

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Fe e Ca EM AMOSTRAS DE PEIXES VIA FAAS

Geovane S. Oliveira¹; Marcos de A. Bezerra¹; Leane S. Nunes¹; Sulene A. de Araújo¹; Jaqueline P. Contreiras¹; Samuel O. Santos¹; João V. R. Santos¹;

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Jequié/Ba – Av. José Moreira Sobrinho S/N

Palavras-Chave: Metais, Segurança alimentar, Bioacumulação

Introdução

Os avanços científicos e tecnológicos aprimoram a avaliação da qualidade nutricional dos alimentos, permitindo a exploração de informações complexas e pouco estudadas. No Brasil, as Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos (TACO e TBCA), além das recomendações da FAO, são fundamentais para fornecer dados detalhados sobre a composição dos alimentos, contribuindo para a segurança alimentar. No entanto, em casos de alimentos complexos, esses dados podem ser insuficientes, sendo necessário o uso de métodos analíticos avançados para identificar e quantificar nutrientes específicos, como metais e minerais. [1,2]

Apesar das tabelas serem essenciais para o controle da ingestão diária de nutrientes e correlacionarem-se com o estado nutricional do indivíduo, há situações em que os dados fornecidos não são suficientes, especialmente ao analisar alimentos complexos, assim se faz necessária a utilização de métodos analíticos avançados para averiguar os analitos presentes nas matrizes alimentares. [4, 7, 10, 11, 12]

Peixes, por exemplo, estão expostos a metais como Cálcio, Ferro, Cádmiio, Chumbo, Zinco, Cobre e Mercúrio, que podem se acumular em níveis prejudiciais ao ser humano. A contaminação pode ocorrer devido a atividades humanas, como mineração e despejo de dejetos, o que torna crucial monitorar os níveis de metais em peixes. Os minerais desempenham funções metabólicas importantes e a deficiência ou excesso de certos minerais estão associados a doenças como anemia ferropriva e Hemocromatose (relacionadas ao ferro), além de problemas ósseos causados pela falta de cálcio. Com isso, Anvisa, através da RDC N° 269, estabelece valores de referência para a ingestão diária de nutrientes, incluindo Fe e Ca, cujos limites para adultos são de 14 mg e 1000 mg, respectivamente. Para crianças, esses limites são 6 mg e 500 mg, mas a ingestão diária ainda é inferior ao recomendado. [3, 5, 6]

Dentre as técnicas mais amplamente utilizadas para a determinação desses metais está a espectrometria de emissão atômica, espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Na atualidade, há diversas metodologias propostas para a determinação de metais em matrizes alimentares que utilizam procedimentos de preparo de amostras convencionais, como a digestão ácida por via úmida com frasco aberto em bloco digestor e a digestão ácida por via úmida com bomba de digestão. Contudo, esses métodos são laboriosos, onde demandam a utilização de reagentes concentrados e/ou com um meio de alta temperatura e pressão, além da necessidade de muito tempo para ser executado. [4]

Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias simples, utilizando técnicas de baixo custo e mais acessíveis de análise tais como a Espectroscopia de absorção atômica (FAAS), é muito importante. Assim, procedimentos de preparo de amostras simples, rápidos, eficientes e

com custos reduzidos têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de metais em diversas amostras. Dentre esses procedimentos, destaca-se a extração assistida por ultrassom. [4, 7, 11]

O uso da energia ultrassônica tem sido uma alternativa na extração desses metais, devido a maior rapidez durante o processo de extração da amostra, quando comparados com outros métodos convencionais. Além disso, uma outra vantagem é minimizar as possíveis perdas de elementos voláteis, pois aceleram o processo de decomposição sem a necessidade de aquecer a amostra. O processo de extração baseia-se na ação de ondas mecânicas de baixa frequência, as quais são responsáveis pela formação e colapso de microbolhas ocasionando áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução. A ação do ultrassom facilita a extração dos elementos, a sedimentação do material particulado em suspensão e promove a quebra de células vegetais. Além disso, extração assistida por ultrassom é de simples operação e eficiente para extração de elementos em amostras de alimentos, não necessitando de longos períodos para o preparo das amostras nem da utilização de altas temperaturas e pressão elevada. [4, 7, 11, 13]

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para determinação de Fe e Ca em amostras de peixe por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) utilizando a extração assistida por ultrassom para o preparo das amostras. Primeiramente realizou-se a otimização das variáveis (tempo de extração, massa da amostra e concentração do ácido extrator), aplicando o planejamento experimental Doehlert em um mix de duas espécies de peixe (cavalinha e tilápia). Após obter os valores ótimos aplicou-se o método estudado para a determinação desses elementos nas 2 espécies distintas de peixe. Posteriormente, realizar a comparação dos resultados obtidos com os valores nutricionais informados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA.

A relevância deste trabalho está profundamente alinhada com a necessidade do monitoramento das espécies químicas nos alimentos, contribuindo para a avaliação da segurança alimentar e para a prevenção de riscos. As implicações práticas dos resultados obtidos podem influenciar de maneira significativa nas metodologias de análises em amostras de peixe.

Material e Métodos

Dentre os reagentes utilizados na extração assistida por ultrassom e na digestão ácida por via úmida incluem-se o Ácido Nítrico P.A (Aldrich Chemical Co.), com pureza de 70% e Peróxido de Hidrogênio P.A (NEON Co.) com pureza de 35%. Para determinação das concentrações dos analitos a partir das absorbâncias foi aplicado o método do padrão externo, com isso foram utilizadas as soluções-padrão para AAS de Fe e Ca de 1000 mg/L (Sigma-Aldrich, Suíça), diluídas nas seguintes concentrações: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2 e 3 mg/L.

As soluções foram preparadas em vidrarias previamente descontaminadas em banho de ácido nítrico (HNO_3) 5% v.v⁻¹ por 24 horas, utilizando para posterior enxague água deionizada.

Utilizou-se amostras de peixe comercial de 3 espécies, (cavalinha e tilápia), adquiridas no comércio local do município de Jequié – BA. Todas as amostras foram submetidas há um pré-preparo, no qual houve a secagem das amostras em um liofilizador (Terroni (São Carlos, SP, Brasil), modelo LS 3000). As amostras de peixes foram liofilizadas sob vácuo de

aproximadamente 0,119 μmHg e temperatura de -46°C durante 36 horas. Em seguida, foram trituradas com grau e pistilo e peneiradas para homogeneização e aumento da superfície de contato e armazenadas em tubos tipo Falcon graduados de 15 mL com tampa de rosca (Corning) até o momento das extrações.

No procedimento de extração um equipamento de banho ultrassom (Cristófoli, Campo Mourão - PR) foi utilizado para promover as extrações. Adicionou-se cerca de 2,8 L de água à cuba do equipamento de ultrassom, na qual tubos cônicos graduados de centrifuga foram colocados, um por vez, sempre na mesma posição (no centro da cuba de ultrassom) para promover a extração. As quantidades de amostra (0,1 g), concentração de HNO_3 (5 mol/L) e tempo de ultrassom (30 min.) foram previamente estabelecidos após otimização simultânea do método com planejamento experimental Doehlert.

A extração foi realizada em três espécies de peixe (cavalinha e tilápia). Todo procedimento foi realizado em triplicata, as amostras foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU/MARTE ANALÍTICA - MODELO ATX-224R) mediu-se aproximadamente 0,1 g e adicionou aos tubos cônicos. Em seguida, foram adicionados entre 1490 μL de solução extratora (HNO_3) e 3510 μL de água deionizada formando uma solução de 5 mol/L, os tubos foram submetidos a um banho de ultrassom à 30 minutos a uma temperatura de 25°C . Após, os tubos foram retirados do banho ultrassônico e filtrados com auxílio de um papel filtro C41(Unifil) e os filtrados foram avolumados em tubos tipo Falcon em 10 mL e utilizados para quantificação de Fe e Ca através da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200).

Para a digestão ácida das amostras por via úmida, aproximadamente 0,1 g de amostra foram pesados e transferidos para tubos de Kjeldahl. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2 . As amostras foram aquecidas em um bloco digestor, inicialmente a 25°C e depois a temperatura foi aumentada e estabilizada em 110°C por 2 horas. Após o processo de digestão, as soluções resultantes foram diluídas até 10 mL em tubos tipo falcon com água deionizada, para posterior análise. A quantificação de Fe e Ca foi feita por espectrometria de absorção atômica com chama, o método do padrão externo foi aplicado com soluções padrões desses metais com concentrações variando entre 0 e 3mg/L.

As análises foram feitas em triplicata e as amostras em branco, contendo todos os reagentes exceto a amostra, foram analisadas paralelamente para identificar possíveis contaminações nos reagentes ou no procedimento.

Resultados e Discussão

Para otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom, o planejamento Doehlert foi aplicado para otimizar a extração dos dois metais, simultaneamente, no qual treze experimentos foram realizados, onde o ponto central, sétimo experimento foi feito em triplicata. Três fatores foram estudados: a influência do tempo de extração, concentração de HNO_3 e massa da amostra no processo de extração. [8, 9, 10]

O modelo quadrático ajustado foi usado para prever a resposta global, baseada na função de desejabilidade possibilitando obter a superfície de resposta apresentada na Figura 1 e os perfis de desejabilidade individuais para cada analito na Figura 2. Devido às características da

matriz Doehlert, as variáveis concentração de ácido nítrico e tempo de extração e massa da amostra foram estudadas em cinco, cinco e três níveis, respectivamente. Na etapa de otimização utilizou-se um mix contendo as duas amostras de peixe (cavalinha e tilápia) de modo a obter-se uma melhor representatividade das amostras estudadas. [8, 9, 10]

Figura 1. Superfícies de resposta obtida após o ajuste de uma função quadrática à desejabilidade global.

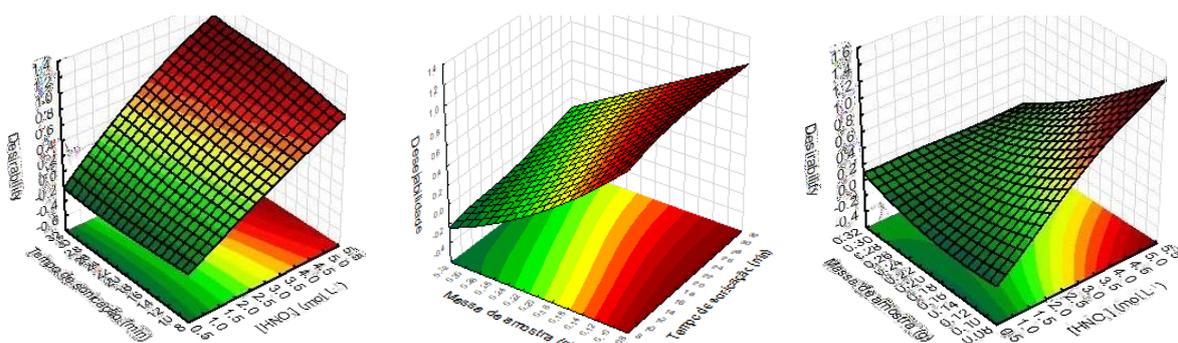
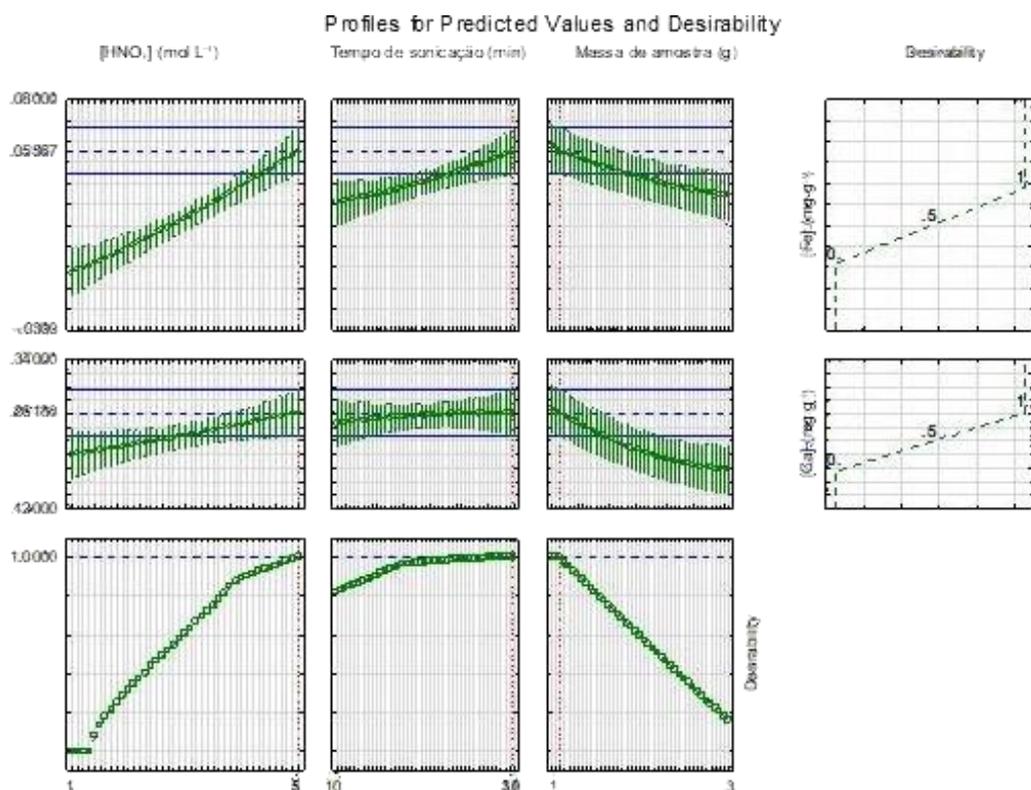


Figura 2. Perfis das desejabilidades individuais para Fe e Ca perfil de desejabilidade global.



A concentração do ácido extrator foi otimizada através da avaliação do efeito de soluções extratoras com concentrações de HNO₃ entre 1,0 e 5,0 mol/L, sobre a extração de Fe, e Ca em um mix de dois peixes. As soluções extratoras com concentrações de HNO₃ entre 4 e 5 mol/L proporcionaram uma melhora na extração dos analitos de forma simultânea, verificada através do aumento da concentração obtida para todos os elementos na amostra. Conforme utiliza-se soluções de concentrações maiores que 6 mol/L de ácido extrator resulta na supressão do sinal analítico devido ao elevado teor de ácido na solução. Isso pode ocorrer porque altas

concentrações de ácido podem alterar as propriedades físico-químicas da amostra, ocasionando interferências.

O tempo de extração, ou seja, tempo em que a amostra foi submetida à ação do ultrassom, é outro parâmetro fundamental que deve ser otimizado, nesse caso a eficiência de extração dos analitos foi avaliada com tempos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de ação do ultrassom. Com isso, os resultados obtidos para o tempo de extração mostram que uma fração de Fe e Ca pode ser extraída. Com isso, os resultados demonstraram que as condições ótimas para o tempo de sonicação de 30 minutos, concentração de HNO₃ de 5 mol/L e massa da amostra de 0,1 g uma maior eficiência na extração dos analitos, uma vez que nessas condições foram obtidas concentrações médias de Fe e Ca relativamente superiores as outras regiões estudadas. A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental com projeção sob face quadrada para a otimização das variáveis do método descritas anteriormente.

Tabela 1. Matriz do planejamento Doehlert para otimização da concentração do ácido e tempo de sonicação em procedimento de extração de metais assistida por ultrassom.

Exp	Variáveis Independentes			Absorbâncias encontradas	
	[HNO ₃] (mol/L)	Tempo de extração (min)	Massa da amostra (g)	Fe Abs.	Ca Abs.
1	3,0	30	0,2	0,0342	0,3525
2	2,0	25	0,1	0	0,2112
3	2,0	25	0,3	0,0135	0,5105
4	4,0	25	0,1	0,0404	0,2523
5	4,0	25	0,3	0,0659	0,528
6	1,0	20	0,2	0	0,3808
7	3,0	20	0,2	0,0549	0,3639
8	5,0	20	0,2	0	0,3573
9	2,0	15	0,1	0,0044	0,211
10	2,0	15	0,3	0,0253	0,499
11	4,0	15	0,1	0,0566	0,2439
12	4,0	15	0,3	0,0176	0,5019
13	3,0	10	0,2	0,0549	0,3621

Absorbância - Abs. Valores obtidos via FAAS.

Com base nos resultados obtidos na otimização, os parâmetros de mérito limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) foram determinados para o método proposto. Os valores de LOD e LOQ para o método foram obtidos considerando todas as etapas envolvidas na metodologia proposta e expressos na mesma unidade de concentração dos analitos nas amostras.

Para as análises de Fe e Ca os valores LOD e LOQ obtidos foram 5,111 µg/g e 15,488 µg/g e 54,145 µg/g, 173,169 µg/g, respectivamente. Tais valores são adequados para análise desses elementos em amostras de peixe. A precisão foi avaliada em função do RSD, sendo que os valores obtidos foram 27,72% para Fe e 28,94% para Ca. Assim, o método proposto

apresentou parâmetros de méritos adequados para a determinação da concentração de Fe e Ca em amostras peixe.

Tabela 2. Parâmetros de validação para o método de solubilização ácida com HNO₃ proposto.

Analito	Fe	Ca
LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5,111	57,145
LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15,488	173,169
RSD (%)	27,72	28,94

A verificação da exatidão do método proposto, utilizando extração assistida por ultrassom, foi realizada através da comparação dos resultados obtidos com as concentrações dos elementos obtidas utilizando a digestão ácida por via úmida, procedimento frequentemente utilizado para o preparo de amostras de alimentos para análise de metais. A comparação dos resultados obtidos utilizando extração assistida por ultrassom e por digestão ácida por via úmida, para 2 amostras de peixes de distintos está apresentada na Tabela 3.

Considerando um nível de significância de 5%, utilizando o teste *t* pareado de Student unidirecional para comparação de duas médias experimentais, verificou-se que em ambas as amostras de peixe para os elementos Fe e Ca não diferem estatisticamente, aceitando então a hipótese de que as médias dos resultados obtidos por digestão ácida através da via úmida são equivalentes às obtidas através da extração assistida por ultrassom, demonstrando a exatidão do método proposto. Foram determinados os valores de *t* calculado e comparou-se com o valor crítico da distribuição estatística. Os valores de *t* para Fe e Ca respectivamente são: $\pm 2,655$ e $\pm 3,298$. O valor crítico da distribuição *t* para um nível de 5% de significância (95% de confiança) é aproximadamente $\pm 6,314$.

Com base no teste *t* pareado e nos dados obtidos, não há evidência estatística suficiente para afirmar que existe uma diferença significativa entre os dois métodos (método desenvolvido e método existente) em um nível de confiança de 95%, para quantificação de Fe e Ca, com isso a hipótese nula é aceita.

O método proposto foi aplicado para a determinação da concentração de Fe e Ca em duas amostras de peixe, obtidas no comércio local do município de Jequié-BA, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Considerando as amostras analisadas, todas obtiveram êxito na quantificação dos analitos, pois as concentrações encontradas estavam acima do LOQ estabelecido para o método. Os resultados obtidos para as amostras analisadas foram posteriormente comparados com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA.

Tabela 3. Concentração de Fe e Ca em amostras de peixe obtidas por extração assistida por ultrassom e digestão por via úmida.

Extração Assistida por UI	
Amostra	
Cavalinha	
Tilápia	

Digestão Ácida µg/	
Amostra	
Cavalinha	
Tilápia	

Os dados expressos na Tabela 4 representam as concentrações de Fe e Ca em cada espécie de peixe estudado, com uma massa de aproximadamente de 0,1 g. Com isso, comparou-se as concentrações obtidas com base na extração assistida por ultrassom, onde para Fe e Ca ambas as amostras possuem uma concentração superior a estimada pela TBCA.

Tabela 4. Concentrações estabelecidas pela tabela TBCA para 0,1 gramas de amostras.

Amostra	Fe (µg/g)	Ca (µg/g)
Cavalinha	8,5	149
Tilápia	5,6	100

Conclusões

O método proposto para determinação de Fe e Ca em amostras de peixes, utilizando a extração assistida por ultrassom e concentrações baixas de ácido extrator, mostrou-se simples e preciso. Uma das principais vantagens do método é o tempo reduzido de análise, resultado da simplicidade e eficiência do procedimento experimental envolvido para o tratamento da amostra e determinação dos analitos.

Ambas as espécies de peixe que foram analisados apresentaram diferenças quanto aos constituintes de sua formulação. Ainda pode-se destacar que nas amostras analisadas as concentrações de Fe e Ca obtidas foram acima do especificado pela tabela TBCA. Assim, o controle de qualidade adequado e que apresente resultados precisos quanto à concentração de metais é de extrema importância, já que muitas dietas são elaboradas com base nos valores informados nos rótulos dos produtos e das tabelas de referências.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES, CNPq, FAPESB pelo suporte e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho.

Referências

[1] Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)/NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl.- Campinas: NEPA-UNICAMP, p. 161, 2011.



- [2] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 6.0. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca/>.
- [3] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.
- [4] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (Ed.). Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2. ed. São Paulo: Edit SBQ, 2017.
- [5] MARCHIONI, D. M. L.; SLATER, B.; FISBERG, R. M. Aplicação das Dietary Reference Intakes na avaliação da ingestão de nutrientes para indivíduos. Rev. Nutr. Campinas. v. 17, p. 207-216, 2004.
- [6] INHEIRO, D. M. PORTO, K. R. A. MENEZES, M. E. S. A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais. Maceió: EDUFAL, 2005.
- [7] ORESTE, Eliézer Quadro; SOUZA, Alexander Ossanes de; PEREIRA, Camila Corrêa; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Decomposição ácida assistida por ultrassom para a determinação de Cu, Fe, Mg e Zn por F AAS em cerâmicas de uso doméstico. Fev. 2017.
- [8] ROY, Choudhury S. A rare cause of chronic heart failure. British Medical Journal (BMJ), 2023. Disponível em: <https://casereports.bmj.com/content/16/6/e253697>. Acesso em: 11 set. 2024.
- [9] ISLAM, Md Salehuddin; SARWAR, Sayedur Rahman. Zinc deficiency: An emerging health problem in children. Tropical Pediatrics, v. 55, n. 5, p. 324-329, 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/tropej/article/55/5/324/1676829>. Acesso em: 11 set. 2024.
- [10] CERQUEIRA, U. M. F. M.; BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; ARAÚJO, R. J.; SILVA, B. N.; NOVAES, C. G. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. Food Chemistry, v. 364, p. 130429, 1 dez. 2021.
- [11] SILVA, J. A.; SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, R. S.; LIMA, A. C. Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. Microchemical Journal, Amsterdam, v. 154, p. 104-110, jan. 2020.
- [12] BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. dos; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. da M.; ALVES, J. P. dos S. Otimização simultânea de múltiplas respostas e sua aplicação em Química Analítica – Uma revisão. Talanta, v. 194, p. 941-959, 1 mar. 2019.
- [13] BENDICHO, C.; LAVILLA, I. ‘**Ultrasound-assisted metal extractions**’. Ultrasonics Sonochemistry, Vigo, v. 11, n. 3-4, p. 261-266, mar. 2004.