

DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO (II) EM AMOSTRAS DE PEIXES ATRAVÉS DA COLORIMETRIA DE IMAGEM DIGITAL APÓS EXTRAÇÃO ULTRASSÔNICA: UMA ABORDAGEM RÁPIDA E SUSTENTÁVEL

Eduarda V. Cunha¹; Marcella P. D. Girolamo¹; Mateus F. Silva¹; Geovane S. Oliveira¹; Luis F. S. Aguiar¹; Juliene A. C. Teixeira¹; Sulene A. Araújo¹; Marcos A. Bezerra¹;

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

E-mail: valois.contato@gmail.com

Palavras-Chave: Photometrix, Segurança alimentar, Energia Ultrassônica

Introdução

Avanços científicos e tecnológicos vêm impulsionando uma reformulação profunda nas metodologias de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos, com destaque para a quantificação de minerais essenciais. No Brasil, as Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos (TACO e TBCA), alinhadas às diretrizes da Food and Agriculture Organization (FAO) e às normas da Anvisa, constituem instrumentos imprescindíveis para orientar o monitoramento do consumo diário de nutrientes e a formulação de políticas de segurança alimentar. Ainda assim, alimentos de matriz mais complexa, como as diferentes espécies de peixes, apresentam lacunas significativas nos dados disponíveis, demandando o desenvolvimento e a aplicação de técnicas analíticas mais sensíveis e refinadas para assegurar a precisão na determinação de seus constituintes nutricionais. [1, 2]

Entre os metais presentes nos peixes, destaca-se o cálcio (Ca^{2+}), elemento fundamental para a saúde óssea, coagulação sanguínea e funções neuromusculares. A deficiência de cálcio está associada a doenças como osteoporose e raquitismo, enquanto o excesso pode causar efeitos adversos à saúde. A Resolução RDC nº 269 da Anvisa estabelece a ingestão diária recomendada de 1000 mg para adultos e 500 mg para crianças, porém estudos indicam que a ingestão média ainda se encontra abaixo dos valores recomendados, evidenciando a importância de monitorar esse mineral em diferentes fontes alimentares. [3, 4]

Dentre os diversos alimentos que os seres humanos ingerem diariamente, os peixes representam uma fonte relevante de minerais na dieta, mas são suscetíveis ao acúmulo de elementos oriundos da poluição ambiental, o que reforça a necessidade de métodos eficientes de controle e quantificação. [5, 6]

A extração assistida por ultrassom vem se destacando como uma técnica alternativa a metodologias já estabelecidas, como a digestão ácida, sendo moderna e sustentável para o preparo de amostras. Baseada 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. Essa metodologia oferece vantagens significativas como rapidez, baixo consumo de reagentes, eficiência na liberação dos analitos e simplicidade operacional, minimizando a degradação de componentes voláteis e eliminando a necessidade de condições extremas de temperatura e pressão. [7, 8, 9]

Em paralelo a esses avanços, a utilização de tecnologias digitais tem ampliado as possibilidades da química analítica. Dentre essas inovações, a análise colorimétrica por imagem digital tem se consolidado como uma alternativa promissora aos métodos instrumentais tradicionais. O aplicativo PhotoMetrixPRO, por exemplo, permite a captura e o processamento de imagens por meio de modelos matemáticos, possibilitando a quantificação de substâncias com simplicidade, baixo custo e boa confiabilidade. Inicialmente aplicado na determinação de ferro, flúor e etanol em diferentes matrizes, seu uso tem sido expandido para outras aplicações, incluindo a quantificação de íons cálcio em tecidos biológicos utilizando murexida como reagente complexante. Esse reagente forma um complexo estável e colorido com o Ca^{2+} , cuja intensidade pode ser quantificada por meio da análise digital da imagem da solução. [7, 10]

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e aplicar uma metodologia rápida e sustentável para a quantificação de Ca^{2+} em amostras de peixe, combinando a extração assistida por ultrassom, como preparo da amostra, ao uso da colorimetria digital com o aplicativo PhotoMetrixPRO. Aplicou-se para o preparo das amostras a metodologia otimizada por Oliveira et al. [11], onde aplicaram o planejamento experimental Doehlert com o objetivo de otimizar três variáveis primordiais para o método: tempo de extração, massa da amostra de peixe e concentração do ácido extrator. [12]

Após o procedimento de extração, houve o ajuste do pH com NaOH para favorecer a complexação do cálcio com murexida. Segundo Grudpan et al. [13], após inserção do reagente complexante e do tampão etilenodiamina:etilenodiamina-HCl 1 mol L⁻¹, pH 11 (en/en-HCl) há a estabilização do pH em 11, indicando que a etilenodiamina serve como agente mascarante de interferentes na determinação de Ca^{2+} com murexida. Após a série de preparos as amostras foram analisadas por meio da imagem digital, sendo obtidas concentrações entre 319,30 µg/g e 562,07 µg/g. Aplicou-se o método estudado para a determinação desses elementos nas cinco amostras distintas de peixe. Posteriormente, realizou-se a comparação dos resultados obtidos com os valores nutricionais informados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA. [13]

A relevância deste estudo está relacionada à busca por alternativas analíticas mais simples, acessíveis e ambientalmente amigáveis, que possam ser aplicadas no monitoramento da composição mineral de alimentos. Os resultados aqui apresentados podem contribuir significativamente para o aprimoramento das metodologias de análise nutricional, especialmente em matrizes de origem animal, além de fornecer subsídios para o controle da qualidade e da segurança alimentar em diferentes contextos.

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 dosagem de 65% e Peróxido de Hidrogênio P.A (NEON Co.) com dosagem 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 de Ca nas concentrações: 1, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹ a partir da diluição de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Suíça).

As soluções foram preparadas em vidrarias previamente descontaminadas em banho de ácido nítrico (HNO_3) 5% v/v por 24 horas, e posteriormente enxaguadas usando-se água deionizada.

Analisou-se amostras de três espécies de peixes comercial, (panga, congro e merluza), 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 (Global Plast - China) de 50 mL com tampa de rosca 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 de vidro 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 (4 mg L^{-1}) e tempo de ultrassom (30 min.) foram previamente estabelecidos após otimização simultânea do método com planejamento experimental Doehlert [11].

Todo procedimento foi realizado em triplicata. As amostras foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU/MARTE ANALÍTICA - MODELO ATX-224R) pesando-se aproximadamente 0,1 g em tubos cônicos. Em seguida, foram adicionados 1,28 mL de solução extratora (HNO_3) e 3,72 mL de água deionizada formando uma solução de 4 mol L^{-1} , 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 JP41 – Faixa Preta (Quantz, São José dos Pinhais - PR) e os filtrados foram avolumados em tubos tipo Falcon em 10 mL e utilizados para quantificação de Ca^{2+} através da técnica de colorimetria por imagem digital

Para a digestão ácida das amostras por via úmida visando a comparação dos resultados, aproximadamente 0,1 g de amostra foram pesados e transferidos para tubos de Kjeldahl. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de HNO_3 concentrado 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 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 5 mg L^{-1} .

Após os procedimentos de preparo de amostras, adicionou-se 10 mL de NaOH (VETEC Co.) 2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ a uma alíquota de 5 mL da amostra com a intenção de elevar o pH do meio para 11/12, promovendo estabilidade para o complexo Ca^{2+} -Murexida (SYNTH CO.). Na sequência adicionou-se a solução tampão etilenodiamina:etilenodiamina-HCl 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ para manter o pH alcalino e promover o sistema de mascaramento, melhorando a seletividade e precisão na determinação colorimétrica via PhotoMetrixPRO.

A captura das imagens das amostras e análise pelo aplicativo PhotoMetrix foi efetuada em tubos de ensaio de 15 mL. Para a captura das amostras, foi construído um dispositivo em MDF, revestido com chapa branca e totalmente fechada para minimizar a interferência da luz ambiente. O compartimento interno foi forrado com MDF branco e como fonte de iluminação foi utilizada uma lâmpada LED branca, posicionadas na parte de baixo da caixa.

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 advindas dos reagentes ou do procedimento.

Resultados e Discussão

A determinação quantitativa de íons cálcio foi realizada empregando o método colorimétrico, na qual a intensidade da coloração depende da concentração do respectivo metal. Neste trabalho, analisou-se três amostras de espécies distintas de peixes (peixe panga, peixe congro, e merluza) após extração ácida assistida por ultrassom (Figura 1), utilizando os seguintes parâmetros: 0,1 g de amostra, 5 mL da solução de HNO_3 4 mol L⁻¹ e 30 minutos de extração.

Figura 1. Amostra de peixe submetida à extração assistida por ultrassom



Após a extração do cálcio ser realizada, as amostras foram filtradas e avolumadas para 10 mL. Alíquotas de 5 mL das amostras foram submetidas ao aumento do pH para 11, posteriormente adicionou-se 1 mL do tampão en/en-HCl e 1 mL da solução complexante murexida. O uso do tampão en/en-HCl, além de manter o pH constante, é importante para mascarar interferências. Embora o complexo Ca-murexida se forme normalmente e os complexos de outros metais absorvam pouca radiação, em presença da etilenodiamina, íons como Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} preferem se ligar a entinolamina, deixando a murexida livre para reagir quase exclusivamente com o Ca^{2+} . Esse comportamento torna o tampão en:en-HCl um excelente sistema de mascaramento, melhorando a seletividade e precisão colorimetria por imagem digital para determinação de cálcio.

Por se tratar de uma solução colorida, a análise foi baseada nos fundamentos da espectrofotometria de absorção molecular, mas ao invés de empregar equipamentos clássicos,

como o espectrofotômetro UV-VIS, a detecção foi realizada através do emprego do aplicativo PhotoMetrixPRO com o auxílio de um aparelho celular Samsung (modelo A34) com câmera que possui uma resolução de 48 megapixels. A amostra foi colocada em um tubo de ensaio dentro de uma caixa de MDF branca, sem aberturas e com o uso de uma lâmpada de Led acoplada na parte de baixo do dispositivo, como apresentado na Figura 2.

A curva de calibração foi construída para determinação de Ca^{2+} usando cinco soluções padrão do elemento em uma faixa de concentração de 0 a 10 mg L^{-1} (Figura 3). A Figura 4 apresenta a curva analítica obtida diretamente pelo aplicativo.

Figura 2. Caixa de MDF construída para detecção de cálcio via PhotometrixPRO.



Figura 3. Padrões de Ca^{2+} (0 a 10 mg L^{-1}), após a reação colorimétrica para obtenção da curva analítica do Ca^{2+} usando o PhotometrixPRO.

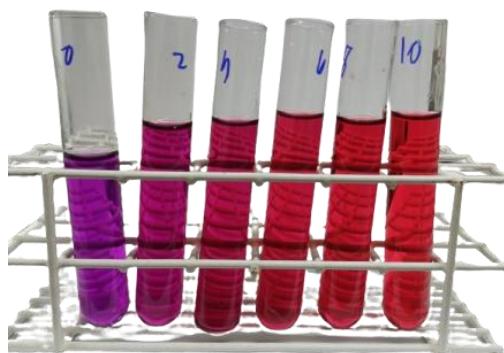
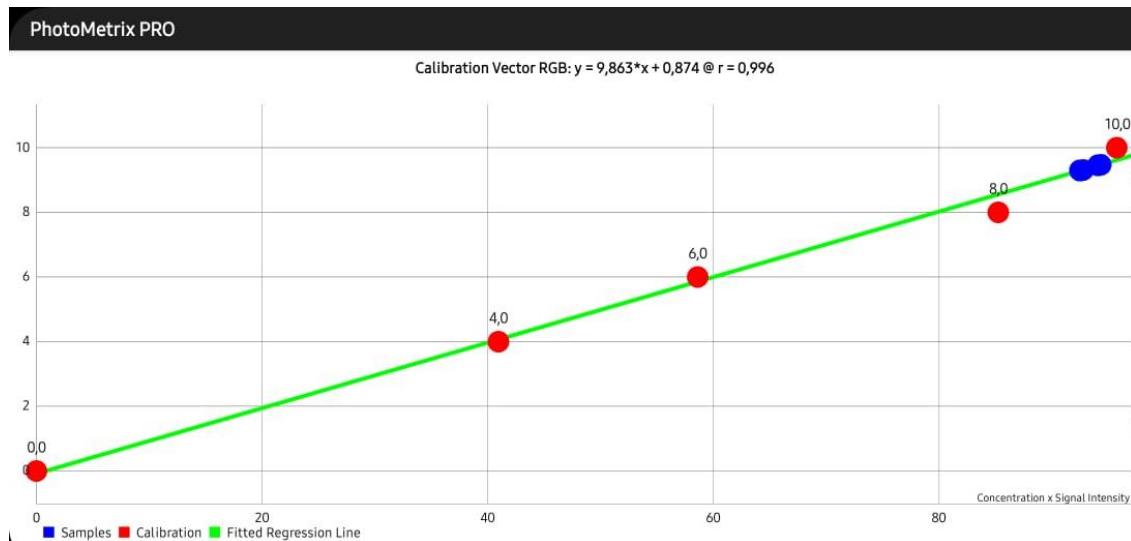


Figura 4. Curva analítica de Ca^{2+} (0 a 10 mg L^{-1}) e análise do RSD% no ponto 9 mg L^{-1} obtida através do PhotometrixPRO.



O coeficiente de determinação calculado pelo aplicativo demonstra uma boa correlação entre o sinal e a concentração, com valor de 0,996. Os valores dos LDs e LQs obtidos no PhotoMetrixPRO foi de 0,01034 e 0,02863 mg L^{-1} , respectivamente. A precisão do método foi avaliada realizando 10 leituras no ponto de 9 mg L^{-1} , a percentagem obtida foi de 0,16%.

O método proposto foi aplicado para a determinação da concentração de Ca^{2+} em cinco amostras de peixe, obtidas no comércio local do município de Jequié-BA, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1 na qual se comparou a metodologia de extração assistida por ultrassom com a digestão ácida. Considerando as amostras analisadas, obteve-se êxito na determinação de Ca^{2+} no peixe Pangá. Para os peixes Congo e Merluza, foram obtidas diferenças significativas entre a metodologia estabelecida (digestão ácida) e a proposta (extração assistida por ultrassom) demandando que mais estudos sejam realizados para se investigar estes resultados. No entanto, todas as concentrações encontradas estavam acima do LOQ estabelecido para o método.

Tabela 1. Concentração de Ca em amostras de peixe obtidas por extração assistida por ultrassom e digestão por via úmida.

Amostra	Extração Assistida por Ultrassom	Digestão Ácida
	$\text{Ca}^{2+} (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$\text{Ca}^{2+} (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
Peixe Pangá	$562,06 \pm 5,41$	$584,85 \pm 2,55$
Peixe Congo	$479,22 \pm 7,41$	$614,85 \pm 1,68$
Merluza	$319,30 \pm 4,83$	$501,61 \pm 5,65$

Extração assistida por ultrassom: Ca^{2+} , LOQ = 1,03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. média \pm desvio padrão. Digestão ácida: Ca^{2+} , LOQ = 2,01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. média \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos para as amostras analisadas foram posteriormente comparados com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA. Os dados expressos na Tabela 2 representam as concentrações de Ca^{2+} 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.

Tabela 2. Quantidade de Ca²⁺ em peixes segundo a tabela TBCA.

Amostra	Ca ²⁺ ($\mu\text{g/g}$)
Peixe Pangá	208
Peixe Congro	172
Merluza	155

Ao comparar-se os valores delimitados de Ca²⁺ apontados pela tabela TBCA com os valores obtidos a partir da metodologia desenvolvida, para os três tipos distintos de peixes, observou-se que a maioria das amostras comercializadas em Jequié-Ba apontam valores acima das quantidades estabelecidas.

Conclusões

A utilização do aplicativo PhotoMetrix aliada a extração ácida assistida por ultrassom para determinação de Ca²⁺ usando colorimetria por imagem digital com o reagente murexida mostrou ser uma metodologia promissora, sendo também uma alternativa economicamente viável e ecológica frente ao uso de espectrofotômetros e a preparos de amostras mais laboriosos. No entanto, mais estudos são necessários para garantir a exatidão pois duas das três amostras analisadas mostraram diferenças significativas entre os resultados gerados pela metodologia proposta e a adotada como padrão. A curva analítica apresentou linearidade adequada e os teores de cálcio nas amostras analisadas encontraram-se dentro da faixa linear estabelecida. Dessa forma, o aplicativo é uma ferramenta rápida, confiável, de baixo custo e acessível. Além das características mencionadas, o pequeno volume de amostras e reagentes usados para obtenção dos dados também demonstrou grande vantagem mostrando características verdes.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Química Analítica 2 da Universidade Estadual da Bahia - UESB 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] Beto JA. The role of calcium in human aging. Clin Nutr Res. 2015 Jan;4(1):1-8. doi: 10.7762/cnr.2015.4.1.1. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25713787; PMCID: PMC4337919.
- [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] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (Ed.). Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2. ed. São Paulo: Edit SBQ, 2017.

[8] 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 FAAS em cerâmicas de uso doméstico. Fev. 2017.

[9] 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.

[10] HELFER, G. A.; MAGNUS, V. S.; Böck, F. C., TEICHMANN, M. F.; FERRÃO, A. B. C. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. J. Braz. Chem. Soc., v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

[11] OLIVEIRA, G. S. BEZERRA, M. A. NUNES, L. S. ARAUJO, S. A. CONTREIRAS, J. P. SANTOS, S. O. SANTOS, J. V. R. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe e Ca em amostras de peixes via FAAS. 63. Congresso Brasileiro de Química, Salvador, BA, 05 a 08 nov. 2024. Resumo (trabalho apresentado). Disponível em: <https://www.abq.org.br/cbq/trabalhos/4/A4T25884-1726246437.pdf>.

[12] 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.

[13] GRUDPAN, K.; JAKMUNEE, J.; VANEEESORN, Y.; WATANESK, S.; MAUNG, U. A.; SOOKSAMITI, P. Flow-injection spectrophotometric determination of calcium using murexide as a color agent. Talanta, v. 46, p. 1245–1257, 1998.