

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

ADRIANA IVEN HELING<sup>1</sup>; CAMILA CORRÊA PERREIRA<sup>2</sup>; ALEXANDER OSSANES DE SOUZA<sup>2</sup>; ANDERSON SCHWINGEL RIBEIRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – [adrianaih@hotmail.com](mailto:adrianaih@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – [camila.cpereira@hotmail.com](mailto:camila.cpereira@hotmail.com) – [alexander.souza@hotmail.com](mailto:alexander.souza@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, LabMeQui/CCQFA – [andersonsr@pq.cnpq.br](mailto: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 acúmulo 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 HNO<sub>3</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> para Cd, Cu e Pb; e 12; 24; 36 mg kg<sup>-1</sup> para Mn e Zn; morango: 0,4; 0,8; 1,2 mg kg<sup>-1</sup> para Cd, Cu e Pb; e 6; 12; 18 mg kg<sup>-1</sup> 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* (MSIS), 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 NaBH<sub>4</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> 7,5 mmol L<sup>-1</sup> às amostras, o pH foi ajustado a 7,0 com adição de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>, 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 CaCl<sub>2</sub> 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e o pH final da solução foi ajustado para 3,0 com adição de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, 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 CaCl<sub>2</sub> 9,0 mmol L<sup>-1</sup> e o pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 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<sub>(m)</sub>) para a concentração total foram 0,089; 0,004; 0,002; 0,032; e 0,054 mg kg<sup>-1</sup> para Cd, Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente. E os limites de quantificação do método (LQ<sub>(m)</sub>) foram 0,294; 0,013; 0,008; 0,106 e 0,178 mg kg<sup>-1</sup> 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<sub>(m)</sub> 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  $\text{mg kg}^{-1}$ . (n=3)

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

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  $\text{LD}_{(m)}$  e  $\text{LQ}_{(m)}$ . Já o mirtilo, para os analitos Cu, Mn e Pb, apresentou valores de concentração superiores que os morangos.

Além da determinação da concentração total dos analitos, também é de extrema importância a avaliação da fração bioacessível, que consiste na determinação de analitos que serão liberados para posterior absorção pelo organismo. Os  $\text{LD}_{(m)}$  para a concentração bioacessível foram 0,019; 0,009; 0,047 e  $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$  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  $\text{mg kg}^{-1}$ . (n=3)

Mirtilo, $\bar{x} \pm \text{SD}$			Morango 1, $\bar{x} \pm \text{SD}$	
Analito	[Bioacessível]	%	[Bioacessível]	%
<b>Cu</b>	$0,205 \pm 0,013$	44	$< \text{LD}_{(m)}$	-
<b>Mn</b>	$16,3 \pm 0,27$	62	$0,952 \pm 0,073$	36
<b>Pb</b>	$< \text{LD}_{(m)}$	-	$< \text{LD}_{(m)}$	-
<b>Zn</b>	$< \text{LD}_{(m)}$	-	$0,441 \pm 0,018$	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  $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$  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  $\text{LD}_{(m)}$ , 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 a 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.