

## Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida

The spectrophotometric method on the routine of 1,5-diphenylcarbazine was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide

Hermann Bremer Neto<sup>1</sup> Celso Augusto Fessel Graner<sup>2</sup> Luiz Edivaldo Pezzato<sup>3</sup>  
Carlos Roberto Padovani<sup>4</sup>

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi ajustar o método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida à determinação do cromo em fezes, como marcador biológico, adequando-o à rotina laboratorial. Fatores que poderiam exercer interferência na transformação do cromo (III) à cromo (VI) foram testados, como a recuperação do metal, quantidade de amostra, quantidade e ordem de emprego dos ácidos oxidantes da digestão úmida, temperatura e tempo de digestão e perda por volatilização do cromo como cloreto de cromila, porém não se determinou estatisticamente interferência destes fatores. No método ajustado, a amostra é digerida pela clássica mistura ácida nítrica/perclórica, levando a oxidação do cromo (III) a cromo (VI), e alíquota do extrato diluído é usado para reação com 1,5-difenilcarbazida; as absorbâncias são medidas a 550nm, utilizando-se de cubetas de um centímetro de caminho óptico, contra prova em branco conduzida simultaneamente. Dicromato de potássio foi empregado como substância de referência para obtenção da curva padrão na faixa de 0,25 - 2,5mg mL<sup>-1</sup> de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1mg Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ° 1,9355mg K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

**Palavras-chave:** cromo; marcador biológico; determinação espectrofotométrica; fezes.

### ABSTRACT

This work aims at adjusting the spectrophotometric method of 1,5-diphenylcarbazine for the determination of chromium in feces, as a biological marker. Factors that could interfere with the transformation of chromium (III)

into chromium (VI) were tested, as the metal recovery, the sample amount, the amount and the order of use of the oxidant acids of the wet digestion, digestion temperature and digestion time, loss of chromium by volatilization as chromyl chlorid. However the interference of these factors were not statistically determined. In the adjusted method, the sample is classically digested by nitric/perchloric acid mixture leading to the oxidation of chromium (III) to chromium (VI), and an aliquot of the diluted extract is used for reaction with 1,5-diphenylcarbazine; absorbance was measured at 550nm, using 1cm path length optical cuvettes. Potassium dichromate was used as a standard substance to obtain the standard curve ranging from 0.25mg mL<sup>-1</sup> to 2.5mg.mL<sup>-1</sup> of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1mg Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ° 1.9355mg K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

**Key words:** chromium (III) oxide; biological marker; spectrophotometric determination; feces.

### INTRODUÇÃO

Pela sua inércia química em sistemas digestórios, o óxido de cromo (III), Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, vem sendo usado há muito tempo como marcador biológico externo em estudos de nutrição e é misturado nas dietas, para posterior coleta das fezes e dosagem do conteúdo do metal (BREMER NETO, 2003). Devido exatamente à estabilidade do cromo (III), acrescida da

<sup>1</sup>Aluno do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, SP. Professor do Departamento de Biofísica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) Presidente Prudente – SP, Brasil. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. E-mail: hermann@unoeste.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências (IB), UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioestatística, IB, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

inércia do óxido, as fases de solubilização e oxidação do crômio têm sido destacadas como as mais importantes para a sua dosagem, principalmente em materiais biológicos, pela exigência da destruição do componente orgânico e concomitante passagem do crômio (III) a crômio (VI) (FURUKAWA & TSUKAHARA, 1966; MERTZ & ROGINSKY, 1971; KOTB & LUCKEY, 1972). Nessa fase, fatores como a) quantidade de amostra em relação à qualidade, à quantidade e à ordem de emprego dos ácidos oxidantes da digestão úmida; b) a temperatura e o tempo dessa digestão face à presença de cloreto na amostra e a possibilidade de perda por volatilização do crômio como cloreto de cromila; c) o uso de sistemas de refluxo, assim como de oxidantes auxiliares e a redução de seus excessos; d) o equipamento digestor, com ou sem controle da temperatura, podem exercer influência marcante na transformação e recuperação do metal como crômio (VI) (LYNN & MASON, 1952; GORSUCH, 1962, 1970; GRANER, 1972)

Após a digestão da amostra, a medida final tem sido feita comumente por espectrofotometria do sistema cromato/ dicromato ou por espectrometria com absorção atômica com chama redutora (SILVA, 1990). Estranhamente, porém, o método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida não aparece como opção na determinação do crômio, quando usado como marcador biológico. Nesse método, a 1,5-difenilcarbazida reage com crômio (VI) em meio ácido, produzindo um composto vermelho/violeta com absorvidade molar de  $3,14 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (com respeito ao crômio), com sensibilidade ao crômio de  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ : essa absorvidade caracteriza-o como cerca de cinquenta vezes mais sensível que o método do sistema cromato/ dicromato (sensibilidade ao crômio de  $0,247 \text{ mg L}^{-1}$ ), e cerca de dez vezes mais sensível que o método de absorção atômica (sensibilidade ao crômio de  $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ ). Como a medida final no método do Cr (VI) / 1,5-difenilcarbazida dá-se a 550nm, pode-se usar um simples colorímetro provido de filtro dessa região do espectro eletromagnético para as medidas de absorbância, dispensando a necessidade de espectrofotômetro, como no caso do método do cromato/dicromato e do equipamento de absorção atômica (AYRES, 1949; GRANER, 1972).

Em virtude do exposto, o trabalho teve por objetivo ajustar o método colorimétrico da 1,5-difenilcarbazida de determinação do crômio e torná-lo adequado à determinação deste elemento em fezes, na forma de óxido de crômio (III), como marcador biológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Preparo de soluções.

Solução de estoque de dicromato de potássio, contendo o equivalente a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de óxido de crômio (III). Preparada pela dissolução de 0,9678g de dicromato de potássio (Merck) em água e o volume completado a 1000mL e acidulada com cerca de 3mL de ácido nítrico concentrado (Merck). Para o preparo da solução de uso de dicromato de potássio, contendo o equivalente a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de óxido de crômio (III), diluiu-se cinquenta vezes a solução estoque de dicromato de potássio. Preparou-se para o dia de uso.

Solução estoque de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  1,5-difenilcarbazida. Foi preparada pela dissolução de 0,25g de 1,5-difenilcarbazida (Aldrich) em 100mL de acetona (Merck). Para o preparo da solução de uso de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  1,5-difenilcarbazida, diluiu-se cinco vezes a solução estoque com água destilada.

Preparo de amostras de referência contendo  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .

Em gral de porcelana, trituraram-se até perfeita homogeneização, 0,5021g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (Aldrich) com 19,4979g de material diluente (dieta ou fezes sem marcador). De acordo com a necessidade de diluição, estas foram preparadas a partir das amostras contendo  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .

Construção das curvas de referência (ou padrão) de óxido de crômio (III).

Foram construídas curvas de referência de óxido de crômio (III) que, na solução colorida final, abrangeram faixa de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , e para isto, empregaram-se massas de amostras de referência de 100mg (contendo desde  $250 \text{ mg g}^{-1}$  até  $2.500 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e fezes não marcadas como prova em branco), que foram digeridas em balões de Kjeldahl de 50mL com a mistura nítrica/perclórica (3mL e 2mL, respectivamente, dos ácidos concentrados). Os extratos ácidos finais foram diluídos com água destilada até a marca de 50mL, e homogeneizados por agitação manual.

Alíquotas de 5mL dos extratos ácidos diluídos foram misturados com igual volume da solução diluída de 1,5-difenilcarbazida e homogeneizados e lidas a 550nm em espectrocolorímetro, contra as respectivas provas em branco. Os resultados obtidos (assim como aqueles oriundos de soluções de referência de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , para comparações) encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados para cromo (III) das formas solúvel, KCr (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, e insolúvel, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (dispersa em amido, dieta e fezes), quando oxidadas a cromo (VI) na digestão nítrica/perclórica: comparações entre si e com dicromato de potássio como referencial.

| Concentração de Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , em µg.mL <sup>-1</sup> * | Cromo (VI)                                     |                                     |                                       | Cromo (III)                           |                                       |
|---|--|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|   | K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>  | KCr (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /amido | Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /dieta | Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /fezes |
|   | Absorbância** ± st/n <sup>1/2</sup> (α = 0,05) |                                     |                                       |                                       |                                       |
| 0,50  | 0,238 ± 0,003                                  | 0,239 ± 0,004                       | 0,239 ± 0,005                         | 0,238 ± 0,004                         | 0,239 ± 0,003                         |
| 1,00  | 0,480 ± 0,002                                  | 0,477 ± 0,009                       | 0,479 ± 0,004                         | 0,477 ± 0,009                         | 0,479 ± 0,002                         |
| 1,50  | 0,732 ± 0,007                                  | 0,731 ± 0,019                       | 0,728 ± 0,005                         | 0,728 ± 0,005                         | 0,727 ± 0,008                         |
| 2,00  | 0,994 ± 0,007                                  | 0,993 ± 0,014                       | 0,993 ± 0,007                         | 0,993 ± 0,017                         | 0,989 ± 0,022                         |

\*Nas soluções coloridas finais; \*\*médias de três repetições, nas soluções coloridas finais.

Influências da natureza do cromo (III), e do tamanho da massa da amostra nos processos de digestão e de oxidação do íon a cromo (VI).

O método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida de determinação do cromo exige o íon na forma hexavalente, para reação em meio ácido e formação do composto vermelho/violeta de máxima absorção a 550nm, estável ao menos por uma hora (WILLIAMS, 1979).

Conseguiram-se a oxidação do cromo (III) solúvel [das soluções de referência de sulfato (duplo) de potássio e cromo (III)], a decomposição do material orgânico (amido, dietas e fezes) contendo o marcador na forma de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, assim como a solubilização e oxidação do cromo (III) a cromo (VI), digerindo-se amostras de até 500mg com a mistura de 3mL e 2mL, respectivamente, de ácidos nítrico e perclórico, colocados nessa ordem. O extrato ácido final foi diluído a 50mL com água destilada e homogeneizado. Alíquota de 5mL do extrato ácido diluído foi misturada com igual volume da solução de uso de 1,5-difenilcarbazida e lida após cinco minutos em cubetas com 1cm de caminho óptico, a 550nm contra prova em branco levada simultaneamente [água destilada ou diluente (amido ou fezes), isento do marcador, submetidos ao mesmo tratamento das amostras marcadas]. Os resultados encontram-se nas tabelas 1 e 2, que incluem também aqueles obtidos com as soluções aferida de cromo (III) solúvel [do sulfato (duplo) de potássio e cromo (III)], e de dicromato de potássio (substância de referência), para comparações.

Influência do íon cloreto na oxidação e recuperação do marcador contido nas amostras.

Considerando-se que o íon cloreto é um componente comum dos complexos minerais adicionados às rações, conduziu-se um ensaio para testar a influência desse ânion, pela introdução de até

5% de cloreto de sódio em amostras de fezes (ovinas) marcadas com Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Os resultados obtidos (e também aqueles originados pelo dicromato de potássio como referencial de comparação) encontram-se na tabela 3.

Curvas de referência (ou padrão) de óxido de cromo (III), a partir de massas crescentes de amostras, e teores decrescentes respectivos do marcador.

Foram construídas curvas de referência de óxido de cromo (III) que abrangeram sempre a faixa de 0,25mg mL<sup>-1</sup> a 2,5mg mL<sup>-1</sup> de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, na solução colorida final. Para tanto, empregaram-se massas de amostras de referência (em fezes de peixe como diluente

Tabela 2 - Influência da massa de amostras padrões de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (fezes como diluente) na recuperação do marcador: comparações também com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> como referencial.

| Concentração de Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>µg mL <sup>-1</sup> * | Massa de amostra<br>(mg) |   | Absorbância   |
|---|--------------------------|---|---------------|
|   | µg g <sup>-1</sup> **    |   |               |
| 0,50  | 400                      |   | 0,240 ± 0,002 |
| 1,00  | 800                      | 125   | 0,480 ± 0,002 |
| 1,50  | 1200                     |   | 0,730 ± 0,006 |
| 2,00  | 1600                     |   | 0,987 ± 0,021 |
| 0,50  | 200                      |   | 0,240 ± 0,000 |
| 1,00  | 400                      | 250   | 0,478 ± 0,005 |
| 1,50  | 600                      |   | 0,728 ± 0,005 |
| 2,00  | 800                      |   | 0,986 ± 0,022 |
| 0,50  | 100                      |   | 0,239 ± 0,004 |
| 1,00  | 200                      | 500   | 0,479 ± 0,002 |
| 1,50  | 300                      |   | 0,730 ± 0,013 |
| 2,00  | 400                      |   | 0,990 ± 0,006 |
| 0,50  | -                        |   | 0,238 ± 0,003 |
| 1,00  | -                        |   | 0,480 ± 0,002 |
| 1,50  | -                        | K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | 0,732 ± 0,007 |
| 2,00  | -                        |   | 0,994 ± 0,007 |

\*Na solução colorida final; \*\*na amostra de referência.

Tabela 3 - Influência do íon cloreto na recuperação do cromo (III) de amostras de referência de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  em fezes.

| Concentração de $\text{Cr}_2\text{O}_3$ |                         | Cloreto em fezes, como % de NaCl |               |               |               | $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ |
|---|-------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------|
|   |                         | Natural                          | 1,25          | 2,50          | 5,00          |                                   |
| $\mu\text{g mL}^{-1}$ *                 | $\mu\text{g g}^{-1}$ ** | Absorbância                      |               |               |               |                                   |
| 0,50                                    | 200                     | 0,240 ± 0,002                    | 0,241 ± 0,002 | 0,240 ± 0,004 | 0,239 ± 0,005 | 0,238 ± 0,003                     |
| 1,00                                    | 400                     | 0,479 ± 0,004                    | 0,478 ± 0,005 | 0,480 ± 0,477 | 0,477 ± 0,008 | 0,480 ± 0,002                     |
| 1,50                                    | 600                     | 0,730 ± 0,006                    | 0,730 ± 0,006 | 0,731 ± 0,010 | 0,727 ± 0,008 | 0,732 ± 0,007                     |
| 2,00                                    | 800                     | 0,986 ± 0,015                    | 0,988 ± 0,011 | 0,989 ± 0,017 | 0,990 ± 0,006 | 0,994 ± 0,007                     |

\*Na solução colorida final; \*\*na amostra de referência.

do marcador) de: a) 100mg, contendo desde 250mg  $\text{g}^{-1}$  até 2 500mg  $\text{g}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ; b) 200mg, contendo desde 125mg  $\text{g}^{-1}$  até 1.250mg  $\text{g}^{-1}$  do marcador; c) 400mg, contendo desde 62,5mg  $\text{g}^{-1}$  até 625mg  $\text{g}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Todas as amostras (acrescidas de fezes não marcadas como prova em branco) foram tratadas até a colorimetria final como já descrito anteriormente. Os resultados obtidos, assim com outros oriundos de soluções de referência de dicromato de potássio (para comparações), encontram-se na tabela 4.

Determinação de óxido de cromo (III) em fezes marcadas pelo método proposto, e pelos métodos do sistema cromato/dicromato e de chama de absorção.

Para comparação de resultados, efetuaram-se dosagens em fezes, arraçoados com dietas marcadas com  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Após a digestão nítrica/perclórica das amostras, alíquotas do extrato ácido final (diluído a 50mL com água destilada) foram utilizadas para as determinações pelos métodos espectrofotométricos da 1,5-difenilcarbazida e do sistema cromato/dicromato [meio alcalino com  $\text{pH} \cong 9,1 = 365\text{nm}$ , curva de referência entre  $10\text{mg.mL}^{-1}$  e  $100\text{mg.mL}^{-1}$  (0,001% e 0,01%) em equivalente de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  na solução colorida final (ANALAR, 1967)], e espectroscópico de absorção atômica [ $\lambda = 357,9\text{nm}$ , curva de referência entre  $3\text{mg mL}^{-1}$  e  $15\text{mg mL}^{-1}$  (0,0003 e 0,0015%) em equivalente de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  na solução final, com chama levemente redutora (SILVA, 1990)]. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.

Análise estatística dos resultados experimentais.

Optou-se por experimentos montados para medidas finais em regiões da escala de leituras dos espectrofotômetros, acima e abaixo da transmitância de erro fotométrico absoluto mínimo [ $T = 36,8\%$ , ou  $A = 0,4343$  (RINGBON, 1939)]. Os ensaios preliminares caracterizaram os dados a serem confirmados como regressões lineares simples,

envolvendo concentração de cromo (expressa em concentração equivalente de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) de um lado, como variável independente, e absorbância de outro, como variável dependente. Assim, as regressões relativas ao estudo de determinado fator, eventualmente influenciando os resultados, foram analisadas por técnica descrita em OSTLE & MENSING (1975) de análise da variância para comparação de várias regressões, na qual se testam as hipóteses de coincidência, ou não, dos coeficientes angular e linear das regressões ajustadas pelo método dos mínimos quadrados.

Procedimento para determinações de cromo, como marcador biológico, em amostras reais pelo método ajustado da 1,5-difenilcarbazida.

Para determinar a concentração do óxido de cromo (III) nas rações e fezes, transferiu-se massa de amostra marcada (dietas ou fezes) entre 0,1g e 0,5g (tomada com precisão de 0,1mg) para balões de Kjeldahl de 50mL (com traço de marcação desse

Tabela 4 - Curva padrão ou de referência de óxido de cromo (III), com massa de amostras tendo fezes como diluente do marcador. Comparação com dicromato de potássio, substância de referência, através da absorbância pelo método colorimétrico da 1,5- difenilcarbazida.

| Concentração de $\text{Cr}_2\text{O}_3$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ * | Amostra de 0,1g                                 |               | $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ |
|---|---|---------------|-----------------------------------|
|   | $\mu\text{g g}^{-1}$ de $\text{Cr}_2\text{O}_3$ | A**           |                                   |
| 0,250   | 250   | 0,119 ± 0,014 | 0,121 ± 0,009                     |
| 0,500   | 500   | 0,240 ± 0,004 | 0,238 ± 0,003                     |
| 1,00  | 1000  | 0,479 ± 0,001 | 0,480 ± 0,002                     |
| 1,50  | 1500  | 0,730 ± 0,007 | 0,732 ± 0,007                     |
| 2,00  | 2000  | 0,993 ± 0,006 | 0,994 ± 0,007                     |
| 2,50  | 2500  | 1,229 ± 0,004 | 1,229 ± 0,003                     |

\*Na solução colorida final; \*\*médias de três repetições, como intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

volume), nos quais foram adicionados 3mL e 2mL, respectivamente e nessa ordem, de ácidos nítrico e perclórico, ambos com grau analítico (Merck). Aqueceu-se em sistema digestor sem controle de temperatura, em função da permanência da mistura líquida dos ácidos oxidantes até o final do processo, em capela de exaustão de gases até completa destruição do material orgânico e oxidação do cromo (III) a cromo (VI), conferindo ao extrato ácido coloração alaranjada. Simultaneamente, conduziram-se amostras de ração e de fezes não marcadas (de prova em branco), para ajuste do espectrocolorímetro. Deixou-se esfriar, completou-se o volume até a marca de 50mL com água recém destilada e homogeneizou-se o extrato ácido diluído (eventualmente, houve necessidade de diluição do extrato ácido maior que 50mL). Transferiu-se alíquota entre 1 e 5mL do extrato ácido diluído para copo de polietileno e completou-se o volume a 5mL (quando necessário) com água destilada. Adicionou-se alíquota de 5mL da solução de uso de  $2\text{mmol L}^{-1}$  de 1,5-difenilcarbazida, homogeneizou-se, e aguardou-se 5 minutos para leituras a 550nm (em espectrofotômetro ou em espectrocolorímetro) em cubetas de 1cm de caminho óptico, contra prova em branco.

Para o preparo da curva padrão ou de referência, feita para abranger a faixa de  $0,250\text{mg mL}^{-1}$  a  $2,500\text{mg mL}^{-1}$  de cromo (solução de referência de dicromato de potássio), amplitude onde ocorre o menor erro relativo de concentração (RINGBON, 1939; GRANER, 1972), a solução de referência contendo o equivalente a  $500\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  foi diluída. Os pontos dessa curva padrão sofreram o mesmo tratamento de digestão nítrica/perclórica, para que suas condições de ácidos e acidez se aproximassem às das amostras. A equação de regressão linear inerente a essa curva padrão, permitiu a caracterização do cromo nas amostras lidas no equipamento a partir de alíquotas do extrato ácido diluído.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da extrema estabilidade do óxido de cromo (III), demonstrou-se que, nas fezes, o metal é fácil e completamente oxidado a cromo (VI) por uma digestão nítrica/perclórica convencional (SCHULDINER & CLARDY, 1946; URONE & ANDERS, 1950), porém resultados similares não foram obtidos em trabalhos dessa natureza por SALTZMAN (1952) e SANDELL (1959). Os resultados da tabela 1 permitem ainda a inferência de que o diluente (amido, dieta ou fezes) das amostras de referência de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  não interferem na recuperação do marcador.

Constando-se que a absorvância das soluções da espécie química formada em meio ácido pela reação entre cromo (VI) e 1,5-difenilcarbazida independe das matrizes utilizadas neste estudo e do número de oxidação do metal, nada impede que, pela facilidade, construamos curvas de referência ou padrão usando o dicromato de potássio para esse fim.

Os resultados da tabela 2 confirmam esses fatos, agora envolvendo variação na massa das amostras de fezes, com variação inversa no teor do marcador. Também, neste caso, não houve diferença estatística significativa entre os mesmos, devido à variação da massa de amostra entre 125mg e 500mg, mantendo-se constantes as quantidades de ácidos oxidantes nítrico e perclórico (3mL e 2mL, respectivamente). Não existe a necessidade de preocupar-se com a temperatura do sistema digestor: a mesma mantém-se em níveis adequados para o processo de destruição do material orgânico e para a oxidação do cromo (III) a cromo (VI), em função da permanência da mistura líquida dos ácidos oxidantes até o final do processo (DELANEY, 1953; LANGE, 1967).

Mesmo com a adição às fezes de cloreto de sódio num nível tão alto quanto 5% nas amostras de referência de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  em fezes, os resultados obtidos não confirmaram perda de cromo por volatilização como cloreto de cromila, no processo de digestão, fato freqüentemente referido na literatura por URONE & ANDERS (1950), LYNN & MASON (1952) e GORSUCH (1962, 1970) (Tabela 3).

Na tabela 4, os resultados do ensaio sobre a influência do tamanho da amostra, no caso de necessitar-se aumentá-la para compensar uma baixa concentração do marcador, quando comparados estatisticamente, não se constataram diferenças significativas entre os mesmos, portanto, os 36 pares de dados envolvidos podem ser considerados como pertencentes a uma única regressão linear que, ajustada, fornece:

$$A = -0,00921 + 0,4964 C \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

$$\text{ou, } C \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = 2,015 (A + 0,009) \quad (2)$$

com estimativa do coeficiente de determinação igual a 0,9999.

Evidentemente, a expressão 2 pode ser transformada para fornecer diretamente a concentração do marcador nas amostras sob análise, levando-se em conta: a) os 10mL da solução colorida final; b) a massa de amostra digerida ( $m_a$ , em gramas); c) o volume final de diluição do extrato ácido (V, em mililitros) e, d) a alíquota utilizada do extrato ácido diluído (v, em mililitros):

$C$  (%) de  $Cr_2O_3 = 2,015 \cdot 10^{-3} (A + 0,009) (V/v.m_a)$  (3) ou,  $C$  ( $mg \cdot kg^{-1}$ ) de  $Cr_2O_3 = 20,15 (A + 0,009) (V/v.m_a)$  (4)

Na tabela 5, estão os resultados da determinação do marcador em fezes através do método ora ajustado da 1,5-difenilcarbazida, do método do sistema cromato/dicromato e de espectrometria de absorção atômica com chama e não se registraram diferenças estatísticas entre os mesmos.

Conseqüentemente, o método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida de determinação do cromo, na sua dosagem em fezes e, quando empregado como marcador biológico na forma de óxido de cromo (III), é tão exato quanto os de absorção atômica e do sistema cromato/dicromato. Além desta exatidão, o método ajustado da 1,5-difenilcarbazida mostrou-se mais preciso que os demais, tendo em vista os menores desvios padrões que sua coleção de dados de absorbância revelou em relação aos outros métodos.

## CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos na determinação do óxido de cromo (III), como marcador biológico, pelos métodos espectrofotométricos do sistema cromato/dicromato e absorção atômica para comparações, pode-se concluir que o método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida revelou-se uma alternativa simples, robusta, precisa e exata, conseqüentemente, adequado à rotina laboratorial.

Tabela 5 - Determinação do cromo em fezes pelo método colorimétrico da 1,5-difenilcarbazida: resultados comparados com aqueles da espectrofotometria do cromato/dicromato e da espectrometria de absorção atômica com chama.

| Teor de $Cr_2O_3$<br>(%) nas fezes | Teor de $Cr_2O_3$ (%) determinado |                  |                   |
|------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------|
|                                    | Métodos                           |                  |                   |
|                                    | 1,5-difenilcarbazida              | Absorção atômica | Cromato/dicromato |
| 0,01                               | 0,030 ± 0,001                     | 0,030 ± 0,000    | 0,029 ± 0,004     |
| 0,02                               | 0,060 ± 0,000                     | 0,059 ± 0,001    | 0,058 ± 0,004     |
| 0,03                               | 0,090 ± 0,001                     | 0,091 ± 0,001    | 0,090 ± 0,006     |
| 0,05                               | 0,150 ± 0,001                     | 0,149 ± 0,004    | 0,148 ± 0,005     |
| 0,1                                | 0,299 ± 0,001                     | 0,300 ± 0,004    | 0,299 ± 0,011     |
| 0,2                                | 0,599 ± 0,001                     | 0,598 ± 0,019    | 0,598 ± 0,017     |

\* Médias de três repetições, como intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANALAR. "ANALAR" Standards for laboratory chemicals. 6.ed. London : ANALAR Standars, 1967. 633p.

AYRES, G.H. Evaluation of accuracy in photometric analysis. *Analytical Chemistry*, v.21, p.652-657, 1949.

BREMER NETO, H. et al. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p.249-255, 2003.

DELANEY, J.E. Chromium – Toxic behavior and colorimetric determination. *Sanitalk*, v.1, p.9-13, 1953.

FURUKAWA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v.32, p.502-506, 1966.

GORSUCH, T.T. Losses of trace elements during oxidation of organic materials. The formation of volatile chlorides during the dry ashing in presence of organic chlorides. *Analyst*, v.87, p.112-115, 1962.

GORSUCH, T.T. *The destruction of organic matter*. Oxford : Pergamon, 1970. 151p.

GRANER, C.A.F. *Determinação do cromo pelo método colorimétrico da difenilcarbazida*. 1972. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

KOTB, A.R.; LUCKEY, T.D. Markers in nutrition. *Nutrition Abstracts Reviews*, v.42, p.813-845, 1972.

LANGE, N.A. (ed.) *Handbook of chemistry*. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 1967. 2001p.

LYNN, S.; MASON, D.M. Determination of chromium by oxidation in the presence of silver nitrate. *Analytical Chemistry*, Easton, v.24, p.1.855, 1952.

MERTZ, W.; ROGINSKY, E.E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factor. In: MERTZ, W.; CORNATZER, W.E. (ed.). *Newer trace elements in nutrition*. New York : Marcell Dekker, 1971. p.123-153.

OSTLE, B.; MENSING, R.W. *Statistics in research*. 3.ed. Ames : Iowa State University, 1975. 596p.

RINGBON, A. Über die Genauigkeit der colorimetrischen Analysenmethoden. *Zeitschrift für Analytische Chemie Fresenius*, v.115, p.332-343, 1939.

SALTZMAN, B.E. Microdetermination of chromium with diphenylcarbazine by permanganate oxidation. *Analytical Chemistry*, v.24, p.1016-1020, 1952.

SANDELL, E.B. Chromium. In: \_\_\_\_\_. *Colorimetric determination of traces of metals*. 3.ed. New York : Interscience, 1959. p.388-408.

SCHULDINER, S.; CLARDY, F.B. Determination of chromium by oxidation with perchloric acid. *Ind Eng Chemistry Analyt Edn*, Easton, v.18, p.728-729, 1946.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, 1990. 166p.

URONE, P.F.; ANDERS, H.K. Determination of small amounts of chromium in human blood, tissues, and urine.

**Analytical Chemistry**, Easton, v.22, p.1317-1321, 1950.

WILLIAMS, W.J. Chromate and dichromate. In: \_\_\_\_\_: **Handbook of anion determination**. London : Butterworths, 1979. p.50-62.