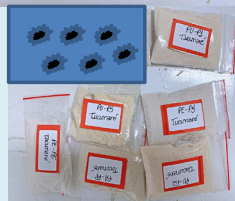
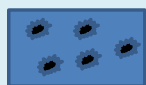
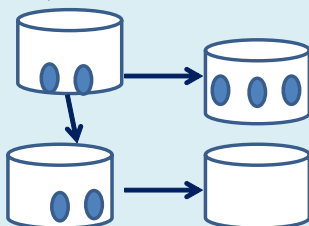




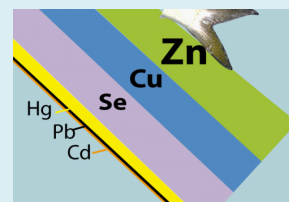
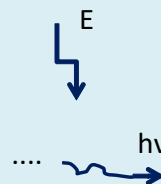
Homogeneização amostragem



Decomposição da amostra



medida



COMUNICADO  
TÉCNICO

113

São Carlos, SP  
Dezembro, 2022

**Embrapa**

## Preparo e processamento de amostras de pescado para análise de elementos traço

Carlos Alberto da Silva  
Ana Rita de Araujo Nogueira

# Preparo e processamento de amostras de pescado para análise de elementos traço<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Carlos Alberto da Silva - oceanógrafo, doutor em Geociências, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

<sup>1</sup> Ana Rita de Araujo Nogueira, química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

## Introdução

A proteína do pescado é a mais consumida mundialmente e sua carne, além de ser uma fonte de alta qualidade em aminoácidos essenciais, apresenta baixa concentração de gorduras saturadas, abundância em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, vitaminas e minerais essenciais para dieta humana (NESTEL et al., 2020). Segundo a Associação Americana do Coração (*American Health Association – AHA*), ingerir ao menos duas porções de peixe na semana pode melhorar a saúde do coração e reduzir o risco de doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (LI et al., 2020).

Por outro lado, ainda que o pescado contenha nutrientes essenciais e promova benefícios, há também uma preocupação quanto a ser uma fonte potencial de contaminantes como mercúrio, cádmio, chumbo e arsênio, prejudiciais aos seres vivos (DOMINGO et al., 2007; CASTRO-GONZÁLEZ; MÉNDEZ-ARMENTA, 2008;

FERNANDES et al., 2012). A carne do pescado pode apresentar resíduos oriundos da exposição a substâncias químicas presentes no ecossistema aquático, como resultado da contaminação ambiental, tanto por fontes naturais quanto por fontes antrópicas (USYDUS et al., 2008).

A determinação da composição inorgânica da carne do pescado com fins nutricionais (ex. ferro, zinco e manganês) ou de contaminação (cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, entre outros) é importante para a avaliação da qualidade nutricional e para a segurança alimentar, pois os contaminantes podem ser bioacumulados por diversos organismos da cadeia alimentar aquática (MALVANDI; ALAHABADI, 2019) e causar danos à saúde quando consumidos.

Os resultados fornecidos pelos laboratórios devem ser confiáveis, sendo que os maiores erros são observados

na etapa da coleta e do preparo das amostras. O preparo e o processamento das amostras de pescado descritos são considerados cruciais para a obtenção de resultados fidedignos, evitando tanto a contaminação cruzada entre amostras quanto contaminações devido ao ambiente e aos materiais utilizados durante a coleta e o preparo.

No caso de amostras sólidas, como as amostras de pescado, exceto nas análises *in situ*, as análises químicas são precedidas pela amostragem, que deve ser criteriosamente observada, pois uma pequena quantidade de material (a amostra) é selecionada para determinar a composição química de uma população muito maior. O ideal seria que a porção coletada, que será reamostrada no laboratório em porções inferiores a 1 g, tivesse a mesma composição da população que está sendo amostrada (PETERSEN; DAHL; ESBENSEN, 2004). Porém, isso nunca ocorre e as discrepâncias dão origem às incertezas na amostragem (RAMSEY; THOMPSON, 2007; KRUG; ROCHA, 2019).

Pode-se afirmar que a amostragem é um processo que consiste na seleção e remoção de uma pequena parte do todo, que seja representativa e proporcione resultados com níveis de incerteza aceitáveis para a tomada de decisão, ou seja, suficiente para cumprir o objetivo analítico (KRUG; ROCHA, 2019). A amostragem primária, a qual é tratada neste documento, requer cuidados para se evitar maiores incertezas nos resultados.

## Objetivos

Apresentar procedimentos que visam:

- Permitir o armazenamento de forma mais adequada e por período mais longo;
- Diminuir problemas relacionados à homogeneidade das amostras;
- Reduzir a dimensão da amostra;
- Facilitar o ataque dos reagentes durante o processo analítico, pela diminuição do tamanho das partículas.

## Material e Métodos

Todo o material utilizado no preparo das amostras deverá ser anotado com as seguintes características:

**Reagentes, insumos e vidrarias** (descrever as marcas utilizadas, lote e validade)

**Equipamentos** (descrever a marca e o modelo dos equipamentos utilizados no preparo das amostras)

**Equipamentos de Proteção Individual - EPIs**

Durante todos os processos deve-se enfatizar a importância do uso dos Equipamentos de Proteção Individuais (EPIs) para a proteção dos profissionais e para possível a contaminação das amostras. Os equipamentos necessários são jalecos de algodão de manga comprida, luvas de borracha nitrílicas sem amido e óculos de proteção ante embaçante incolor.

## Aspectos importantes relacionados ao preparo das amostras de pescados

Alguns cuidados devem ser observados, para garantir a integridade física e química do material coletado:

- Identificar devidamente o recipiente (sacos plásticos, potes plásticos, frascos, etc.) que receberá a amostra. Cuidado especial deve ser tomado com as amostras que serão armazenadas em baixas temperaturas. Em muitos casos, a identificação feita inicialmente torna-se ilegível durante o processo de descongelamento;
  - Garantir que as embalagens, as ferramentas e os utensílios empregados na coleta e no transporte não contaminem a amostra, principalmente em função das determinações que serão realizadas. Como exemplo, se for determinado o teor de ferro, a faca utilizada para retirar a amostra não pode ter sido confeccionada com esse elemento. Recomenda-se o uso de facas de cerâmica;
  - Documentar cada etapa da coleta:
    - especificar todas as características relevantes da área;
    - condições climáticas;
    - data da coleta
    - identificação inequívoca da espécie amostrada e/ou comprada;
- número de cadastro no SisGen, em caso de espécie nativa;
  - condições de transporte e pré-secagem;
  - no caso de amostras adquiridas em estabelecimentos comerciais, identificar os dados do estabelecimento e do fornecedor da matéria prima.
- A amostra deve ser encaminhada o mais rapidamente possível ao laboratório para que possa ser devidamente processada e armazenada;
  - As amostras devem ser armazenadas em sacos plásticos a prova de água e transferidas imediatamente para caixas térmicas com gelo (período máximo de 24 h). Caso o transporte leve mais de 24 h, a amostra deverá ser congelada em gelo seco por um período máximo de 48 h.
  - O tempo entre a coleta da amostra e a chegada ao laboratório deverá ser reportado na documentação quando da entrada no laboratório. Deve-se evitar o encaminhamento ao laboratório aos finais de semana, a menos que haja um pré-entendimento entre as partes.
  - A amostra que chegar ao laboratório sem as informações necessárias ao processamento e análise deve ser recusada. É necessário conhecer o tipo da amostra, o que deve ser determinado e quem é o responsável pela solicitação.

## Registro dos dados da coleta

- a) Nome da espécie;
- b) Localização (GPS) do local de pesca ou descrição do local de comercialização;
- c) Data e horário da coleta;
- d) Local em que foi coletado (mangue, estuário, mar, etc.);
- e) Tamanho (comprimento total, comprimento padrão);
- g) Massa total (g);
- i) Nome do responsável pela coleta;
- j) Data e horário do recebimento da amostra pelo laboratório;
- k) Nome do responsável pelo recebimento da amostra no laboratório.

## Etapas laboratoriais

### Limpeza e desmineralização

A lavagem criteriosa e cuidadosa dos materiais e vidrarias que entrarão em contato com o pescado é o primeiro passo para prevenir a contaminação com resíduos e sujeiras aderidos à superfície e demais partes dos equipamentos empregados nas etapas seguintes do processo.

Os materiais e vidrarias utilizados nos procedimentos do tratamento e conservação de amostras de pescado deverão ser previamente lavados com solução de detergente neutro a 2% v/v (Figura 1). Em seguida, para a desmineralização (descontaminação), todo o material lavado é colocado em banho de  $\text{HNO}_3$  10% v/v por 24 horas (Figura 2). Este banho deverá ser mantido fechado. A seguir o material é retirado do banho e lavado no mínimo três vezes com água ultrapura (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm).



Foto: Carlos Alberto da Silva

**Figura 1.** Lavagem com detergente neutro 2% v/v.



Foto: Carlos Alberto da Silva

**Figura 2.** Material em banho ácido ( $\text{HNO}_3$  10% v/v).

## Secagem dos materiais e vidrarias

Em seguida, os materiais e as vidrarias podem ser colocados para secar em ambiente controlado sem poeira. Alguns protocolos indicam a secagem em estufa a temperaturas baixas (40/50 °C), porém pode ocorrer contaminações provenientes do material de fabricação da estufa. O ideal é que a secagem seja feita em uma capela de fluxo laminar, que impede a contaminação do ambiente. Modelo alternativo para a secagem é apresentado na Figura 3. Construída em material polimérico (polipropileno), possui ventiladores na parte superior, sendo que o ar insuflado passa por filtros e é direcionado para a saída da capela, na parte inferior. Duas lâmpadas de infravermelho proporcionam o aumento na velocidade de secagem. Deve-se ter a precaução de secar a vidraria limpa separadamente de outros materiais (amostras ou reagentes no mesmo ambiente) para evitar a contaminação após a lavagem. Todo o material limpo e seco deverá ser mantido em bandejas plásticas recobertas com plástico filme ou dentro de sacos plásticos de polietileno estéreis até o seu uso, evitando o acúmulo de poeira e contato com outras substâncias químicas.



Foto: Carlos Alberto da Silva

**Figura 3.** Capela construída em polipropileno para a secagem do material.

## Filetagem e armazenamento inicial

### Filetagem

A conservação do pescado refrigerado ou congelado, a depender do tempo para iniciar o processamento, é importante para a manutenção e não degradação da qualidade da carne e de órgãos alvos das análises.

Deve-se tomar cuidado durante o processamento para evitar a contaminação das amostras. Schmitt; Finger (1987) demonstraram que a contaminação de amostras de carne de peixe é provável, a menos que sejam tomados os devidos cuidados, como trabalhar em local previamente limpo e com materiais descontaminados. Potenciais fontes de contaminação incluem poeira, instrumentos, utensílios, superfícies de trabalho e recipientes que podem entrar em contato com as amostras (GUIDANCE, 2000).

Inicialmente, é necessária a identificação da espécie do peixe e a medição de suas características

morfológicas como comprimento, altura e largura bem como sua massa. No caso específico de peixes, além da massa, é utilizado o comprimento total e/ou comprimento padrão. Para moluscos (ostras e mexilhões) utiliza-se a massa, altura e largura da concha. Esses procedimentos podem ser feitos com auxílio de uma balança, régua milimetrada ou paquímetro, como observado na Figura 4. Em seguida, é dado início a filetagem do músculo do peixe, o qual é cortado com o auxílio de uma faca, com fio de corte liso, no formato de pequenos cubos, para facilitar o armazenamento e o processo de liofilização (Figura 5).



**Figura 4.** Identificação das características do peixe (massa e comprimento).



**Figura 5.** Músculo do peixe filetado em formato de cubos.

## Armazenamento Inicial

Após as amostras serem devidamente filetadas é necessário armazená-las para a liofilização. A amostra é transferida para os frascos de armazenamento vazios, desmineralizados conforme descrito anteriormente, secos e identificados. Essa identificação deve conter informações referentes à amostra, provenientes da coleta, tais como tipo de organismo, identificação original e data da coleta (Figura 6). Posteriormente, cada frasco é pesado em balança analítica (sensibilidade de  $10^{-4}$  g) para que seja anotada a massa úmida (amostra com umidade natural) e armazenadas a temperaturas  $\leq -20$  °C. O período de armazenamento máximo antes da liofilização dependerá do objetivo da análise, sendo de no máximo 28 dias para a determinação de mercúrio, 6 meses para outros metais e 1 ano para contaminantes orgânicos (GUIDANCE, 2000).

## Liofilização das amostras

A liofilização é uma técnica de secagem que retira a umidade contida nos materiais sem a necessidade de aquecê-los. O princípio físico da liofilização é a sublimação, que é a passagem direta do estado sólido para o gasoso, sem a passagem pelo estado líquido. Para que o processo ocorra, a amostra é congelada e seca sob vácuo, sem ocorrer o seu descongelamento. A liofilização é recomendada para preservar as características da substância de interesse, tais como materiais termossensíveis, materiais biológicos (fungos, enzimas, tecidos, sangue, etc.), insumos farmacêuticos (antibióticos, vacinas e soros), alimentos (sucos, carnes, legumes e frutas) e produtos químicos, preservando as amostras de forma mais adequada que outras técnicas de secagem (RATTI, 2001).

Antes de se iniciar um novo processo de liofilização é importante remover toda a água do processo anterior que permaneceu no condensador de gelo e, então, fechar as válvulas de saída e de ventilação. As amostras colocadas dentro dos frascos para serem liofilizadas deve ter uma espessura máxima de 2 cm, para que sejam adequadamente liofilizadas. A seguir são congeladas em meio de nitrogênio líquido ( $-196$  °C) e levadas para o processo de liofilização. O tempo necessário para a secagem é influenciado pela espessura e características da amostra, como



percentual de umidade, composição química (lipídeos, percentual de açúcares, etc.), área superficial (amostra moída ou integral), etc., podendo levar de 48 horas até uma semana (Figura 6). Normalmente, para o tipo de amostra avaliado (tecido de peixe), a liofilização das amostras é realizada à pressão aproximada de 400  $\mu$ Hg por um período de 78 horas. Após a finalização do processo é necessário observar se o material está corretamente seco (Figura 7) e pesado novamente, para que seja anotada a massa do material seco e quantificar o teor de umidade da amostra. Em seguida, a amostra é transferida para frasco apropriado e armazenada em dessecador até que seja iniciado o procedimento de moagem e peneiramento (Figura 8).

Foto: Carlos Alberto da Silva



**Figura 6.** Amostras organizadas no liofilizador.



Foto: Carlos Alberto da Silva

**Figura 7.** Amostras secas após liofilização.



Foto: Carlos Alberto da Silva

**Figura 8.** Amostras de ostras liofilizadas e identificadas, prontas para serem moídas e peneiradas.

## Moagem e peneiramento

### Moagem

Para a moagem deve ser usado um moinho com lâminas e corpo em aço inoxidável (Figura 9A) ou, alternativamente, um processador de alimentos doméstico com potência mínima de 400 W e de fácil limpeza, lâminas em aço inoxidável e corpo plástico atóxico e com alta resistência a abrasão (Figura 9B), utilizado exclusivamente para essa finalidade. Caso a determinação de cromo ou níquel seja requerida deve-se preferir o processador, uma vez que pode ocorrer contaminação por possível abrasão do aço inoxidável. A moagem é mais efetiva se realizada com adição de nitrogênio líquido. Também são necessárias placas de Petri de vidro lavadas em banho ácido, espátulas e papel toalha branco para limpeza.

Na ausência de um processador as amostras liofilizadas podem ser trituradas em almofariz (gral) com pistilo de ágata ou porcelana, utilizado exclusivamente para trituração de tecidos biológicos. Nesse caso, para facilitar a moagem, adicionar nitrogênio líquido no almofariz juntamente com a amostra, que deve ser triturada o máximo possível (Figura 10). Após cada moagem é feita a limpeza do moinho ou processador com auxílio de pincéis de fibra sintética, jatos de ar provenientes de compressor de ar isento de óleo (Figura 11) e papel toalha branco umedecido com etanol, para limpeza de possíveis resíduos de lipídeos. Todo material deve ser limpo. Caso haja quantidade suficiente, sugere-se descartar uma primeira porção moída durante a troca de amostras. É indicado também que as amostras sejam agrupadas por espécies para evitar contaminação cruzada e facilitar a moagem ou a trituração. A seguir a amostra é moída e, assim, estará pronta para ser peneirada.



Fotos: Carlos Alberto da Silva

**Figura 9.** Moinhos utilizados para a moagem do material: Laboratorial (A) e processador de alimentos doméstico (B).

Foto: Carlos Alberto da Silva



**Figura 10.** Amostra triturada com auxílio de processador de alimentos doméstico.

Foto: Carlos Alberto da Silva



**Figura 11.** Compressor de ar sem óleo usado na limpeza das peneiras de nylon e processador de alimentos.

## Peneiramento

Imediatamente após a moagem, a amostra é peneirada em peneira de tela de nylon de 200 a 250  $\mu\text{m}$  e posicionada sobre uma placa de Petri (Figura 12). Na confecção das peneiras são utilizados dois aros de PVC®, sendo um de 3,0 cm e outro de 1,5 cm de largura (cortados de cano de PVC® branco de 10 cm

de diâmetro) onde a tela de nylon é fixada entre os dois aros. Assim como na moagem, o peneiramento é feito uma amostra por vez, sendo que entre cada amostra é necessária a limpeza do material com o emprego do compressor de ar isento de óleo. O fluxo de ar do compressor deve ser direcionado o mais próximo da peneira tanto do lado interno quanto no lado externo e nas laterais. A seguir deve-se passar um papel umedecido com etanol nas peneiras, para que não haja nenhum resquício da amostra na tela de nylon.

A amostra peneirada é colocada em saquinhos plásticos individuais com vedação tipo 'zip lock' (Figura 13) e identificada. Ao final de cada grupo, deve-se proceder a uma lavagem mais cuidadosa ou mesmo a troca da peneira para evitar contaminação cruzada entre amostras de diferentes espécies.



**Figura 12.** Amostra depois de peneirada, com a porção fina na placa de Petri e residual na peneira.

Foto: Carlos Alberto da Silva

## Conservação e armazenamento

Após as etapas de moagem e peneiramento, as amostras são transferidas para saquinhos plásticos identificados (Figura 13) e armazenadas em dessecador (por já se encontrarem liofilizadas) em ambiente com temperatura controlada ( $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até o momento de serem analisadas. Alternativamente as amostras poderão ser congeladas (em freezer  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Foto: Carlos Alberto da Silva



**Figura 13.** Amostras processadas em saquinhos com vedação 'zip lock'.

## Considerações finais

Dentre as etapas da análise de elementos traço em matrizes biológicas como a de pescado, a preparação das amostras é a que demanda maior tempo e que pode gerar os erros mais relevantes. Os procedimentos de limpeza e desmineralização de vidrarias e utensílios usados nos

cortes, preparação e trituração das amostras devem ser criteriosos para evitar contaminação cruzada entre as diferentes espécies de peixes.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio das bolsistas Hortência Elucelly Pereira de Santana e Joyce Danyelle Silva Carvalho dos Santos para a elaboração da primeira versão do texto.

## Referências

- CASTRO-GONZÁLEZ, M. I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M. Heavy metals: implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 263-271, nov. 2008.
- DOMINGO, J. L.; BOCIO, A.; FALCÓ, G.; LLOBET, J. M. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, v. 230, n. 2-3, p. 219-226, feb. 2007.
- FERNANDES, A. C.; MEDEIROS, C. O.; BERNARDO, G. L.; EBONE, M. V.; DI PIETRO, P. F.; ASSIS, M. A. A. DE; VASCONCELOS, F. DE A. G. DE. Benefits and risks of fish consumption for the human health. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 2, p. 283-295, apr. 2012.
- GUIDANCE for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories. Volue 1: fish sampling and analysis. 3. ed. Washington, DC: EPA, 2000.
- KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.

LI, N.; WU, X.; ZHUANG, W.; XIA, L.; CHEN, Y.; WU, C.; RAO, Z.; DU, L.; ZHAO, R.; YI, M.; WAN, Q.; ZHOU, Y. Fish consumption and multiple health outcomes: umbrella review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 273-283, may 2020.

MALVANDI, H.; ALAHABADI, A. Evaluation of potential human health risk due to the exposure to mercury via fish consumption of *Alosa* spp. from the southern Caspian Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 143, p. 66–71, jun. 2019.

NESTEL, P. J.; BEILIN, L. J.; CLIFTON, P. M.; WATTS, G. F.; MORI, T. A. Practical guidance for food consumption to prevent cardiovascular disease. **Heart, Lung and Circulation**, v. 30, n. 2, p. 163-179, feb. 2020.

PETERSEN, L.; DAHL, C. K.; ESBENSEN, K. H. Representative mass reduction is sampling – a critical survey of techniques and hardware. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 74, n. 1, p. 95-114, nov. 2004.

RAMSEY, M. H.; THOMPSON, M. Uncertainty from sampling, in the context of fitness for purpose. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, p. 503-513, 2007.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, sep. 2001.

SCHMITT, C. J.; FINGER, S. E. The effects of sample preparation on measured concentrations of eight elements in edible tissues of fish from streams contaminated by lead mining. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 185-207, mar. 1987.

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT, J.; POLAK-JUSZCZAK, L.; KANDERSKA, J.; ADAMCZYK, M.; MALESA-CIECWIERZ, M.; RUCZYNSKA, W. Food of marine origin: between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the polish market. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 556-563, dec. 2008.

#### Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234,  
Caixa Postal 33,  
13560-290 , São Carlos, SP  
Fone: (16) 34115600  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digital (2022): PDF



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Pecuária Sudeste

Presidente  
*André Luiz Monteiro Novo*  
Secretário-Executivo  
*Luiz Francisco Zafalon*

Membros  
*Gisele Rosso, Mara Angélica Pedrochi*  
*Maria Cristina Campanelli Brito,*  
*Silvia Helena Piccirillo Sanchez*

Revisão de texto  
*Gisele Rosso*

Normalização bibliográfica  
*Mara Angélica Pedrochi*

Editoração eletrônica  
*Maria Cristina Campanelli Brito*

Ilustração Capa  
*Ana Rita de Araujo Nogueira*

CGPE: 017886