inicialmente com cerca de 70-100 ml de HNO₃ concentrado (D=1,42) durante aproximadamente 12 horas, sem aquecimento e com agitação periódica nas primeiras horas para evitar perda (espuma) e, posteriormente, com 4 ml de H₂SO₄ (96%), 5 ml de HClO₄ (70%) e aquecimento suave no início e mais forte ao final da digestão.

O mineralizado límpido obtido, em volume pequeno (correspondente ao do H₂SO₄ adicionado) é tratado com 10 ml de HNO₃ diluído 1:1 em banho fervente (ou vapor) por 1-2 horas. A amostra é então transferida para balão volumétrico de 50 ml por lavagens do frasco com 25 ml de H₃PO₄ (85%) diluído 1:50, resfriando-se e completando-se o volume com água.

Nessa fase é retirada uma alíquota de 5 ml para determinação do cobre. O volume restante (45 ml) é utilizado para a determinação do cobalto.

DETERMINAÇÃO DO COBRE

A alíquota de 5 ml é transferida para balão volumétrico de 25 ml juntamente com 10 ml de pirofosfato de sódio a 4% e 5 ml de NH₄OH concentrada segue-se agitação e resfriamento, completando-se o volume com água.

Desenvolvimento da cor. Uma alíquota de 3 ml é transferida para funil separador de 60 ml e então 2 ml de uma solução de dietilditiocarbamato de sódio a 0,5%, preparada na hora do uso por filtração e diluição de um "stock" a 2%, são adicionados às gotas, com agitações intercaladas; 10 ml de álcool n-amílico são adicionados seguindo-se forte agitação por 2 minutos; repouso para desfazer a emulsão e recolhimento do complexo cúprico dissolvido no álcool amílico para tubo de ensaio, desprezando-se a fase aquosa; secagem com pitada de sulfato de sódio anidro; leitura em 440 nm contra "blank" preparado

simultaneamente. O cálculo é feito pelo uso de uma curva padrão previamente preparada e periodicamente controlada com padrões corridos paralelamente às amostras. Nossa curva foi preparada com quantidades de 5, 10, 15 e 20µg de cobre, em triplicata para cada um dos pontos.

DETERMINAÇÃO DO COBALTO

O volume restante (45 ml) correspondente a 9/10 da amostra inicialmente digerida é transferido para funil separador de 125 ml com uma gôta de metil orange a 0,1% em água; segue-se adição de solução de citrato de sódio (500 g do sal com 5% H₂O em 1000 ml de água) em quantidade suficiente para elevar o pH a 3-4; 5 ml da solução de 1-nitroso-2-naftol (2,5 g do reagente dissolvido rapidamente em 125 ml de ácido acético glacial e completado a 250 ml com água) são então adicionados; repouso por uma hora com agitação periódica para formação do complexo cobaltoso.

Extração do cobalto. A extração do complexo cobaltoso é feita com porções de 10 ml de clorofórmio por agitação vigorosa de 3 minutos cada, até total clareamento do extrato orgânico (geralmente três vezes); recolhimento dos extratos em outro funil separador e remoção das impurezas com 25 ml de HCl 1:100 por agitação de 2 minutos; drenagem da fase clorofórmica purificada para bequer seco de 100 ml e nova extração de traços de clorofórmio deixados no segundo funil com uma porção de 5 ml do solvente.

Digestão do extrato clorofórmico. O extrato clorofórmico é evaporado em banho fervente; o bequer é mantido recoberto com vidro de relógio nesta e nas fases seguintes. A digestão do resíduo clorofórmico é iniciada por um ligeiro aquecimento (placa) com 0,5 ml de HNO₃ concentrado até dissolução, quando então, 1 ml de sulfato de sódio a 10% é adicionado; a seguir a mistura é evaporada à secura. Novas porções de 0,5 ml de ácido nítrico são adicionadas até obtenção de uma cinza branca sem restos de matéria orgânica.

Desenvolvimento da cor. A cinza obtida é dissolvida em 1 ml de solução de H₃PO₄ 1:50 e 0,2 ml da solução de nitroso-R-sal a 0,1% em água; segue-se suave agitação e adição de 0,4 ml de acetato de sódio em solução (50 g do sal triidratado em 100 ml de água); o bequer é ligeiramente agitado e levado ao banho fervente (ou vapor) por 3 minutos, findos os quais são adicionados 0,15 ml de HCl concentrado (sem tirar do banho), sendo deixado no aquecimento mais 2 minutos; resfriamento em água corrente e transferência da solução corada para tubos de ensaio de 3 ml (traço previamente marcado) e completado o volume com água. A leitura da cor

é feita em 530 m μ contra "blank" corrido paralelamente e o cálculo processado mediante o uso de uma curva padrão construída com 2, 4, 6 e 8 μ g de cobalto, em triplicata cada um dos pontos.

RESULTADOS

Os resultados das provas de recuperação de cobre e cobalto encontram-se no Quadro 1 e nas Fig. 1 e 2.

QUADRO 1. Provas de recuperação de cobre e cobalto na ausência de matéria orgânica

Número	Material	Cobre			Cobalto		
		Adicionado (μ g)	Achado (μ g)	%	Adicionado (μ g)	Achado (μ g)	%
1	Sol. padrão	5,0	4,91	98,2	2,0	1,80	90,0
2	Sol. padrão	10,0	9,74	97,4	4,0	3,68	92,0
3	Sol. padrão	15,0	13,34	88,9	6,0	5,59	93,2
4	Sol. padrão	20,0	18,94	94,7	8,0	7,80	97,5
Médias		—	—	94,8	—	—	93,2

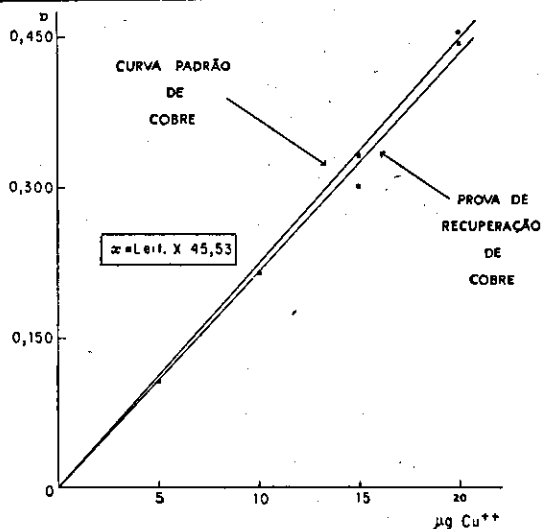


FIG. 1. Prova de recuperação de cobre.

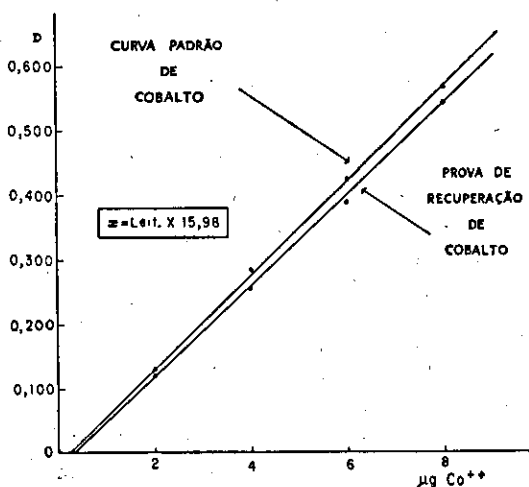


FIG. 2. Prova de recuperação de cobalto

Os resultados encontrados para a aplicação da técnica em toda a sua extensão sobre os reagentes e a água, mas também, para teste da eficiência da lavagem da vidraria ("blanks" totais) encontram-se no Quadro 2.

A recuperação dos dois metais em presença de material biológico (fígado) forneceu os resultados apresentados no Quadro 3.

Os dados referentes à prova de determinação do erro de duplicatas foram lançados no Quadro 1.

QUADRO 2. "Blanks" totais do método

Número	Densidade ótica	
	Cu (440 nm)	Co (530 nm)
1	0,037	0,000
2	0,025	0,000
3	0,025	0,000
Médias	0,029	0,000

DISCUSSÃO

A digestão única para as determinações de cobre e cobalto em material biológico constitui uma vantagem sobre as técnicas que recomendam fases distintas. Dada a pequena concentração de cobalto nos tecidos biológicos animais (entre 0,1 ou menos a raramente mais de 0,5 ppm sobre a matéria seca), é necessário utilizar amostras relativamente grandes do material (cerca de 10 g no caso do fígado); como essa quantidade é exagerada para a determinação do cobre, tomam-se alíquotas convenientes para a avaliação final deste.

QUADRO 3. *Provas de recuperação de cobre e cobalto em presença de material biológico (figado)*

N.º	Material			Recuperação					
	Fígado seco (g)	Cobre (µg)	Cobalto (µg)	Cobre			Cobalto		
				Existente (µg)	Achado (µg)	%	Existente (µg)	Achado (µg)	%
1	10,6	5,0	2,0	40,61	40,7	100,2	5,94	6,09	102,5
2	10,0	5,0	2,0	40,61	41,5	102,2	5,94	5,79	97,5
3	10,6	15,0	6,0	50,61	52,1	102,9	9,94	8,99	90,4
4	—	—	—	—	—	—	9,94	9,89	99,5
Médias				101,8			97,5		

QUADRO 4. *Prova do erro de duplicatas (Amostra 2195)*

Determinação (n.º)	Cobre (ppm)	Cobalto (ppm)
1	33,0	0,41
2	34,6	0,39
3	35,7	0,38
4	34,7	0,41
5	36,5	0,40
6	37,1	0,43
7	39,1	0,39
8	37,1	0,39
9	33,7	0,37
10	34,6	0,37
Médias	35,61 ± 0,56 ^a	0,394 ± 0,006 ^a

$$^a \text{ Erro Padrão} = s_x = \sqrt{\frac{S(x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

O grande volume de ácido nítrico utilizado na digestão inicial pode ser reduzido, mas então é necessário maior atenção nas primeiras horas, para evitar perdas por borbulhamento. Para o clareamento final da amostra pode ser usado um pequeno excesso dos ácidos sulfúrico e perclórico.

Na fase inicial da digestão o aquecimento suave (suficiente para manter a ebulição) é garantia para não haver perdas e permite completa digestão com o aumento de temperatura no final. Nesta última fase é recomendada a rotação periódica do balão na chama para evitar perdas por fusão do material no vidro.

O tratamento do mineralizado pelo HNO₃ diluído em banho fervente hidrolisa os polifosfatos, que se regeneram quando a temperatura é superior a 100°C; o uso do H₂PO₄ diluído, nessa fase como nas outras, facilita a dissolução da cinza e a transferência do material.

Na determinação do cobre, a adição de pirofosfato garante a deionização do ferro em meio alcalino, além disso o meio alcalino é propício à complexação do dietilditiocarbamato de sódio com o cobre. O uso do funil separador nessa fase substitui com vantagem a centrifugação para a separação das fases orgânica e aquosa. A adição do pirofosfato e da amônia deve ser feita na hora de se proceder à determinação do cobre.

Na avaliação do cobalto, a fase de ajustagem do pH a 3-4 pelo citrato de sódio é importante, mas não é crítica; foram obtidos bons resultados ("blanks" zero) utilizando o citrato de sódio B&A n.º 2234, sem necessidade de purificação com ditizona recomendada por Saltzman & Kenan (1957). O sulfato de sódio adicionado antes da segunda digestão garante uma base material para a destruição do complexo orgânico; geralmente 6-8 porções do HNO₃ são suficientes para o completo clareamento da amostra, o que é indispensável. A evaporação da primeira porção do ácido nítrico requer cuidados para evitar perda, o que pode ser auxiliado pela ajustagem no aquecimento mínimo da placa. O HCl adicionado depois de desenvolvida a cor com o nitroso-R-sal por aquecimento, decompõe os complexos formados com metais interferentes.

Os produtos corados formados em ambas as técnicas são estáveis por mais de 24 horas; no caso do cobre, ele só é estável no extrato orgânico (álcool amílico) separado da fase aquosa. O complexo cúprico tem coloração amarelada e o de cobalto vai do verde ("blank") até o vermelho vivo.

Os resultados obtidos para as provas de recuperação na presença ou não do material biológico, para ambos os metais, recomendam a técnica como boa e indicam que não há interferência de outros ele-

mentos. O "blank" total para cobre é, em média, de 13 µg enquanto que, no caso do cobalto, não há, geralmente, problema de contaminação.

A técnica tem sido usada em grande número de amostras de fígado de animais para a determinação dos dois elementos.

REFERÊNCIAS

Eden, A. & Green, H. H. 1940. Microdetermination of copper in biological material. *Biochem. J.* 34: 1202-1208.

Marston, H. R. & Dewey, D. W. 1940. The estimation of cobalt in plant and animal tissue. *Aust. J. exp. Biol.* 18: 343-352.

Saltzman, B. E. & Kenan, R. I. 1967. Microdetermination of cobalt in biological materials, p. 181-223. *In* Glick, D. (ed.). *Methods of biochemical analysis*. 5th vol. Interscience Publ., New York.

Thiers, R. E. 1957. Contamination in trace element analysis and its control, p. 273-335. *In* Glick, D. (ed.). *Methods of biochemical analysis*. 5th vol. Interscience Publ., New York.

Tokarnia, C. H., Canella, C. F. C., Guimarães, J. G. & Döbereiner, J. 1968. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos no Nordeste e Norte do Brasil. *Pesq. agropec. bras.* 3:351-360.

MICRODETERMINATION OF COPPER AND COBALT IN BIOLOGICAL MATERIALS

Abstract

Copper and cobalt can be estimated in a single digest (sulfo-nitro-perchloric) of biological materials using the method of Eden and Green (1940) and the method of Saltzman and Kenan (1957), respectively applied on adequate aliquots.

The method gives recoveries of 93.2% for cobalt and 94.8% for copper in the absence of initial organic material; and of 97.5% and 101.8% respectively in the presence of appreciable quantities of dry liver tissue.

The results obtained recommend it as a good technique. Apparently there is no interference from other elements. In tests of reproducibility, values of 35.61 ± 0.56 ppm for copper and 0.394 ± 0.006 ppm for cobalt indicate good reproducibility in both cases. In tests for contamination, optical density readings were 0.029 for copper and 0.000 for cobalt.