

DETERMINAÇÃO DE COBALTO EM FEZES DE BOVINOS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO HCL 1M¹

MÁRIO MIYAZAWA², MARCOS ANTONIO PAVAN³, MARIA DE FÁTIMA MEZALIRA BLOCH⁴,
PAULO SÉRGIO ALESSI ARISTIDES⁵, GILBERTO BATISTA DE SOUZA⁶
e SÉRGIO NOVITA ESTEVES⁷

RESUMO - Foi avaliado um método de extração com HCl 1M sem digestão, para determinação de Co em fezes de bovinos que receberam rações contendo Co, utilizado como marcador da taxa de digestão dos animais. Os resultados foram comparados com os obtidos pelos métodos convencionais de digestões via seca e úmida. O procedimento do método proposto envolve agitação de 1,0 g da amostra das fezes bovinas com 10 ml de HCl 1M, aquecimento por 15 minutos em banho maria a 80°C, seguido de agitação por 30 minutos e adição de água destilada para completar o volume evaporado para 10 ml. O extrato foi filtrado, e o Co determinado por espectrofotometria de absorção atômica. A concentração de Co nas fezes bovinas variou de 0 a 170 µg/g. Os teores de Co extraído pelo método com HCl 1M foram correlacionados significativamente com os obtidos pelas digestões vias seca e úmida; 98,3% do Co adicionado nas amostras foi recuperado pelo método sem digestão com um coeficiente de variação de 1,48%. O método sem digestão demonstrou ser mais rápido, menor custo, não produz gases tóxicos, elimina o perigo de explosão do HClO₄, não requer condições especiais de laboratório e boa precisão e exatidão.

Termos para indexação: nutrição animal, digestão de material biológico, marcador da taxa de digestão, espectrofotometria de absorção atômica.

COBALT DETERMINATION IN BOVINE FAECES BY EXTRACTION WITH 1M HCL

ABSTRACT - A non-digestion HCl method is described for extract Co in bovine faeces, which animals were fed with Co as marker in digest rate. The results were compared with those obtained by conventional dry-ashing and acid digestion techniques. The procedure for the proposed method involves shaking of 1.0 g of the bovine faeces sample with 10 ml of 1MHCl, heating in wather bath at 80°C for 15 minutes, and shaking for 30 minutes. The extract was filtered and Co determined by atomic absorption spectrophotometry. The concentration of Co in the bovine faeces varied from 0 to 170 µg/g. The proposed method gives Co values that are in close agreement with those obtained with conventional digestion techniques; 98.3% of added Co in the bovine faeces was recovered by the non digestion method, and the variation coefficient was 1.48%. This technique was found to be more rapid, lower cost, not yield toxic gases, eliminate HClO₄ explosion danger, does not require special laboratory facilities, and of satisfactory precision and accuracy.

Index terms: animal nutrition, digestion rate marker, biological material digestion, atomic absorption spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O estado nutricional das plantas ou dos animais pode ser avaliado através de análise de certas partes dos seus tecidos. Para isso, os tecidos biológicos são mineralizados e os elementos determinados por métodos adequados. A mineralização do tecido biológico pode ser feita pela incineração na mufla entre 450-650°C durante três a oito horas, técnica denominada de di-

¹ Aceito para publicação em 18 de fevereiro de 1992.

² Químico, Dr., Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).
Caixa Postal 1331, CEP 86001 Londrina, PR.

³ Eng. - Agr., Ph.D., IAPAR.

⁴ Técnica em Química, IAPAR.

⁵ Técnico em Química, IAPAR.

⁶ Químico, EMBRAPA/UEPAE de São Carlos, Caixa Postal 339, CEP 13560 São Carlos, SP.

⁷ Méd. - Vet., Dr., EMBRAPA/UEPAE de São Carlos.

gestão seca. A seguir, as cinzas são dissolvidas com a solução de HCl ou HNO₃, e os elementos, determinados por métodos analíticos.

A digestão úmida é outra técnica utilizada para a mineralização de tecidos biológicos, onde as amostras são digeridas com misturas de ácidos oxidantes inorgânicos e aquecidos em bloco digestor entre 150°C a 380°C, conforme a mistura de ácidos utilizados. As principais misturas utilizadas são: HNO₃ + HClO₄; HClO₄ + HNO₃ + H₂O₂; H₂SO₄; H₂SO₄ + HNO₃ + HClO₄, entre outras.

Estas técnicas utilizadas para digestão de materiais biológicos apresentam algumas desvantagens, tais como: (1) digestão seca: muito demorada, alto consumo de energia e baixo rendimento analítico; e (2) digestão úmida: apesar de apresentar ótimas características analíticas, como rapidez, precisão e exatidão, durante a digestão há despreendimento de gases tóxicos (NO₂, NO, etc.) e vapores ácidos (HCl, HClO₄, HNO₃, SO₃, etc.). Estes gases são altamente corrosivos, podendo destruir os aparelhos e equipamentos utilizados na digestão.

Portanto, procuram-se alternativas para contornar estes problemas com o desenvolvimento de outros métodos de extração que apresentem boas características analíticas e menos tóxicos e menos corrosivos.

A extração sem digestão de elementos químicos em tecidos vegetais com a solução de HCl é uma técnica alternativa utilizada por vários pesquisadores (Sahrawat 1980, Hunt 1982, Miyazawa et al. 1984, Hamzé et al. 1984, Correa et al. 1985). Os autores comprovaram a viabilidade do uso desta técnica sem digestão para trabalhos de rotina em laboratório, visando a extração dos principais nutrientes nos tecidos das plantas cultivadas. O método utiliza apenas o ácido clorídrico eliminando o ácido perclórico e conseqüentemente diminuindo os riscos de explosão e danos dos aparelhos e equipamentos. Miyazawa et al. (1987) utilizaram esta mesma técnica para extração de Ca, Mg, K, Na, Mn, Fe, Cu e Zn em amostras de fígados de animais.

Os teores normais de cobalto (Co) nos tecidos biológicos (folhas, pecíolos, ramos, sementes e frutos de plantas; fígado, rim e pelos de

animais) estão em torno de 0,001 a 1,0 g/g, cujas concentrações são, em geral, inferiores ao limite de detecção da técnica de espectrofotometria de absorção atômica por chama (Standard Atomic Absorption Conditions for Cobalt 1982). Entretanto, quando o Co é fornecido como indicador para medir a velocidade do fluxo da digestão líquida no trato gastro-intestinal de bovinos, a sua concentração nas fezes dos animais pode atingir níveis detectáveis por espectrofotometria de absorção atômica com chama (Udén et al. 1980). Neste caso, o Co tem sido extraído das fezes dos animais através dos métodos clássicos de digestão seca ou úmida.

O objetivo deste experimento foi avaliar a possibilidade de extração sem digestão do Co nas fezes bovinas com a solução de HCl 1M.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e equipamentos:

- HNO₃ p.a., HCl p.a., HClO₄ p.a.
- Solução de HCl 1M
- Solução-padrão de Co²⁺: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/ml em HCl 1M e HClO₄ 0,25M
- Mufla elétrica
- Espectrofotômetro de absorção atômica (EAA), Perkin Elmer 503
- Banho-maria
- Agitador horizontal
- Bloco digestor

Método de coleta das amostras

Foram coletadas amostras das fezes dos bovinos no curral e transferidas para o laboratório onde foram secadas em estufa a 65°C até peso constante, moídas, passadas na peneira de 1 mm e armazenadas em frascos de vidro.

Métodos de abertura das amostras

1. **Digestão seca:** transferiu-se 1,0 g da amostra de fezes de bovinos para cadinho de porcelana de 40 ml e incinerou-se na mufla elétrica a 530°C durante três horas. Após o resfriamento da amostra à temperatura ambiente, adicionaram-se 10 ml da solução de HCl 1M na cinza e determinou-se o Co por EAA.

2. **Digestão úmida:** transferiu-se 1,0 g da amostra de fezes de bovinos para tubo de digestão de 100 ml e

adicionaram-se 10 ml da mistura de ácidos HNO_3 + HClO_4 na proporção 4:1. Digeriram-se as amostras no bloco digestor de alumínio a 150°C até a completa mineralização do material. Após a digestão, adicionaram-se 10 ml de água destilada e determinou-se o Co por EAA.

3. **Extração direta com HCl:** transferiu-se 1,0 g da amostra de fezes de bovinos para frasco de 40 ml, adicionaram-se 10 ml da solução de HCl 1M, aqueceu-se a suspensão durante 15 minutos em banho-maria a 80°C , agitou-se durante 30 minutos, e completou-se o volume evaporado com água destilada para 10 ml. A seguir, filtrou-se a suspensão em funil, utilizando-se papel de filtro quantitativo de 15 mm de diâmetro, e determinou-se o Co por EAA. Os procedimentos para extração e determinação de Co nas amostras das fezes de bovinos foram conduzidos em duplicatas.

Determinação de Co

O Co extraído das fezes de bovinos pelos métodos descritos foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica, marca Perkin Elmer, modelo 503, com a chama ar-acetileno $\lambda = 204,7$ nm e estimado pela interpolação dos valores das absorbâncias das curvas-padrão do Co preparadas em soluções de HCl 1M (digestão seca e sem digestão) ou HClO_4 0,25 M (digestão úmida).

Foram utilizadas amostras de fezes de bovinos obtidas na Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual (UEPAE), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em São Carlos, SP. Os animais receberam na ração dose única de Co-EDTA preparado de acordo com as recomendações de Udén et al. (1980). Utilizaram-se 39 amostras de fezes de bovinos para a digestão via seca e 52 para a digestão via úmida, e, por extração direta, digestão com HCl, representando diferentes períodos de coleta das fezes após os animais terem ingerido rações contendo Co-EDTA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação de métodos

Nas Fig. 1 e 2 são apresentados os resultados comparativos dos teores de Co determinados pelos métodos de extração com HCl 1M e com as digestões via seca e úmida, respectivamente. As concentrações de Co nas fezes bovinas analisadas apresentaram uma ampla variação, ou se-

ja, de 0 a 170 g/g. Os resultados demonstraram correlações altamente significativas entre os métodos de extração, indicando que o método com HCl 1M extraiu quantidades semelhantes de Co em relação às digestões seca e úmida. Miyazawa et al. (1984 e 1987) demonstraram que o

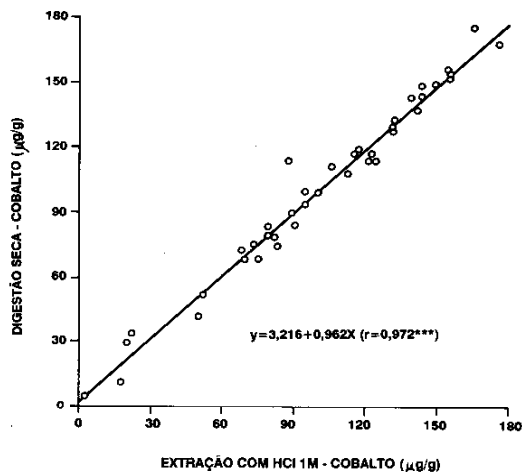


FIG. 1. Comparação entre os métodos de extração com HCl 1M e digestão via seca para extração de Co em fezes bovinas.

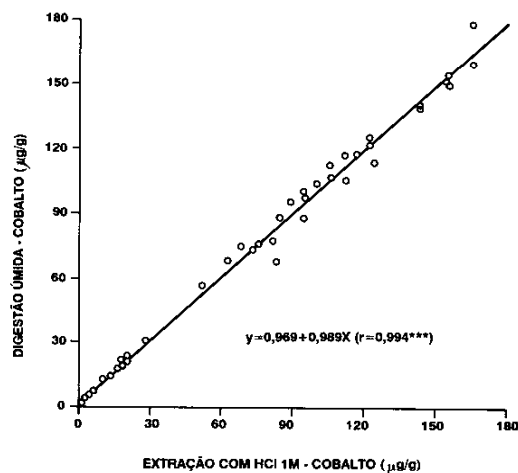


FIG. 2. Comparação entre os métodos de extração com HCl 1M e digestão via úmida para extração de Co em fezes bovinas.

método com HCl 1M foi eficiente na extração dos metais Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} tanto em tecidos de origem vegetal como animal. Assim, é esperado que o método com HCl 1M também seja eficiente na extração de Co em materiais biológicos, porque, de acordo com a série de estabilidade dos complexos organometálicos (M^{2+} -orgânico) descrito por Irving & Williams (1948), os cátions Cu^{2+} e Zn^{2+} são mais estáveis que o Co^{2+} .

Adição de padrão de Co nas fezes bovinas

Os resultados da adição de soluções padrão de Co (0, 5, 10 e 20 g/g, como $CoSO_4$) nas fezes bovinas, seguida da extração com HCl 1M e determinação do Co por EAA, são apresentados na Tabela 1. A recuperação do Co adicionado nas fezes bovinas variou de 104% a 93%, com uma média de 98,3%.

Precisão do método em digestão

As determinações de dez vezes consecutivas dos teores de Co em amostras de fezes bovinas são apresentadas na Tabela 2. Os resultados demonstraram que o coeficiente de variação (CV%) das três amostras analisadas foi, em média, 1,48%, o que indica boa precisão do método de extração direta com HCl para análise de rotina em laboratório para determinação de Co em fezes bovinas.

TABELA 1. Comparação do Co adicionado nas fezes bovinas.

Co adicionado	Co encontrado	Co recuperado
	$\mu g/g$	%
0,0	0,0	-
5,0	5,2	104
10,0	9,8	93
20,0	18,6	93

TABELA 2. Precisão do método de extração com HCl 1M para determinação de Co em amostras de fezes bovinas.

	Concentração de Co ($\mu g/g$)		
	Amostra A	Amostra B	Amostra C
	12,4	21,2	48,1
	12,4	21,2	48,8
	12,0	21,2	47,9
	12,4	20,8	47,9
	12,0	20,4	49,6
	12,0	20,8	48,3
	12,4	21,2	49,6
	12,4	20,8	49,2
	12,0	21,2	49,2
	12,0	21,1	49,2
\bar{X}	12,20	24,00	48,75
r	0,21	0,28	0,66
CV%	1,73	1,35	1,36

CONCLUSÕES

1. Os teores de Co extraídos das fezes bovinas pelo método sem digestão com HCl 1M foram significativamente correlacionados com as digestões seca ($Y = 3,216 + 0,962X$, $r = 0,972^{***}$) e úmida ($Y = 0,969 + 0,989X$, $R = 0,994^{***}$).

2. O Co adicionado nas fezes bovinas (0, 5, 10 e 20 g/g) foi recuperado em média 98,3% pelo método de extração direta com HCl 1M.

3. O método proposto pode ser utilizado para extração de Co das fezes bovinas com boa precisão e exatidão e eliminado as desvantagens dos métodos convencionais de digestão seca e úmida.

REFERÊNCIAS

- CORREA, A.E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. Método de não-digestão para extração de boro em folhas de plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.20, n.10, p.1213-1216, out. 1985.

- HAMZÉ, M.; NIMAH, M.; ZAABOUT, M. Effectiveness of six digestion procedures to evaluate the status of major elements (Ca, K, Mg, and Na) in citrus leaves. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.15, p.1135-1145, 1984.
- HUNT, J. Dilute hydrochloric acid extraction of plant material for routine cation analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.13, p.49-55, 1982.
- IRVING, H.M.; WILLIAMS, R.J.P. Order of stability of metal complexes. *Nature*, London, v.162, p.746-747, 1948.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M. Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.15, p.141-147, 1984.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M. Método rápido para extração de elementos químicos em fígado de animais. *Revista Brasileira Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.9, p.62-64, 1987.
- SAHRAWAT, K.L. A rapid non-digestion method for determination of potassium in plant tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.11, p.753-757, 1980.
- STANDARD Atomic Absorption Conditions for Cobalt. In: *ANALYTICAL Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Norwalk: Perkin-Elmer, 1982.
- UDÉN, P.; COLUCCI, P.E.; Van SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium, and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal of the Science Food and Agriculture*, London, v.31, p.625-632, 1980.