

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE HALOGENÍOS E ENXOFRE EM RAÇÃO PARA PEQUENOS ANIMAIS

GILBERTO DA SILVA COELHO JUNIOR; JULIA EISENHARDT DE MELLO;  
DIOGO LA ROSA NOVO; NATÁLIA JORGE BIELEMANN; CAMILA OLIVEIRA  
PACHECO; MÁRCIA FOSTER MESKO

*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas*  
*gilbertocoelhojunior@hotmail.com; marciamesko@yahoo.com.br*

### 1. INTRODUÇÃO

A saúde dos animais de estimação, assim como a dos seres humanos, está diretamente relacionada à qualidade dos alimentos, principalmente, no que diz respeito às quantidades de micro e macronutrientes ingeridos. Dentre os nutrientes presentes em rações para animais, os halogênios (Br, Cl, F e I) e o enxofre (S), apresentam diversas funções essenciais ao bom funcionamento do organismo dos animais como, por exemplo, na reprodução, no crescimento, no equilíbrio osmótico e iônico, dentre outros (MCDOWELL, 1992; THOMPSON, 2008). Contudo, a ingestão de rações com concentrações inadequadas ou que contenham certas espécies desses elementos, podem ocasionar uma série de complicações para a saúde dos animais. Segundo a *Agency for Toxic Substances & Disease Registry*, algumas espécies de Br e F afetam os rins, fígado e o sistema nervoso central dos animais (ATSDR, 2003; ATSDR, 2005). Por outro lado, algumas associações como, a *Association of American Feed Control Officials* estipulam limites para alguns nutrientes em rações para animais de estimação e, dentre eles, estão o Cl e o I. Isso está relacionado ao Cl ser um importante elemento para o controle do balanço catiônico e aniônico no organismo, e o I ser essencial para um bom funcionamento da glândula tireoide (AAFCO, 2014). No que diz respeito ao monitoramento da concentração de S, é importante mencionar que este elemento faz parte de algumas proteínas adicionadas nas rações (MCDOWELL, 1992).

Dessa forma, tendo em vista o crescimento no setor de alimentos voltados para animais de estimação, bem como dos problemas causados pelo consumo inadequado de halogênios e S, é de extrema importância o controle das concentrações destes elementos em rações. Entretanto, para que isso seja possível, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que forneçam resultados com precisão e exatidão adequados, além de serem viáveis para a utilização em análises de rotina. Nesse sentido, é válido destacar que existem instituições como a *AOAC International*, que recomenda métodos oficiais para a determinação de alguns elementos em ração animal, como o Cl, F e I. Contudo, os métodos oficiais apresentam algumas desvantagens, como a necessidade de utilização de elevadas quantidades de reagentes concentrados, elevadas massas de amostra e o fato de envolverem diversas etapas (WORWITZ; LATIMER, 2011). Além disso, vale mencionar que não existem métodos oficiais para a determinação de Br e S em ração animal.

Diante disso, o método baseado na combustão iniciada por micro-ondas (MIC, do inglês *Microwave-induced Combustion*) pode ser uma alternativa para a decomposição de amostras de ração, especialmente, devido à sua eficiência em decompor amostras que apresentem considerável teor de gordura (TORALLES et al., 2017). Este método de preparo de amostra apresenta diversas vantagens como a obtenção de soluções digeridas compatíveis com diferentes técnicas de determinação, uma vez que os digeridos obtidos geralmente apresentam baixos valores de carbono residual. Ainda, permite a escolha da solução absorvedora,

existindo a possibilidade da utilização de água ou soluções diluídas para absorção dos analitos, além de apresentar elevada frequência de análise (TORALLES et al., 2017). No que se refere às técnicas analíticas disponíveis para a determinação de halogênios e S, a cromatografia iônica (IC, do inglês *Ion Chromatography*) apresenta uma série de vantagens como, por exemplo, a capacidade de determinação multielementar, sensibilidade, elevada frequência de análise, pequenos volumes de solução e, principalmente, menores custos quando comparada às técnicas de espectrometria atômica. Esses diversos fatores, quando associado a um preparo de amostra adequado, tornam a IC uma técnica de determinação bastante promissora para a análise de rotina.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo propor um método para a determinação de Br, Cl, F, I e S em rações destinadas à alimentação de animais de estimação utilizando a MIC associada a IC. Para isso, diversos parâmetros foram otimizados como, a massa de amostra e a solução mais adequada para absorção dos analitos. Posteriormente, o método foi aplicado para oito rações de diferentes fabricantes destinadas a animais de estimação.

## 2. METODOLOGIA

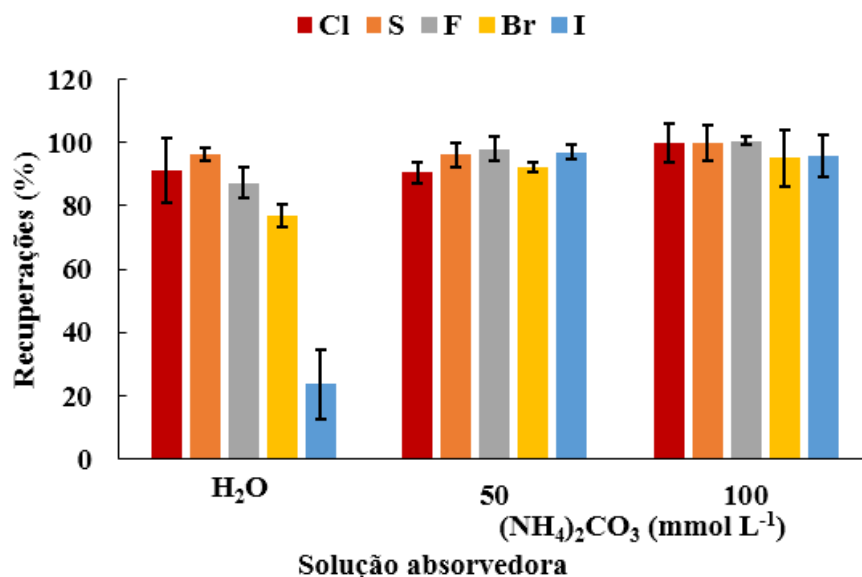
Neste trabalho foram utilizadas amostras de rações destinadas a alimentação de cães, produzidas no Brasil e nos Estados Unidos. Inicialmente, um total de 8 amostras foram moídas em moinho de facas (226/5, Lucadema Científica), secas em estufa (400/2ND, DeLeo) a 60 °C por 6 h e, posteriormente armazenadas e nomeadas de A1 a A8. A amostra que continha maior teor de extrato etéreo (A8) foi selecionada para as avaliações iniciais.

Para a decomposição das amostras por MIC, filmes de polietileno foram utilizados para envolver as amostras (200 a 700 mg) na forma de invólucros. A seguir, esses invólucros contendo as amostras foram inseridos na base de suportes de quartzo contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 µL de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, os suportes com os invólucros, foram colocados no interior de frascos de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora [ $\text{H}_2\text{O}$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 e 100 mmol L<sup>-1</sup>]. A partir disso, os frascos foram fechados, introduzidos em um rotor e pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$ . Em seguida, o rotor foi inserido em um forno micro-ondas (Multiwave 3000, Anton Paar, Áustria) e submetido a um programa de aquecimento de: i) 1400 W/50 s; ii) 0 W/2 min; iii) 1400 W/5 min e iv) 0 W/20 min. Os digeridos finais foram avolumados a 25 mL e analisados em um cromatógrafo de íons (861 Advanced Compact IC, Metrohm, Suíça). A exatidão dos resultados foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, utilizando solução padrão contendo todos os analitos. Para tanto, 50 µL de uma solução padrão contendo 500 mg L<sup>-1</sup> de Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup>; 250 mg L<sup>-1</sup> de F<sup>-</sup>; 30000 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup> e 85000 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{SO}_4^{2-}$  foram adicionados sobre a amostra previamente a sua decomposição.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi avaliada a massa máxima de amostra que poderia ser decomposta por MIC e, para isso, foram avaliadas a decomposição de massas de 200 a 700 mg. Foi possível observar que a massa máxima de ração possível de ser decomposta por MIC foi de 500 mg. Cabe destacar que foi escolhida para esta avaliação a ração com maior teor de extrato etéreo (140 g kg<sup>-1</sup>), tendo em vista a maior dificuldade para a sua decomposição. A escolha desta amostra teve como objetivo proporcionar o desenvolvimento de um método robusto, passível de decompor as demais amostras utilizadas neste estudo.

Após a otimização da massa de amostra, foram avaliadas as soluções mais adequadas para absorver os analitos. Como pode ser observado na Figura 1, recuperações satisfatórias para os analitos foram obtidas apenas quando soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 e 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foram utilizadas, as quais variaram de 90 a 98% e de 95 a 100% para cada solução, respectivamente. Os desvios padrão relativos (RSDs) se mostraram inferiores a 4% para a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{L}^{-1}$  e, inferiores a 9% para a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  100 mmol  $\text{L}^{-1}$  para todos os analitos.



**Figura 1.** Recuperações para Br, Cl, F, I e S por IC em razão para animais de estimação decompostas por MIC, utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 e 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  como soluções absorvedoras (massa 500 mg,  $n=3$ ).

O pH das soluções absorvedoras também foi um parâmetro avaliado tendo em vista que este fator pode influenciar na estabilidade dos analitos em solução. O pH das soluções absorvedoras avaliadas variou de 2,9 a 6,9. O menor valor obtido foi quando  $\text{H}_2\text{O}$  (2,9) foi utilizada, enquanto que para as soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 e 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ , o pH foi entre 6,7 e 6,9. Desta forma, considerando que em pH baixo os halogênios apresentam instabilidade em solução, devido ao meio ácido favorecer a formação de espécies voláteis (KNAPP et al., 1998), as soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 e 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foram consideradas adequadas para absorção dos analitos. Levando em consideração as recuperações adequadas para todos os analitos, bem como os adequados valores de pH que garantem a estabilidade dos analitos, a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi selecionada como a solução absorvedora para o método proposto.

Após a escolha das melhores condições avaliadas, o método foi aplicado para as demais amostras. Como apresentado na Tabela 1, foi possível observar variações para as concentrações Cl, I e S para as diferentes rações avaliadas neste estudo. Possivelmente esta variação esteja relacionada aos tipos de ração, as quais são destinadas a cães com diferentes dietas e faixas etárias. As maiores concentrações obtidas foram para Cl e S, possivelmente por estes elementos serem um dos mais adicionados nas rações, devido a sua importância para a dieta dos animais. Além disso, cabe salientar que embora os LDs tenham sido inferiores ou comparáveis aos obtidos pelos métodos oficiais para este tipo de amostra (Br: 30 mg  $\text{kg}^{-1}$ , Cl: 223 mg  $\text{kg}^{-1}$ , F: 21 mg  $\text{kg}^{-1}$ , I: 7 mg  $\text{kg}^{-1}$  e S: 11 mg  $\text{kg}^{-1}$ ), não foi possível determinar Br e F nas rações analisadas.

**Tabela 1.** Concentrações de Br, Cl, F, I e S em ração para animais de estimação utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  100 mmol L<sup>-1</sup> como solução absorvedora e 500 mg como massa de amostra (mg kg<sup>-1</sup> ± desvio padrão; n=3).

Amostra	Br	Cl	F	I	S
A1	< LD	6693 ± 578	< LD	15,6 ± 1,5	3673 ± 209
A2	< LD	3909 ± 216	< LD	< LD	2419 ± 119
A3	< LD	3794 ± 21	< LD	< LD	2336 ± 115
A4	< LD	5401 ± 84	< LD	< LD	2673 ± 4
A5	< LD	5605 ± 534	< LD	< LD	2115 ± 155
A6	< LD	4449 ± 280	< LD	12,2 ± 1,2	1999 ± 84
A7	< LD	2271 ± 222	< LD	10,0 ± 0,3	4912 ± 253
A8	< LD	6425 ± 318	< LD	7,8 ± 0,1	3765 ± 174

LD: Limite de detecção

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, foi possível concluir que o método de preparo de amostra desenvolvido utilizando a MIC, mostrou-se adequado para posterior determinação de Br, Cl, F, I e S em ração para animais de estimação, tendo em vista que apresentou adequadas recuperações para todos os analitos. Além disso, com a MIC foi possível o uso de soluções diluídas para a absorção dos analitos, minimizando a geração de resíduos e permitindo a obtenção de digeridos adequados para ser analisados por IC.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO. **AAFCO Methods For Substantiating Nutritional Adequacy Of Dog And Cat Foods**. 2014. Association of American Feed Control Officials. Acessado em 17 ago. 2017. Online. Disponível em: <http://www.aafco.org>

ATSDR. **Toxicological Profile for Bromoform and Dibromochloromethane**, Atlanta, Ago. 2005. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Acessado em 17 ago. 2017. Online. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov>

ATSDR. **Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride and Fluorine**, Atlanta, Set. 2003. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Acessado em 17 ago. 2017. Online. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov>

KNAPP, G.; MAICHIN, B.; FECHER, P.; HASSE, S.; SCHRAMEL, P. Iodine determination in biological materials - options for sample preparation and final determination. **Fres. Jour. of Anal. Chem.**, Heidelberg, v.362, p.508-513, 1998.

MCDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992.

THOMPSON, A. Ingredients: where pet food starts. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v.23, n.3, p.127-132, 2008.

TORALLES, I. G.; COELHO JUNIOR, G. S.; COSTA, V. C.; CRUZ, S. M.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. A fast and feasible method for Br and I determination in whole egg powder and its fractions by ICP-MS. **Food Chemistry**, v.221, p.877-883, 2017.

WORWITZ, W.; LATIMER, G.W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2011.