

DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO BIOACESSÍVEL DE Cu, Mn, Pb E Zn EM AMOSTRAS DE MIRTILO E MORANGO POR MIP OES

ADRIANA IVEN HELING¹; CAMILA CORRÊA PERREIRA²; ALEXANDER OSSANES DE SOUZA²; ANDERSON SCHWINGEL RIBEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – adrianaih@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – camila.cpereira@hotmail.com – alexander.souza@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – andersonsr@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um elevado consumo de frutas em seu mercado interno e destaca-se como um dos maiores produtores mundiais. Esse consumo elevado está relacionado com a importância nutricional atribuída as frutas, pois elas fornecem vitaminas, minerais, compostos fenólicos, além de compostos antioxidantes que auxiliam em uma dieta saudável. No entanto, devido à aceleração do desenvolvimento de áreas urbanas, utilização de fertilizantes e agrotóxicos para aumentar a produção, ocorre um acumulo de minerais no solo, fazendo com que essas plantas possam absorver e incorporar ao fruto uma concentração elevada de elementos essenciais e potencialmente tóxicos disponíveis (HUA et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Diante disso, é necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação da concentração total dos elementos. No entanto, esta concentração não indica a verdadeira informação nutricional estabelecida para uma dieta saudável, pois a quantidade total de nutrientes ingerido não é completamente absorvida pelo organismo. Desta forma, estudos de bioacessibilidade determinam a concentração dos analitos liberados no organismo, por meio da interação dos analitos com a simulação do sistema digestório humano, uma vez que a concentração liberada no trato gastrointestinal torna-se disponível para absorção do epitélio intestinal (MINEKUS et al., 2014; PEREIRA et al., 2016).

Considerando a importância da determinação de metais nas amostras de mirtilo e morango, o presente estudo tem como objetivo a determinação da concentração total e bioacessível de Cd, Cu, Mn, Pb e Zn por MIP OES utilizando sistema *multimode* para a introdução da amostra.

2. METODOLOGIA

Amostras de morango fornecidas pela Embrapa Clima Temperado – RS e amostras de mirtilo fornecidas por produtor local (Pelotas, RS) foram utilizadas para o desenvolvimento do método. Para a decomposição ácida das amostras de mirtilo e morango foram pesadas 2,5 e 5,0 g respectivamente, diretamente nos tubos digestores e adicionado 5,0 mL de HNO₃ concentrado. Logo após, foram acoplados aos tubos um sistema de refluxo (com recirculação de água a 15 °C) e a mistura foi colocada no bloco digestor aquecido a 200 °C por 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1,0 mL de H₂O₂ e as soluções retornaram ao aquecimento por mais 1 h no bloco a 150 °C. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, a solução resultante foi transferida para frascos volumétricos e o volume completado a 20 mL com água desionizada.

A exatidão do método, para concentração total, foi verificada utilizando a técnica de adição de analito em três níveis de concentrações (mirtilo: 0,8; 1,6; 2,4 mg kg⁻¹ para Cd, Cu e Pb; e 12; 24; 36 mg kg⁻¹ para Mn e Zn; morango: 0,4; 0,8; 1,2 mg kg⁻¹ para Cd, Cu e Pb; e 6; 12; 18 mg kg⁻¹ para Mn e Zn).

Para as determinações multielementares, foi utilizado um MIP OES da Agilent Technologies, equipado com uma câmara de introdução de amostra *multimode* (MS/S), que alia a geração química de vapor e a nebulização pneumática de soluções líquida para a introdução da amostra no plasma. Para a geração química de vapor da concentração total, foram utilizadas soluções de NaBH₄ 0,5 % (m/v) estabilizada em meio de NaOH 0,5 % (m/v) e nas amostras foram adicionadas antes das leituras HCl para um concentração final de 2 % (v/v).

Para estudos de bioacessibilidade, o procedimento foi adaptado de Minekus et al. (2014) (PEREIRA et al., 2017). O método consiste na simulação do sistema digestivo humano, considerando três etapas: boca, estômago e intestino, para as quais são utilizados fluidos sintéticos.

Para o desenvolvimento dos estudos da fração bioacessível, primeiramente pesou-se aproximadamente 5,0 g de morango e mirtilo. Na primeira etapa foram adicionados 4,0 mL de saliva e 1,0 mL de CaCl₂ 7,5 mmol L⁻¹ às amostras, o pH foi ajustado a 7,0 com adição de NaOH 1,0 mol L⁻¹, as quais foram posteriormente encaminhadas ao banho Dubnoff com agitação e aquecimento, a 37 °C, por 10 min. Já na segunda etapa foram adicionados 9,1 mL de suco gástrico, 700 µL de CaCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ e o pH final da solução foi ajustado para 3,0 com adição de HCl 1,0 mol L⁻¹, sendo novamente encaminhadas ao banho com agitação e aquecimento a 37 °C, por 2 h. Na terceira etapa adicionou-se 18,5 mL de suco intestinal, 1,35 mL de CaCl₂ 9,0 mmol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH 1,0 mol L⁻¹. As soluções resultantes foram encaminhadas ao banho com agitação e aquecimento a 37 °C, por 2 h. Ao final, as amostras foram colocadas em banho de gelo por 20 min e logo após foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min para separação da parte sólida (fração não bioacessível) e retirada do sobrenadante (fração bioacessível), que foi utilizado para a determinação dos analitos por MIP OES.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtiveram-se bons coeficientes de correlação linear para todos os analitos estudados ($R^2 > 0,99$). Os limites de detecção do método ($LD_{(m)}$) para a concentração total foram 0,089; 0,004; 0,002; 0,032; e 0,054 mg kg⁻¹ para Cd, Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente. E os limites de quantificação do método ($LQ_{(m)}$) foram 0,294; 0,013; 0,008; 0,106 e 0,178 mg kg⁻¹ para Cd, Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente.

A metodologia foi validada utilizando a técnica de adição de analitos que apresentaram boas recuperações, na faixa de 90 a 120% para mirtilo e 80 a 111% para morango, para todos os analitos estudados. Para o Cd, as concentrações foram inferiores ao $LD_{(m)}$ em todas as amostras avaliadas. Os resultados das concentrações totais nas amostras estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração total para as amostras de morango e mirtilo. Resultados expressos em mg kg^{-1} . (n=3)

Analito	Concentração, $x \pm \text{SD}$				
	Morango 1	Morango 2	Morango 3	Morango 4	Mirtilo
Cu	0,311 \pm 0,014	0,376 \pm 0,014	0,207 \pm 0,009	0,386 \pm 0,017	0,466 \pm 0,001
Mn	2,63 \pm 0,10	3,72 \pm 0,16	2,71 \pm 0,17	3,21 \pm 0,07	26,1 \pm 0,4
Pb	0,145 \pm 0,011	0,149 \pm 0,006	< LD _(m)	< LQ _(m)	0,290 \pm 0,005
Zn	1,81 \pm 0,19	1,54 \pm 0,04	1,40 \pm 0,04	1,80 \pm 0,05	0,656 \pm 0,023

Média \pm desvio padrão.

Para os morangos as concentrações foram próximas entre si, porém para Pb as amostras 3 e 4 apresentaram concentrações abaixo do LD_(m) e LQ_(m). Já o mirtilo, para os analitos Cu, Mn e Pb, apresentou valores de concentração superioresque os morangos.

Além da determinação da concentração total dos analitos, também é de extrema importância à avaliação da fração bioacessível, que consiste na determinação de analitos que serão liberados para posterior absorção pelo organismo. Os LD_(m) para a concentração bioacessível foram 0,019; 0,009; 0,047 e 0,050mg kg^{-1} para Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente. Os resultados da Tabela 2 são referentes à concentração bioacessível, referente à fração líquida.

Tabela 2 – Resultados das concentrações bioacessíveis das amostras de morango e mirtilo obtidos por MIP OES. Resultados expressos em mg kg^{-1} . (n=3)

Analito	Mirtilo, $x \pm \text{SD}$		Morango1, $x \pm \text{SD}$	
	[Bioacessível]	%	[Bioacessível]	%
Cu	0,205 \pm 0,013	44	< LD _(m)	-
Mn	16,3 \pm 0,27	62	0,952 \pm 0,073	36
Pb	< LD _(m)	-	< LD _(m)	-
Zn	< LD _(m)	-	0,441 \pm 0,018	26,8

%. Porcentagem bioacessível.

Os valores das porcentagens expressos, para cada fração, são em relação à concentração total, assim é possível observar quanto de cada elemento está sendo liberado.

Considerando o limite recomendado de ingestão diária para Cu, Mn e Zn as concentrações são: 0,86; 2; e 9 mg, respectivamente (PEREIRA et al. 2016). Para Pb o limite recomendado de ingestão diária é de 0,1 mg Kg^{-1} o qual foi estabelecido pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2016). Relacionando as concentrações determinadas com o consumo recomendado pela FAO/WHO (FAO, 2015), que é de 100 g de frutas e legumes, as concentrações bioacessíveis ficaram abaixo do limite de ingestão recomendado.

Com os resultados é possível observar que existe uma variação na porcentagem bioacessível, somente Mn obteve-se resultados para ambas as amostras. Para Cu, apenas no mirtilo foi encontrada fração bioacessível. Para Zn, apenas no morango foi encontrada fração bioacessível. Além disso, para o Pb as amostras apresentaram valores de concentração total, mas não existe bioacessibilidade para esse analito, não demonstrando riscos de contaminação para o ser humano. Para Cd a concentração bioacessível foi inferior ao LD_(m), como observado na concentração total. A precisão, expressa como o desvio-padrão relativo (RSD, %) foi verificado, e os valores foram inferiores a 5 %, em média.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, o método proposto de decomposição ácida com sistema de refluxo para determinação de Cd, Cu, Mn, Pb e Zn mostrou-se adequado para quantificação da concentração total desses analitos. As concentrações bioacessíveis encontradas nas amostras ficaram abaixo dos limites de ingestão diária recomendada, sendo assim, é possível observar que as amostras são complementares para uma dieta ideal, já que para alguns elementos essenciais são bioacessíveis, além disso, Cd e Pb, são considerados potencialmente tóxicos, não se mostraram bioacessíveis nessas frutas, não colocando em riscos a saúde do consumidor. No entanto, não deve ser descartada a necessidade de controle dos analitos nas amostras de frutas, já que esses e outros elementos podem se tornar um risco à saúde do consumidor se sua concentração extrapolar os limites máximos permitidos de consumo diário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation nº 1881/2016. **Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. Brussels: Official Journal of the European Union.

HUA, Z.; ZHEN-YU, W.; XIN, Y.; HAI-TIAN, Z.; YING-CHUN, Z.; AI-JUN, D.; JING, J.; JING, W. Determination of free amino acids and 18 elements in freeze-dried strawberry and blueberry fruit using an Amino Acid Analyzer and ICP-MS with micro-wave digestion. **Food Chemistry**, v.147, p.189–194, 2014.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; et al. A standardized static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v.5, p.1113-1124, 2014.

OECD/FAO (Organization for Economic Co-operation and Development/Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2015. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**. OECD Publishing, Paris, France.

PEREIRA, C.C.; SILVA, N.E.; SOUZA, O.A.; VIEIRA, A.M.; RIBEIRO, S.A.; CADORE, S.; Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blueberries and strawberries. **Journal of Food Composition and Analysis**, *In press*, 2017.

SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.; da SILVA, T.L.; OLIVEIRA, L.C.L.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v.156, p.362–368, 2014.