

## **NOVO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE Br, Cl, F E I EM RAÇÕES DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS APÓS DECOMPOSIÇÃO POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS**

Diogo La Rosa Novo\*; Filipe Soares Rondan; Marcelo Guerreiro Crizel; Rodrigo Mendes Pereira; Vanize Caldeira da Costa; Márcia Foster Mesko\*\*

Universidade Federal de Pelotas - \*diogo.la.rosa@hotmail.com; \*\*marciamesko@pq.cnpq.br

### **1. INTRODUÇÃO**

O monitoramento da qualidade dos alimentos ingeridos pelos animais, através do controle da ingestão de nutrientes, é indispensável para contribuir para o bom funcionamento do organismo. Nesse sentido, é de suma importância que sejam fornecidos para os animais produtos de qualidade, visando uma suplementação alimentar que venha suprir as necessidades, sem causar complicações fisiológicas. Assim, tratando-se de micronutrientes essenciais, o bromo, cloro, flúor e iodo destacam-se por desempenharem importantes funções no organismo animal (MCDOWELL, 1992). Contudo, a absorção excessiva de micronutrientes podem causar diversas implicações como, por exemplo, a obstrução do trato urinário, problemas renais e doenças como fluorose e hipertireoidismo no caso do Cl, F e I, respectivamente, e possíveis casos de câncer relacionados a absorção de Br, principalmente, na forma de  $\text{BrO}_3^-$  (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

Assim, dada a relevância do tema, instituições como a Association of Analytical Communities (AOAC) desenvolveram métodos oficiais para a determinação de Cl, F e I em ração animal (WORWITZ; LATIMER, 2011). Entretanto cabe mencionar que apesar da importância da determinação de Br, não existem métodos oficiais que tratem da determinação deste elemento em alimentos destinados a dieta animal. De uma forma geral, os métodos recomendados pela AOAC apresentam inúmeras desvantagens, visto que envolvem o uso de uma elevada porção de amostra e volumes de soluções concentradas. Além disso, estes métodos empregam inúmeras etapas durante o preparo de cada replicata, nas quais a possibilidade de ocorrerem perdas dos analitos e contaminação das amostras é aumentada e, consequentemente, poderá comprometer a reprodutibilidade, a exatidão e a precisão dos resultados (FLORES et al., 2004).

Ademais, deve-se mencionar a difícil tarefa de empregar um método adequado à determinação de halogênios, principalmente, devido a elevada volatilidade desses elementos. Nesse sentido, em se tratando de amostras que contenham elevado teor de matéria orgânica como é o caso da ração animal, geralmente, para que se converta a amostra em uma solução adequada para posterior análise, comumente faz-se necessário o uso de ácidos concentrados. Entretanto, as perdas podem ser potencializadas durante a decomposição das amostras, tendo em vista a possível formação de substâncias voláteis destes elementos (NÓBREGA et al., 2006).

Neste contexto, diversas formas de minimizar estas perdas tem sido propostas na literatura, como por exemplo, o uso de sistemas fechados de decomposição de amostra associados ao uso de soluções alcalinas e o emprego de técnicas de combustão (FLORES et al., 2004). Neste sentido, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) tem merecido destaque, sendo recentemente empregada para a decomposição de amostras com elevado teor de matéria orgânica para a posterior determinação de halogênios (CRIZEL et al., 2015). Neste sistema a decomposição das amostras ocorre em frascos fechados e pressurizados com oxigênio, o que

reduz a possibilidade de perdas por volatilização e contaminações oriundas do ambiente. Além disso, há a possibilidade de escolha da solução absorvedora mais adequada à absorção dos analitos e a técnica de determinação (FLORES et al., 2004).

No âmbito da determinação de halogênios, a cromatografia de íons merece destaque por apresentar elevada sensibilidade, capacidade de determinação multielementar, além do baixo custo quando comparado às técnicas espectrométricas, comumente empregadas para a determinação destes elementos em nível traço. Assim, diante do exposto, faz-se necessário a decomposição eficiente das amostras para que se minimize a ocorrência de possíveis interferências durante a etapa de determinação. (LOPEZ-RUIZ, 2000) Dessa forma, devido a escassez de métodos desenvolvidos visando o controle de qualidade mais efetivo, rápido e confiável de rações, este trabalho teve por objetivo propor um método adequado para análise de ração animal visando a determinação de Br, Cl, F e I por IC.

## 2. METODOLOGIA

As amostras de ração animal foram adquiridas no comércio local de Pelotas-RS. Inicialmente, estas amostras foram moídas em moinho de facas (Lucadema Científica – Modelo 226/5) e secas em estufa (DeLeo – Modelo 400/2ND) a 65 °C por 12 h, sendo posteriormente armazenadas em frascos de polietileno para posterior decomposição e análise.

A decomposição por MIC, foi realizada empregando um forno de micro-ondas (Multiwave 3000®, Anton Paar), contendo 8 frascos de quartzo (80 ml, 80 bar e 280 °C). As amostras foram envolvidas em polietileno (4x6 cm) selado por aquecimento. Foi avaliada a massa máxima de amostra (0,3 – 1,5 g) que poderia ser decomposta levando em consideração o aspecto das soluções. Os invólucros contendo as amostras foram dispostos sobre um disco de papel filtro (15 mm de diâmetro, 12 mg) umedecido com (50 µl) de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  na base de suportes de quartzo. Os suportes contendo as amostras foram inseridos em frascos de quartzo contendo 6 ml de uma solução absorvedora avaliada. Para tanto, avaliou-se o emprego de água ultrapura e solução de carbonato  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  em concentrações de 10, 50, 100 ou 200 mmol  $\text{l}^{-1}$ . Posteriormente, os frascos foram pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$ , por 1 min. A seguir, submeteu-se as amostras a um programa de decomposição assistido por radiação micro-ondas com as seguintes etapas: i) 1400 W/ 40 s; ii) 0 W/2 min; iii) 1400 W/5 min e iv) 0 W/20 min.

Após o resfriamento, as soluções contendo os analitos foram acondicionadas em frascos volumétricos de 25 ml. O pH das soluções obtidas após a decomposição foram determinados utilizando um pHmetro (mPa-210, MS Tecnoyon Instrumentação). A determinação multielementar foi conduzida em um cromatógrafo de íons (IC 861, Metrohm) equipado com um sistema de supressão modelo 853, coluna modelo Metrosep A Supp5 com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno e uma pré-coluna modelo A Supp 4/5 Guard. A alça de amostragem utilizada foi de 20 µl e a fase móvel utilizada foi uma solução constituída de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ )/ $\text{NaHCO}_3$  (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) com vazão de 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$ .

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, devido ao fato de não existir um material de referência certificado de matriz semelhante a amostra. Para esta análise foram realizadas adições de concentrações conhecidas dos elementos durante a etapa de preparo e determinação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi avaliada a massa de amostra possível de ser decomposta no sistema visando a obtenção de menores limites de detecção (LDs), sendo que para algumas amostras foi possível decompor massas de 0,8 g, enquanto que para outras, 1,1 g. Isso ocorreu provavelmente devido as diferentes composições das amostras, além dos distintos processos de produção empregados. Nesse sentido, pode-se inferir que a composição das amostras pode influenciar no processo de decomposição, podendo levar a reações mais lentas e complexas no processo de oxidação da matéria orgânica. Contudo, vale mencionar que maiores estudos serão realizados visando a caracterização físico-química das amostras com o intuito de determinar a composição majoritária das rações.

Após ter sido estabelecida a massa de amostra, foram realizados ensaios de recuperação para avaliar a solução mais adequada para a absorção dos analitos. Com relação aos resultados, embora tenha-se obtido recuperações satisfatórias para Br, Cl e F em todas concentrações de soluções absorvedoras avaliadas (96 – 106%), para I recuperações adequadas somente foram obtidas com o uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  em concentrações iguais ou superiores a 50 mmol  $\text{l}^{-1}$ .

Com o intuito de averiguar estes resultados, o pH das amostras após a decomposição foi determinado, visto que esta variável influencia na estabilidade dos analitos em solução. Com relação aos resultados, pode-se observar que baixos valores de pH (2,7 e 3,5) foram obtidos quando utilizou-se  $\text{H}_2\text{O}$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  10 mmol  $\text{l}^{-1}$ . Entretanto, quando utilizadas soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  em concentrações de 50 a 200 mmol  $\text{l}^{-1}$ , o pH determinado variou entre 7,5 e 8,5. Com base nestes resultados, pode-se inferir que possíveis perdas de I ocorreram na forma de suas espécies voláteis em soluções com pH ácido. Esse resultado pode estar atrelado ao fato de que o I é o mais ácido dentre os halogênios e, consequentemente, o mais suscetível a perdas por volatilização.

Assim, após a escolha da solução absorvedora adequada para todos os analitos, amostras de ração destinadas a alimentação de animais de produção foram decompostas por MIC utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{l}^{-1}$  para absorver os analitos. Posteriormente, foi feita a quantificação de Br, Cl, F e I por IC. Os LDs do método proposto foram calculados segundo o método sugerido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) ( $\text{LD} = 3s + X$ ,  $n = 10$ ) e, considerando a decomposição de massas de 0,8 g.

Foram obtidos baixos LDs para todos os analitos (Br: 3,29 mg  $\text{kg}^{-1}$ ; Cl: 11,15 mg  $\text{kg}^{-1}$ ; F: 1,0 mg  $\text{kg}^{-1}$  e I: 4,74 mg  $\text{kg}^{-1}$ ). Cabe mencionar que o LD mais elevado obtido de Cl, possivelmente, está associado a dificuldade tarefa de determinação desse elemento, pois além da possibilidade de perdas por volatilização, este elemento, comumente está associado a possibilidade de contaminações durante o preparo das amostras.

Os resultados obtidos para Br, Cl, F e I por IC para as diferentes amostras de ração após a decomposição por MIC utilizando a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{l}^{-1}$  para absorver os analitos são apresentados na Tabela 1. Assim, pode-se perceber que a concentração de Br e I em todas as rações avaliadas estão abaixo do LD do método desenvolvido. Além disso, a concentração de F em ração destinada a coelhos também se encontra abaixo do LD. Em contrapartida, o método proposto proporcionou a determinação das concentrações de Cl em todas as amostras avaliadas, bem como F em rações destinadas a terneiros e cavalos. Vale mencionar que foram obtidos resultados com uma boa precisão para todos os analitos (RSDs < 8%), mesmo em diferentes concentrações.

**Tabela 1.** Concentrações de Br, Cl, F e I em ração animal determinadas por IC, após a decomposição por MIC utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{l}^{-1}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ;  $n=3$ ).

Ração	Br	Cl	F	I
Terneiros	< 3,29	2056 $\pm$ 243	101 $\pm$ 8	< 4,74
Coelhos	< 3,29	4229 $\pm$ 105	< 1,0	< 4,74
Cavalos*	< 3,29	6820 $\pm$ 158	118 $\pm$ 8	< 4,74

\* decomposição de massa de amostra de 1,1 g.

Com relação as amostras analisadas, cabe destacar que o Cl foi o mineral mais abundante, e também o que apresentou maior variação em relação a concentração. Isso pode estar atrelado a este elemento estar associado a processos metabólicos, hormonais e enzimáticos característicos de cada animal, nos quais a suplementação ocorre de acordo com as necessidades fisiológicas de cada faixa etária e/ou finalidade de cada animal. Quanto ao F, cabe mencionar que a baixa concentração obtida nas rações avaliadas quando comparada com o Cl, pode estar associada a um controle de qualidade mais efetivo desse analito, visto que diversas implicações podem estar associadas quando F é absorvido em elevadas concentrações.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a decomposição de amostras de ração animal empregando a MIC, associada a IC foi adequada para a determinação de Br, Cl, F e I de forma precisa e exata. Ainda cabe mencionar que além de possibilitar o uso de pequenos volumes de reagentes, atendendo a um dos princípios da química verde, com relação à baixa geração de resíduos, também enfatiza-se a possibilidade de escolher a solução mais adequada à absorção dos analitos e que seja mais compatível com a técnica de determinação.

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPERGS pelas bolsas de estudo e apoio financeiro na execução do projeto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRIZEL, M. G; HARTWIG, C. A.; NOVO, D. L. R. TORALLES, I. G.; SCHMIDT, L.; MULLER, E. I. e MESKO, M. F. A new method for chlorine determination in commercial pet food after decomposition by microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v.7, p.4315-4320, 2015.
- FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v.76, p.3526-3529, 2004.
- FLORES, E. M. M., **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**, Elsevier, Oxford, 2014, 1v.
- LOPEZ-RUIZ, B. Review Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 607–627, 2000.
- MCDOWELL, R.L. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992, 1v.
- NÓBREGA, J.A.; SANTOS, M.C.; SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B**, v.61, p.465-495, 2006.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. New York: CABI Publishing, 1999, 3v.
- WORWITZ, W.; LATIMER, G. W. **Official Methods of Analysis of AOAC International** Gaithersburg: AOAC International, 2011, 18v.