



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Bremer Neto, Hermann; Fessel Graner, Celso Augusto; Pezzato, Luiz Edivaldo; Padovani, Carlos Roberto

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

Ciência Rural, vol. 35, núm. 3, maio-junho, 2005, pp. 691-697

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33135333>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

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

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

Hermann Bremer Neto¹ Celso Augusto Fessel Graner² Luiz Edivaldo Pezzato³
Carlos Roberto Padovani⁴

RESUMO

O objetivo deste estudo foi ajustar o método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida à determinação do crômio em fezes, como marcador biológico, adequando-o à rotina laboratorial. Fatores que poderiam exercer interferência na transformação do crômio (III) à crômio (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 crômio 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 crômio (III) a crômio (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⁻¹ de Cr₂O₃ (1mg Cr₂O₃ ° 1,9355mg K₂Cr₂O₇).

Palavras-chave: crômio; marcador biológico; determinação espectrofotométrica; fezes.

ABSTRACT

This work aims at adjusting the spectrophotometric method of 1,5-diphenylcarbazide 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-diphenylcarbazide; 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⁻¹ to 2.5mg.mL⁻¹ of Cr₂O₃ (1mg Cr₂O₃ ° 1,9355mg K₂Cr₂O₇).

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

INTRODUÇÃO

Pela sua inércia química em sistemas digestórios, o óxido de crômio (III), Cr₂O₃, 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 crômio (III), acrescida da

¹Aluno 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.

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

³Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Departamento 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 cinqüenta 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 mg L^{-1} de óxido de crômio (III). Preparada pela dissolução de $0,9678 \text{ g}$ de dicromato de potássio (Merck) em água e o volume completado a 1000 mL e acidulada com cerca de 3 mL de ácido nítrico concentrado (Merck). Para o preparo da solução de uso de dicromato de potássio, contendo o equivalente a 10 mg L^{-1} de óxido de crômio (III), diluiu-se cinqüenta vezes a solução estoque de dicromato de potássio. Preparou-se para o dia de uso.

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

Preparo de amostras de referência contendo 5 mg g^{-1} de Cr_2O_3 .

Em gral de porcelana, trituraram-se até perfeita homogeneização, $0,5021 \text{ g}$ de Cr_2O_3 (Aldrich) com $19,4979 \text{ g}$ de material diluente (dieta ou fezes sem marcador). De acordo com a necessidade de diluição, estas foram preparadas a partir das amostras contendo 5 mg g^{-1} de Cr_2O_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, abrangeam faixa de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ a $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ de Cr_2O_3 , e para isto, empregaram-se massas de amostras de referência de 100 mg (contendo desde 250 mg g^{-1} até $2,500 \text{ mg g}^{-1}$ de Cr_2O_3 e fezes não marcadas como prova em branco), que foram digeridas em balões de Kjeldahl de 50 mL com a mistura nítrica/perclórica (3 mL e 2 mL , respectivamente, dos ácidos concentrados). Os extratos ácidos finais foram diluídos com água destilada até a marca de 50 mL , e homogeneizados por agitação manual.

Alíquotas de 5 mL 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 crômio (VI) das formas solúvel, $KCr (SO_4)_2$, e insolúvel, Cr_2O_3 (dispersa em amido, dieta e fezes), quando oxidadas a crômio (VI) na digestão nítrica/perclórica: comparações entre si e com dicromato de potássio como referencial.

Concentração de Cr_2O_3 , em $\mu g.mL^{-1}$ *	Crômio (VI)			Crômio (III)	
	$K_2Cr_2O_7$	$KCr (SO_4)_2$	$Cr_2O_3/$ amido	$Cr_2O_3/$ dieta	$Cr_2O_3/$ fezes
	Absorbância** \pm st/n ^{1/2} ($\alpha = 0,05$)				
0,50	$0,238 \pm 0,003$	$0,239 \pm 0,004$	$0,239 \pm 0,005$	$0,238 \pm 0,004$	$0,239 \pm 0,003$
1,00	$0,480 \pm 0,002$	$0,477 \pm 0,009$	$0,479 \pm 0,004$	$0,477 \pm 0,009$	$0,479 \pm 0,002$
1,50	$0,732 \pm 0,007$	$0,731 \pm 0,019$	$0,728 \pm 0,005$	$0,728 \pm 0,005$	$0,727 \pm 0,008$
2,00	$0,994 \pm 0,007$	$0,993 \pm 0,014$	$0,993 \pm 0,007$	$0,993 \pm 0,017$	$0,989 \pm 0,022$

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

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

O método espectrofotométrico da 1,5-difenilcarbazida de determinação do crômio 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 crômio (III) solúvel [das soluções de referência de sulfato (duplo) de potássio e crômio (III)], a decomposição do material orgânico (amido, dietas e fezes) contendo o marcador na forma de Cr_2O_3 , assim como a solubilização e oxidação do crômio (III) a crômio (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 crômio (III) solúvel [do sulfato (duplo) de potássio e crômio (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_2O_3 . 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 crômio (III), a partir de massas crescentes de amostras, e teores decrescentes respectivos do marcador.

Foram construídas curvas de referência de óxido de crômio (III) que abrangiam sempre a faixa de 0,25mg mL^{-1} a 2,5mg mL^{-1} de Cr_2O_3 , 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_2O_3 (fezes como diluente) na recuperação do marcador: comparações também com $K_2Cr_2O_7$ como referencial.

Concentração de Cr_2O_3 $\mu g.mL^{-1}$ *	Massa de amostra		Absorbância
	$\mu g.g^{-1}$ ***	(mg)	
0,50	400		$0,240 \pm 0,002$
1,00	800		$0,480 \pm 0,002$
1,50	1200	125	$0,730 \pm 0,006$
2,00	1600		$0,987 \pm 0,021$
0,50	200		$0,240 \pm 0,000$
1,00	400		$0,478 \pm 0,005$
1,50	600	250	$0,728 \pm 0,005$
2,00	800		$0,986 \pm 0,022$
0,50	100		$0,239 \pm 0,004$
1,00	200		$0,479 \pm 0,002$
1,50	300	500	$0,730 \pm 0,013$
2,00	400		$0,990 \pm 0,006$
0,50	-		$0,238 \pm 0,003$
1,00	-		$0,480 \pm 0,002$
1,50	-	$K_2Cr_2O_7$	$0,732 \pm 0,007$
2,00	-		$0,994 \pm 0,007$

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

Tabela 3 - Influência do fôr cloreto na recuperação do crômio (III) de amostras de referência de Cr_2O_3 em fezes.

Concentração de Cr_2O_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 \pm 0,002	0,241 \pm 0,002	0,240 \pm 0,004	0,239 \pm 0,005
1,00	400	0,479 \pm 0,004	0,478 \pm 0,005	0,480 \pm 0,477	0,477 \pm 0,008
1,50	600	0,730 \pm 0,006	0,730 \pm 0,006	0,731 \pm 0,010	0,727 \pm 0,008
2,00	800	0,986 \pm 0,015	0,988 \pm 0,011	0,989 \pm 0,017	0,990 \pm 0,006
					0,994 \pm 0,007

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

do marcador) de: a) 100mg, contendo desde 250mg g^{-1} até 2 500mg g^{-1} de Cr_2O_3 ; b) 200mg, contendo desde 125mg g^{-1} até 1.250mg g^{-1} do marcador; c) 400mg, contendo desde 62,5mg g^{-1} até 625mg g^{-1} de Cr_2O_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 crômio (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 Cr_2O_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 $\text{pH} \equiv 9,1 = 365\text{nm}$, curva de referência entre 10mg. mL^{-1} e 100mg. mL^{-1} (0,001% e 0,01%) em equivalente de Cr_2O_3 na solução colorida final (ANALAR, 1967)], e espectroscópico de absorção atômica [$\lambda = 357,9\text{nm}$, curva de referência entre 3mg mL^{-1} e 15mg mL^{-1} (0,0003 e 0,0015%) em equivalente de Cr_2O_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 crômio (expressa em concentração equivalente de Cr_2O_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 crômio, como marcador biológico, em amostras reais pelo método ajustado da 1,5-difenilcarbazida.

Para determinar a concentração do óxido de crômio (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 crômio (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 Cr_2O_3	$\mu\text{g mL}^{-1*}$	$\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr_2O_3	Amostra de 0,1g		$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
			A**	A**	
0,250		250	0,119 \pm 0,014	0,121 \pm 0,009	
0,500		500	0,240 \pm 0,004	0,238 \pm 0,003	
1,00		1000	0,479 \pm 0,001	0,480 \pm 0,002	
1,50		1500	0,730 \pm 0,007	0,732 \pm 0,007	
2,00		2000	0,993 \pm 0,006	0,994 \pm 0,007	
2,50		2500	1,229 \pm 0,004	1,229 \pm 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 crômio (III) a crômio (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 2mmol 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 0,250mg mL⁻¹ a 2,500mg mL⁻¹ de crômio (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 500mg L⁻¹ de Cr₂O₃ foi diluída. Os pontos dessa curva padrão sofreram o mesmo tratamento de digestão nítrica/perclórica, para que suas condições de ácidos e acidez se aproximasse às das amostras. A equação de regressão linear inerente a essa curva padrão, permitiu a caracterização do crômio nas amostras lidas no equipamento a partir de alíquotas do extrato ácido diluído.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da extrema estabilidade do óxido de crômio (III), demonstrou-se que, nas fezes, o metal é fácil e completamente oxidado a crômio (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 Cr₂O₃ não interferem na recuperação do marcador.

Constando-se que a absorbância das soluções da espécie química formada em meio ácido pela reação entre crômio (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 crômio (III) a crômio (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 Cr₂O₃ em fezes, os resultados obtidos não confirmaram perda de crômio 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):

$C(\%) \text{ de } Cr_2O_3 = 2,015 \cdot 10^{-3} (A + 0,009) (V/v.m_a)$ (3) ou,
 $C(\text{mg.kg}^{-1}) \text{ de } Cr_2O_3 = 20,15 (A + 0,009) (V/v.m_a)$ (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 crômio, na sua dosagem em fezes e, quando empregado como marcador biológico na forma de óxido de crômio (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 crômio 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 (%) nas fezes	Teor de Cr_2O_3 (%) determinado		
	Métodos		
	1,5-difenilcarbazida	Absorção atômica	Cromato/dicromato
0,01	$0,030 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,000$	$0,029 \pm 0,004$
0,02	$0,060 \pm 0,000$	$0,059 \pm 0,001$	$0,058 \pm 0,004$
0,03	$0,090 \pm 0,001$	$0,091 \pm 0,001$	$0,090 \pm 0,006$
0,05	$0,150 \pm 0,001$	$0,149 \pm 0,004$	$0,148 \pm 0,005$
0,1	$0,299 \pm 0,001$	$0,300 \pm 0,004$	$0,299 \pm 0,011$
0,2	$0,599 \pm 0,001$	$0,598 \pm 0,019$	$0,598 \pm 0,017$

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANALAR. "ANALAR" Standards for laboratory chemicals. 6.ed. London : ANALAR Standards, 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 crômio (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.502-5066, 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 crômio 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 chromion 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 diphenylcarbazide 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.