

Diminuição do Teor de Óxido de Crômio (III) Usado como Marcador Externo¹

Hermann Bremer Neto², Celso Augusto Fessel Graner³, Luiz Edivaldo Pezzato⁴, Carlos Roberto Padovani⁵, Osmar Angelo Cantelmo⁶

RESUMO - A sensibilidade do método espectrofotométrico da s-difenilcarbazida de determinação do crômio permite que esse metal possa ser determinado em teores e em massas de amostras tão pequenas que as concentrações atualmente usadas de óxido de crômio (III) como marcador externo em ensaios biológicos poderiam ser drasticamente diminuídas. Utilizando-se do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) para um estudo sobre o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da fração protéica, seis níveis de óxido de crômio (III) - 0,01% - 0,02% - 0,03% - 0,05% - 0,1% e 0,2% - foram incorporados em dietas isoprotéica e isoenergética, objetivando-se verificar se o cálculo do CDA seria afetado pela variação do teor do marcador. Os seis tratamentos foram dispostos em um delineamento em blocos inteiramente casualizados, sendo as fezes coletadas durante 16 dias. Verificou-se que os resultados do coeficiente de digestibilidade aparente da fração protéica não apresentaram diferenças estatísticas significativas devidas aos teores incorporados do marcador à ração e aos dias de coleta. Conseqüentemente, e em experimentos dessa natureza, nada impede que seja reduzido o teor de óxido de crômio (III) ao menos até 0,01%: além da economia relativa ao consumo do mesmo e da facilidade na manipulação de menor quantidade de amostras de fezes, o método espectrofotométrico da s-difenilcarbazida permite dosar esse nível (e até menor do que 0,01%) de modo simples e rápido, com precisão e exatidão.

Palavras-chave: digestibilidade aparente, óxido de crômio (III), peixe, s-difenilcarbazida

Reduction in Chromium (III) Oxide Level as an External Marker

ABSTRACT - The objective of this study was to reduce the level of the biological marker Cr₂O₃ in animal diets, due to the sensibility of the s-diphenylcarbazine spectrophotometric method for chromium determination in feces, recently developed. Six levels of marker, chromium (III) oxide (0.01% - 0.02% - 0.03% - 0.05% - 0.1% and 0.2%), were incorporated into isoproteic and isoenergetic diets, for the apparent digestibility assay of the "piauçu" (*Leporinus macrocephalus*), in a design of entirely randomized groups. Feces were collected during sixteen days. The statistical analysis did not show significant differences in the apparent digestibility of the proteinic fraction due to the concentration levels of the marker incorporated into the diets and the collection days. Consequently, there is nothing to stop us from reducing Cr₂O₃ rate to at least 0.01% in these digestibility assays: spectrophotometry of s-diphenylcarbazine allows us to determine this level or even smaller levels in an accurate, simple, and quick manner.

Key Words: apparent digestibility, chromium (III) oxide, fish, s-diphenylcarbazine

Introdução

O coeficiente de digestibilidade aparente é um dos principais parâmetros para avaliar o valor nutritivo dos alimentos, sendo calculada através da diferença entre a quantidade do nutriente ingerido e da quantidade do nutriente remanescente nas excreções fecais. Dois métodos são usados para esse fim: um deles é direto, e requer a completa recuperação das fezes para o cálculo em questão; o outro é indireto, e dispensa a completa recuperação das fezes para esse

cálculo, por fazer uso de um marcador na dieta (Choubert et al., 1979). No método indireto envolvendo o uso de indicador inerte na dieta, assume-se que a quantidade do mesmo, na dieta e nas fezes, permaneça constante ao longo do período experimental e que todo o indicador ingerido deva aparecer nas fezes (Utley et al., 1970; Cho et al., 1982; NRC, 1993).

Segundo Titgemeyer (1997), o óxido de crômio (III) foi o marcador mais utilizado para estudos de fluxo da digesta nos trabalhos publicados entre 1986 e 1995, no Journal of Animal Science, 90 de um total

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, pós-graduando do Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Área de Concentração de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/UNESP, Botucatu/SP.

² Depto de Bioquímica e Biofísica. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) - Rua José Bongiovani nº 700 - CEP 19 050-900 - Presidente Prudente/SP. E-mail: hermann@apccmail.unoeste.br. Bolsista do CNPq.

³ Depto de Química e Bioquímica-Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu/SP.

⁴ Depto de Melhoramento e Nutrição Animal-FMVZ/UNESP, Botucatu/SP.

⁵ Depto de Bioestatística-Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu/SP.

⁶ Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais-CEPTA/IBAMA, Pirassununga/SP.

de 124, e em função da sua inércia química em sistemas digestórios, essa substância vem sendo empregada há muito tempo como marcador biológico para animais, em estudos de nutrição, digestibilidade, produção e trânsito fecal, em farmacologia e outros, sendo fornecido misturado nas dietas, encapsulado com gelatina, suspenso em óleos, em comprimidos farináceos, ou introduzido diretamente no trato digestório superior por sonda apropriada, para posterior coleta das fezes e dosagem do conteúdo do metal nas mesmas (Haenlein et al., 1966; Furukawa & Tsukahara, 1966; Iturbide, 1967; Kotb & Luckey, 1972; Macoris, 1989).

Deve-se ressaltar que o crômio normalmente nos alimentos é um cátion com número de oxidação 3+ [como no óxido de crômio (III)] e essa deve ser a forma predominante do mesmo nos materiais biológicos em condições normais, nos quais ocorre em teores de mg/kg. Sua absorção só pode ocorrer se estiver na forma solúvel (cloretos, sulfatos, nitratos), nunca na forma insolúvel e estável de Cr₂O₃. Sendo o marcador fornecido na forma de óxido de crômio (III) e em quantidade muito superior à natural, atravessa o sistema digestório sem reagir, solubilizar-se, ou sofrer absorção, devendo ser totalmente recuperado através das fezes, inclusive sem sofrer a interferência daquele crômio natural, pelo seu teor praticamente desprezível (Bowen, 1964, 1966; Chuecas & Riley, 1966; Furukawa & Tsukahara, 1966; Mertz, 1969; Mertz & Roginsky, 1971). Se fornecido na forma comercial, pode introduzir diminuta quantidade de formas contaminantes e solúveis do metal que, sendo absorvidas pelos animais durante um experimento, poderiam comprometer a interpretação dos resultados experimentais (Whitby & Lang, 1960; Sasson, 1966).

A determinação do crômio em materiais biológicos tem sido realizada por espectrografia de emissão, polarografia, amperometria, ativação neutrônica, cromatografia de gás-líquido, absorção atômica, entre outros menos citados. Com relação aos métodos espectrofotométricos, o único que oferece sensibilidade suficiente para essa dosagem é aquele baseado na reação entre crômio (VI) e s-difenilcarbazida (Graner, 1972), recentemente ajustado por Bremer Neto (1999) especificamente para a determinação do crômio em fezes, quando utilizado como marcador biológico na forma de óxido de crômio (III).

A grande sensibilidade do método da s-difenilcarbazida, entretanto, confronta-se com os níveis elevados do marcador (0,1% até 3%) largamen-

te usados nas dietas experimentais (Lied et al., 1982; Silva & Perera, 1984; La Noue & Choubert, 1985; Shiau & Chen, 1993; Davis & Arnold, 1994; Riche et al., 1995; Gaylord & Gatlin III, 1996; Hill et al., 1996; Gomes & Peña, 1997). Sugere-se, inclusive, que o óxido de crômio (III) nas dietas altere a utilização da glicose, e que afete a digestibilidade com o aumento do seu teor (de 0,5% para 2%) na alimentação de tilápia; um máximo de 0,5% do marcador não afetaria a digestibilidade, e 0,02% seria o nível de Cr₂O₃ nas dietas para a máxima utilização da glicose (Shiau & Liang, 1995; Shiau & Shy, 1998).

A sensibilidade do método espectrofotométrico da s-difenilcarbazida, permite estudar a possibilidade de diminuição do teor do marcador óxido de crômio (III) em dietas animais de ensaios biológicos, sem que essa diminuição comprometa as conclusões desses ensaios e para isto elegeu-se um estudo sobre o coeficiente de digestibilidade aparente da fração protéica com peixes da espécie piauçu (*Leporinus macrocephalus*), arraçoados com dietas contendo seis diferentes teores de óxido de crômio (III), variando de 0,01 a 0,2%.

Material e Métodos

O experimento foi realizado entre novembro de 1998 e maio de 1999 conjuntamente no Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA), em Pirassununga/SP, e no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu/SP.

Foram utilizados seis aquários de fibra de vidro, circulares, com 300 L de capacidade, abastecidos por um sistema de circulação aberto, equipado com filtro de areia, e ajustado para um volume de circulação de 5 L/aquário/min. Parâmetros de qualidade da água (pH, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido) foram monitorados três vezes por semana. Foi mantido um fotoperíodo com 12 horas de escuro e 12 horas de iluminação.

Quinhentos e dez juvenis de piauçu (*Leporinus macrocephalus*), com massa média inicial de 70,0 g ± 2,7 g, de um total de 810 indivíduos, foram distribuídos aleatoriamente nos aquários (85 animais/aquário); a distribuição dos tratamentos (níveis do marcador nas rações) também foi aleatória. Antes do experimento, os peixes foram submetidos a períodos de adaptação: um de dez dias, referente ao ambiente, manejo e dieta, e outro de cinco dias, referente às dietas com níveis crescentes do marcador nas respectivas unidades experimentais.

Os tratamentos experimentais constituíram-se de seis dietas isoprotéicas (29% de proteína bruta) e isoenergéticas (2.760 kcal de energia digestível/kg, de energia disponível), segundo as normas do National Research Council, USA (NRC, 1993). As dietas foram preparadas com farinha de peixe (20%), soja texturizada (20%), farelo de trigo (35%), milho (23%), suplemento vitamínico e mineral (2%) e com óxido de crômio (III) apresentando grau de pureza de 99,58%, que após a homogeneização final, foram obtidas as dietas contendo 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; e 0,2% do elemento crômio, que foram então peletizadas e secas em estufa de circulação forçada de ar (entre 50 e 60°C) até massa constante.

No período experimental de dezesseis dias, os peixes foram alimentados ad libitum à vontade, quatro vezes ao dia, às 8h30, 11h30, 14h30 e 17h30. Após 15 minutos da primeira e da última alimentação, os resíduos do manejo diário do sistema experimental eram removidos. Limpos os aquários, após a última alimentação diária, as fezes produzidas decantavam em copo coletor ("sistema Guelph") (Cho et al., 1985), e no outro dia, às 7h30, eram recolhidas, secas até massa constante em estufa de circulação forçada de ar, moídas para passar por peneira de 841 µm de abertura de malha, e armazenadas para posterior determinação dos teores de proteína bruta e de crômio.

A determinação do teor de óxido de crômio (III) nas dietas e nas fezes foi feita pelo método espectrofotométrico da s-difenilcarbazida (Bremer Neto, 1999).

A determinação do conteúdo de proteína bruta das dietas e das fezes foi feita pelo clássico método de Kjeldahl: digestão sulfúrica das amostras, com a temperatura mais elevada e catalisada por mistura de óxido de mercúrio (II) e sulfato de sódio, destilação por arraste de vapor da amônia do digerido (fortemente alcalinizado), sua retenção em solução de ácido bórico em excesso, e titulação do ânion borato formado com solução aferida de ácido forte, em presença de mistura indicadora de verde de bromocresol e vermelho de metilo (AOAC, 1995).

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da fração protéica das dietas foi estimado de acordo com Cho et al. (1985), na qual os subscritos f e d designam fezes e dieta, respectivamente:

$$\%CDA = 100 - \left[\frac{(\% \text{ Marcador})_d \cdot (\% \text{ Nutriente})_f}{(\% \text{ Marcador})_f \cdot (\% \text{ Nutriente})_d} \right]$$

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados. A análise estatística dos resul-

tados obtidos de óxido de crômio (III) nas fezes foi feita por técnica que compara regressões lineares simples, através dos coeficientes angular e linear das mesmas (Ostle & Mensing, 1975); os resultados de proteína bruta nas dietas e em fezes, assim como os de coeficiente de digestibilidade aparente, foram submetidos à análise da variância (Vieira, 1998).

Resultados e Discussão

Os valores médios dos parâmetros ambientais do sistema experimental, tais como oxigênio dissolvido ($4,55 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0,07 \text{ mg.L}^{-1}$), temperatura (manteve-se constante durante o experimento, $27,8^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$), pH ($6,57 \pm 0,11$), amônia ($0,13 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) e nitrito ($0,05 \pm 0,00$), mantiveram-se dentro dos intervalos considerados adequados para a preservação da vida e desenvolvimento natural de peixes (Castagnolli & Cyrino, 1986; Castagnolli & Pinto, 1990).

Os resultados das determinações dos teores de óxido de crômio (III) determinado nas dietas, referindo-se a médias de três repetições e expressas na forma de intervalos de confiança ($g = 0,95$), não se constataram diferenças estatísticas significativas entre os teores do marcador incluído e determinado em cada nível de inclusão (Tabela 1).

A recuperação determinada, aparentemente superior de Cr_2O_3 pode ser atribuída à necessária secagem (e conseqüente concentração do marcador) das dietas para moagem e homogeneização, já que às vezes uma quantidade tão pequena quanto 100 mg de amostra pôde ser tomada para o processo analítico.

Os resultados da determinação do óxido de crômio (III) nas dietas, como nas fezes, foram obtidos através do uso da expressão abaixo, cuja origem deve-se ao ajuste da curva de referência (Tabela 2), envolvendo os pares de dados concentração, C_{marcador} (mg/mL), em equivalente de óxido de crômio (III) na solução colorida final, como variável independente, e absorbância, A, como variável dependente. Dos 18 pares de dados envolvidos na regressão linear inerente (coeficiente de correlação linear = 0,9999), obtém-se:

$$A = -0,009 + 0,497 \cdot C_{\text{marcador}} (\mu\text{g/mL}), \text{ transformando}$$

$$C_{\text{marcador}} (\mu\text{g/mL}) = 2,014 (A + 0,009)$$

Os resultados das determinações do marcador nas fezes (Tabela 3) foram comparados como regressões, ora envolvendo os dias de coleta das fezes,

Tabela 1 - Médias dos teores do marcador, óxido de crômio (III), incluído nas dietas experimentais e determinado nas fezes¹Table 1 - Means of chromium (III) oxide included in the experimental diets and determined in the feces¹

Dietas experimentais <i>Experimental diets</i>	Cr ₂ O ₃ (%)		Recuperado (%) <i>Recovery (%)</i>
	Incluído <i>Included</i>	Determinado <i>Determined</i>	
1	0,01	0,010 ± 0,001	103
2	0,02	0,020 ± 0,001	102
3	0,03	0,030 ± 0,001	101
4	0,05	0,050 ± 0,001	101
5	0,10	0,100 ± 0,000	100
6	0,20	0,200 ± 0,000	100

¹ Médias de três repetições ± s.t.n-1/2 (g = 0,95).¹ Averages of three replicates ± s.t.n-1/2 (g = .95).Tabela 2 - Curva de referência (ou padrão) por meio do dicromato de potássio (substância de referência ou padrão), expressa em equivalente de Cr₂O₃Table 2 - Reference curve (or standard curve) through potassium dichromate (standard substance), expressed as Cr₂O₃ equivalent

Concentração de Cr ₂ O ₃ ¹ <i>Cr₂O₃ concentration</i>	Absorbância, A <i>Absorbance, A</i>			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{média} ± s.t.n-1/2
0,25	0,121	0,121	0,120	0,121 ± 0,001
0,50	0,240	0,236	0,238	0,238 ± 0,005
1,00	0,480	0,479	0,481	0,480 ± 0,002
1,50	0,734	0,730	0,732	0,732 ± 0,005
2,00	0,992	0,994	0,996	0,994 ± 0,005
2,50	1,230	1,229	1,229	1,229 ± 0,001

¹ Em equivalente de Cr₂O₃, mg/mL.¹ As Cr₂O₃ equivalent, mg/mL.Tabela 3 - Médias dos teores de óxido de crômio (III) determinado nas fezes e obtidas em função dos níveis do marcador nas dietas¹

Table 3 - Means the chromium (III) oxide determined in the feces, in function of the dietary marker

Dias de coleta <i>Collection day</i>	Cr ₂ O ₃ (%) nas fezes <i>Cr₂O₃ in the feces</i>					
	Cr ₂ O ₃ (%) nas dietas <i>Cr₂O₃ in the diets</i>					
	0,01	0,02	0,03	0,05	0,1	0,2
1 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,300 ± 0,005	0,600 ± 0,001
2 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,001	0,600 ± 0,001
3 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,004	0,600 ± 0,004
4 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,299 ± 0,004	0,600 ± 0,004
5 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,299 ± 0,001	0,600 ± 0,001
6 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,298 ± 0,001	0,599 ± 0,007
7 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,001	0,599 ± 0,003
8 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,299 ± 0,003	0,599 ± 0,004
9 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,004	0,600 ± 0,004
10 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,001	0,600 ± 0,004
11 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,299 ± 0,004	0,600 ± 0,001
12 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,299 ± 0,001	0,600 ± 0,001
13 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,298 ± 0,001	0,598 ± 0,001
14 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,003	0,600 ± 0,001
15 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,300 ± 0,003	0,600 ± 0,004
16 ^o	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,000	0,090 ± 0,001	0,150 ± 0,001	0,299 ± 0,006	0,598 ± 0,001

¹ Médias de três repetições ± s.t.n-1/2.¹ Average of three replicates ± s.t.n-1/2.

ora envolvendo os teores de óxido de crômio (III) incluídos nas dietas, não se encontrando diferenças estatísticas significativas em ambos os casos.

Fatores como horário e tipo de alimentação, forma de dosificação, densidade do óxido de crômio (III), número de doses, método e hora de coleta da amostra de fezes, período de adaptação, período de coleta e erros nas determinações químicas são citadas como responsáveis pela variabilidade do teor de óxido de crômio (III), determinado até agora pelos métodos espectrofotométrico do sistema cromato/dicromato, ou espectroscópico de chama de absorção (Hardison & Reid, 1953; Hardison et al., 1956; Pigden & Brisson, 1956, 1957; Brisson, 1956, 1960; Moore, 1957; Putman, 1962). Segundo Corbett et al. (1960), sempre e quando o marcador estiver bem homogeneizado na dieta, os teores determinados nas fezes não apresentarão esta variabilidade, o que foi verificado neste trabalho.

No uso do método indireto envolvendo o uso de indicador inerte na dieta, assume-se que a quantidade do mesmo, no alimento e nas fezes, permaneça constante ao longo do período experimental e que todo o indicador ingerido deva aparecer nas fezes

(Utley et al., 1970; Cho et al., 1982), estando de acordo com os resultados deste trabalho, assim, teoricamente uma amostra é suficiente para efetuar as estimativas necessárias (Moore, 1957; Iturbide, 1967).

Com relação à proteína bruta das dietas isoprotéicas e isoenergéticas marcadas (Tabela 4), os teores de óxido de crômio (III) incorporados não produziram diferenças estatísticas significativas nos seus teores. Além disso, sua média global ($29,00\% \pm 0,02\%$), também não diferiu da concentração teórica de proteína bruta na dieta (29%) ($g = 0,95$).

Com a fórmula preconizada por Cho et al. (1985), calculou-se o coeficiente de digestibilidade aparente (em função da proteína bruta) da dieta fornecida aos peixes, cujos resultados encontram-se na Tabela 5.

Submetidos à análise estatística, não se registraram diferenças significativas entre tais resultados, caracterizando que a diminuição do teor do marcador pelo menos até $0,01\%$ na dieta não influenciou a determinação da digestibilidade aparente (através da fração protéica) em peixes da espécie piauçu (*Leporinus macrocephalus*), estando de acordo com Shiau & Shy (1998).

Tabela 4 - Teores médios de proteína bruta (PB) nas fezes coletadas do 1^o ao 16^o dia, obtidas para as seis dietas experimentais¹

Table 4 - Average contents of crude protein (PB) in collected feces (1st to 16th days), obtained for the six experimental diets

Dias de coleta Collection days	Proteína bruta (%) nas fezes Crude protein (%) in the feces					
	Cr ₂ O ₃ (%) nas dietas Cr ₂ O ₃ (%) in the diets					
	0,01%	0,02%	0,03%	0,05%	0,1%	0,25
1 ^o	9,00 ± 0,04	9,02 ± 0,04	8,99 ± 0,04	9,00 ± 0,04	9,00 ± 0,04	9,01 ± 0,04
2 ^o	8,99 ± 0,04	9,00 ± 0,04	9,00 ± 0,02	9,02 ± 0,04	9,00 ± 0,04	9,02 ± 0,04
3 ^o	9,03 ± 0,04	9,02 ± 0,04	8,99 ± 0,07	9,00 ± 0,04	8,98 ± 0,04	9,01 ± 0,04
4 ^o	9,02 ± 0,01	9,02 ± 0,04	9,00 ± 0,04	8,99 ± 0,04	8,99 ± 0,04	9,01 ± 0,04
5 ^o	9,02 ± 0,06	9,02 ± 0,06	9,01 ± 0,05	9,00 ± 0,04	8,98 ± 0,06	8,99 ± 0,05
6 ^o	9,01 ± 0,09	9,00 ± 0,09	8,99 ± 0,07	9,01 ± 0,06	8,98 ± 0,01	8,99 ± 0,01
7 ^o	9,02 ± 0,01	9,02 ± 0,01	9,00 ± 0,01	8,98 ± 0,01	9,00 ± 0,01	8,98 ± 0,01
8 ^o	9,03 ± 0,01	9,03 ± 0,03	8,98 ± 0,01	9,00 ± 0,01	9,00 ± 0,01	9,00 ± 0,01
9 ^o	9,03 ± 0,01	9,01 ± 0,06	8,98 ± 0,02	9,03 ± 0,01	8,99 ± 0,01	9,02 ± 0,01
10 ^o	9,02 ± 0,01	9,02 ± 0,01	8,98 ± 0,04	9,00 ± 0,01	9,02 ± 0,01	9,00 ± 0,01
11 ^o	9,03 ± 0,01	9,01 ± 0,01	9,01 ± 0,01	8,99 ± 0,01	8,99 ± 0,05	9,00 ± 0,01
12 ^o	9,02 ± 0,01	9,01 ± 0,01	9,00 ± 0,02	9,01 ± 0,01	8,99 ± 0,01	9,01 ± 0,01
13 ^o	9,01 ± 0,09	9,01 ± 0,06	9,00 ± 0,04	9,02 ± 0,06	8,99 ± 0,09	9,02 ± 0,07
14 ^o	9,01 ± 0,05	9,00 ± 0,06	8,98 ± 0,06	9,01 ± 0,03	9,03 ± 0,09	9,02 ± 0,07
15 ^o	9,00 ± 0,09	9,02 ± 0,09	9,00 ± 0,04	8,97 ± 0,06	8,99 ± 0,06	9,01 ± 0,06
16 ^o	8,99 ± 0,06	9,01 ± 0,06	9,02 ± 0,06	8,98 ± 0,06	9,00 ± 0,09	9,01 ± 0,09

¹ Médias de três repetições ± s.t.n-1/2 ($g = 0,95$).

¹ Averages of three replicates ± s.t.n-1/2 ($g = .95$).

Tabela 5 - Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da fração protéica em dietas com diferentes teores do marcador óxido de crômio (III) para *Leporinus macrocephalus*Table 5 - Apparent digestibility coefficient (CDA) of the proteic fraction, in diets with different levels of chromium (III) oxide as marker for *Leporinus macrocephalus*

Dias de coleta Collection days	CDA (%) por intermédio da fração protéica ADC (%) by means of protein fraction					
	Cr ₂ O ₃ incorporado nas dietas (%) Cr ₂ O ₃ incorporated in the diets (%)					
	0,01	0,02	0,03	0,05	0,1	0,2
1 ^o	89,64	89,63	89,67	89,59	89,66	89,64
2 ^o	89,67	89,66	89,66	89,63	89,62	89,63
3 ^o	89,62	89,63	89,67	89,66	89,67	89,63
4 ^o	89,63	89,63	89,54	89,60	89,64	89,66
5 ^o	89,63	89,63	89,64	89,59	89,67	89,67
6 ^o	89,64	89,66	89,67	89,64	89,62	89,67
7 ^o	89,63	89,63	89,66	89,68	89,62	89,66
8 ^o	89,62	89,62	89,68	89,59	89,64	89,67
9 ^o	89,62	89,64	89,56	89,63	89,66	89,63
10 ^o	89,63	89,63	89,56	89,59	89,60	89,66
11 ^o	89,62	89,64	89,64	89,60	89,67	89,66
12 ^o	89,63	89,64	89,54	89,57	89,66	89,63
13 ^o	89,64	89,64	89,66	89,63	89,61	89,60
14 ^o	89,64	89,66	89,56	89,64	89,60	89,62
15 ^o	89,66	89,63	89,66	89,69	89,67	89,64
16 ^o	89,66	89,64	89,63	89,68	89,64	89,61

Conclusões

Os teores de 0,2 a 0,01% de óxido de crômio (III) incorporados às dietas, como marcador externo, não interferiram nos valores do coeficiente de digestibilidade aparente da fração protéica para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*).

Literatura Citada

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Washington, D.C.: 1995. 1094p.
- BOWEN, H.J.M. The determination of chromium in biological material by radio-activation. **Analytica Chimica Acta**, v.89, p.658-661, 1964.
- BOWEN, H.J.M. **Trace elements in biochemistry**. London: Academic Press, 1966. 241p.
- BREMER NETO, H. **O método da s-difenilcarbazida na determinação espectrofotométrica do crômio (III) em fezes, após sua utilização como marcador biológico na forma de óxido de crômio (III)**: Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1999. 53p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, 1999.
- BRISSON, G.J. Note on the routine determination of chromic oxide in feces. **Canadian Journal of Agricultural Science**, v.36, p.210-212, 1956.
- _____. **Indicator methods for estimating amounts of forage consumed by grazing animals**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 8., University of Reading, 1960. England: Alden Press, 1960. p.435-438.
- CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. 152p.
- CASTAGNOLLI, N.; PINTO, M.L.G. **Piscicultura**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1990. 117p.
- CHO, C.Y.; COWEY, C.B.; WATANABE, T. **Finfish nutrition on Asia: methodo-logical approaches to research and development**. Ottawa: International Development Research Center, 1985. 154p.
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.J.; BAYLEY, H.S. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.73, p.25-41, 1982.
- CHOUBERT, G.; DE LA NOÛÉ, J.; LUQUET, P. Continuous quantitative auto-matic collector for fish feces. **The Progressive Fish-Culturist**, v.41, p.91-97, 1979.
- CHOUBERT, G.; DE LA NOÛÉ, J.; LUQUET, P. Digestibility in fish: improved dexice for the automic collection of feces. **Aquaculture**, v.29, p.185-189, 1982.
- CHUECAS, L.; RILEY, J.P. The spectrophotometric determination of chromium in sea water. **Analytica Chimica Acta**, v.35, p.240-246, 1966.
- CORBETT, J.L.; GREENHALGH, J.F.D.; MCDONALD, I. et al. Excretion of chromium sesquioxide administered as component of paper to sheep. **British Journal of Nutrition Society**, v.14, p.289-295, 1960.
- DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. Estimation of apparent phosphorus availability from organic phosphorus sources by *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.127, p.245-254, 1994.

- 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 Science Fisheries**, v.32, p.502-506, 1966.
- GAYLORD, T. L.; GATLIN III, D.M. Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v.139, p.303-314, 1996.
- GOMES, S.Z.; PEÑA, M.C.G. Digestibilidade aparente da mandioca (*Manihot sculenta*) pelo camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.858-862, 1997.
- GRANER, C.A.F. **Determinação do crômio pelo método colorimétrico da difenilcarbazida**: Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1972. 112p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual Paulista, 1972.
- HAENLEIN, G.F.W.; SMITH, R.C.; YOON, Y.M. Determination of fecal excretion rate of horses with chromic oxide. **Journal Animal Science**, v.25, p.1091-1095, 1966.
- HARDISON, W.A.; REID, J.T. Use of indicators in the measurement of the dry matter intake of grazing animals. **Journal of Nutrition**, v.51, p.35-52, 1953.
- _____ et al. Fecal chromic oxide concentration in 12 dairy cows as related to time and frequency of administration and to feeding schedule. **Journal of Nutrition**, v.58, p.11-17, 1956.
- HILL, R.C.; BURROWS, C.F.; ELLISON, G.W. et al. The use of chromic oxide as a marker for measuring small intestinal digestibility in cannulated dogs. **Journal Animal Science**, v.74, p.1629-1634, 1996.
- ITURBIDE, C.A. El óxido crômico como indicador externo para estimar producción fecal y consumo en las pruebas de digestibilidad. **Turrialba**, v.17, p.304-313, 1967.
- KOTB, A.R.; LUCKEY, T.D. Markers in nutrition. **Nutrition Abstract Review**, v.42, p.813-845, 1972.
- LA NOUE, J.; CHOUBERT, G. Apparent digestibility of invertebrate biomasses by rainbow trout. **Aquaculture**, v.50, p.102-112, 1985.
- LIED, E.; JULSHAMN, K.; BRAEKKAN, O.R. Determination of protein digestibility in Atlantic cod (*Gadus morhua*) with internal and external indicators. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences**, v.39, p.854-861, 1982.
- MACORIS, D.G. **Trânsito intestinal em equinos: efeitos dos tratamentos com flunixin me-glumina, dipirona-hioxina e óleo mineral**: Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1989. 28p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 1989.
- MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiological Reviews**, v.49, p.163-239, 1969.
- MERTZ, W.; ROGINSKY, E.E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factor. In: MERTZ, W.; CORNATZER, W.E. (Eds.) **Newer trace elements in nutrition**. New York: Marcel Dekker, 1971. p.123-153.
- MOORE, J.H. Diurnal variations in the composition of the faeces of pigs on diets containing chromium oxide. **British Journal of Nutrition**, v.11, p.273-280, 1957.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrients requirements of domestic animals**. Washington, D.C: National Academic Press: 1993. p.35-39.
- OSTLE, B.; MENSING, R.W. **Statistics in research**. 3 ed. Ames: Iowa State University, 1975. 596p.
- PIGDEN, W.J.; BRISSON, G.J. Effect of frequency of administration of chromic oxide on its fecal excretion pattern by grazing weathers. **Canadian Journal of Agricultural Science**, v.36, p.146-155, 1956.
- _____. Note on a chromic oxide pellet to provide uniform release of this indicator in the rumen of cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.37, p.187-189, 1957.
- PUTMAN, P.A. Survey of the use of chromic oxide in ruminant research. **Journal of Animal Science**, v.21, p.185-192, 1962.
- RICHE, M.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Barium carbonate as an alternative indicator to chromic oxide for use on digestibility experiments with rainbow trout. **Nutrition Research**, v.15, p.1323-1331, 1995.
- SASSON, H.F. Labeled chromium sesquioxide as a marker for digesta: preparation and quantitative determination in feces. **International Journal of Applied Radiation and Isotopes**, v.17, p.329-334, 1966.
- SHIAU, S.Y.; CHEN, M.J. 1993. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. **Journal Nutrition**, v.123, p.1747-1753, 1993.
- SHIAU, S.Y.; LIANG, H.S. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. **Journal Nutrition**, v.125, p.976-982, 1995.
- SHIAU, S.Y.; SHY, S.M. Dietary chromic oxide inclusion level required to maximize glucose utilization in hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**, v.161, p.357-364, 1998.
- SILVA, S.S.; PERERA, M.K. Food, nutritional status and digestibility of *Sarotherodon mossambicus* populations of 12 man-made lakes in Sri-Lanka. **Environ. Biol. Fishes**, v.11, p.205-219, 1984.
- TITGEMEYER, E.C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. **Journal Animal Science**, v.75, p.2235-2247, 1997.
- UTLEY, P.R.; BOLING, J.A.; BRADLEY, N.W. et al. Recovery of radioactive chromic oxide from the bovine gastrointestinal tract. **Journal Nutrition**, v.100, p.1227-1231, 1970.
- VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998. 196p.
- WHITBY, L.G.; LANG, D. Experience with the chromic oxide method of fecal marking in metabolic balance investigations on humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.39, p.854-859, 1960.

Recebido em: 21/03/01

Aceito em: 16/12/02