

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS EMPREGANDO NADES PARA O  
PREPARO DE AMOSTRAS DE PEIXES VISANDO À  
DETERMINAÇÃO DE MACROELEMENTOS POR ICP-OES**

**Jeysse Fatima Duarte \***

Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para  
obtenção do título de MESTRE  
EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA  
ANALÍTICA

**Orientador(a):** Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

\*Bolsista: CNPq/ DTI-C (Processo 384261/2023-0) e CAPES/PROEX (Processo 88887.087723/2024-00)

SÃO CARLOS

2026



Duarte, Jeyse Fatima

Avaliação de estratégias empregando NADES para o preparo de amostras de peixe visando à determinação de macroelementos por ICP-OES / Jeyse Fatima Duarte -- 2026.  
71f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos  
Orientador (a): Ana Rita de Araújo Nogueira  
Banca Examinadora: Ana Beatriz Santos da Silva, Clarice Dias Britto do Amaral  
Bibliografia

1. Química analítica. I. Duarte, Jeyse Fatima. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

---

**Folha de Aprovação**

---

Dissertação de Mestrado da candidata **Jeysse Fatima Duarte**, realizada em **27/04/2026**.

**Comissão Julgadora:**

Prof(a). Dr(a). Ana Rita de Araújo Nogueira (EMBRAPA)

Prof(a). Dr(a). Ana Beatriz Santos da Silva (UFSCar)

Prof(a). Dr(a). Clarice Dias Britto do Amaral (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por ter me guiado em todos os momentos da minha vida, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho e por ter dado forças para continuar essa jornada.

À minha família em especial meus pais e minha irmã (Paulo Eduardo, Elisa Rute e Jessyca) por terem me ensinado a ser uma pessoa empática e a sempre tentar ver o lado bom das coisas, por me apoiarem por todos esses anos da minha vida e por todas as orações.

Ao meu noivo Renan, por todo carinho, paciência, conselhos e risadas. Por ter acreditado no meu potencial, me encorajado a seguir em frente nos momentos mais difíceis e por ter mostrado a leveza desse processo.

À minha orientadora Dr Ana Rita de Araujo Nogueira, pela dedicação, paciência, conselhos, preocupação e por ter acreditado no meu potencial. Saiba que a senhora é uma excelente orientadora e tenho grande admiração pela sua trajetória.

Aos meus colegas e amigos do GAIA, LQA e LNA pela amizade, experiências e ajuda ao longo dessa caminhada em especial Lorena, Isabella, Samara, Marcelo, Floriatan, Ivero, Mykaelli, Pascoal, Amauri, Heloiza, Geovanna, Vanessa, Thiago, Vinicius, Livia e Theyla por terem sido meu ombro amigo e por tornarem os dias mais felizes principalmente os mais desafiadores.

À Raquel Cardoso Machado e à Embrapa Instrumentação, pelas análises termogravimétricas.

À Embrapa Pecuária Sudeste, pela estrutura oferecida para realização deste projeto e a todos os funcionários, em especial Cadu, Reinivaldo, Márcio, Avelardo, Chris, Gilberto e Fabiano por todo amparo na pesquisa, pelos cafés, acolhimento e ensinamentos.

À equipe e ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) projeto “Indicadores ambientais e socioeconômicos para a gestão integrada participativa dos recursos hídricos da região estuarina do Rio São Francisco e zonas costeiras adjacentes”, coordenado pelo Dr. Marcus Cruz, Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE) e financiado pelo CNPq.

Ao apoio financeiro do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) ao projeto “BRS Aqua - Ações estruturantes e inovação para fortalecimento das cadeias produtivas da Aquicultura no Brasil”.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido por bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGREE = Métrica de sustentabilidade (Analytical greenness metric)

AGREEprep = Métrica analítica do preparo de amostra sustentável (Analytical greenness metric for sample preparation)

ANOVA = Análise de variância (Analysis of Variance)

AOAC = Associação Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists)

ChCl = Cloreto de colina

DES = Solvente eutético profundo (Deep Eutectic Solvent)

Df = grau liberdade

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FA = Ácido fórmico (Formic acid)

FAO = Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food Agriculture Organization)

FAAS = Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

GAC = Química analítica verde (Green Analytical Chemistry)

GSP = Preparo de amostra verde (Green Sample Preparation)

HBA = Aceptor de ligação de hidrogênio (Hydrogen bond acceptor)

HBD = Doador de ligação de hidrogênio (Hydrogen bond donor)

ICP-MS = Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (Inductively coupled plasma mass spectrometry)

ICP-OES = Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)

ML = Ácido malônico

INMETRO = Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LOD = Limite de detecção (Limit of detection)

LOQ = Limite de quantificação (Limit of quantitation)

MIP-OES = Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Microondas (Microwave induced plasma optical emission spectrometry)

ML = Ácido malônico

MRC = Material de referência certificado

MR = Múltipla Resposta (Multiple Response)

MS = Média Quadrática (Mean squares)

MW = Micro-ondas (Microwave)

NADES = Solvente eutético profundo natural (Natural Deep eutectic solvente)

ODS = Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OX = Ácido oxálico

$R^2$  = Coeficiente de determinação

R = Coeficiente de correlação

RSD = Desvio padrão relativo (Relative standard deviation)

RSM = Metodologia de superfície de resposta (Response surface methodology)

SE – Efeitos padronizados (Standard effects)

SD = Desvio padrão (Standard deviation)

SS = Soma quadrática (Sum of squares)

IC = Intervalo de Confiança

VIM = Vocabulário Internacional de Metrologia

WHO = Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Métodos de extração utilizando solventes eutético profundos (DES/NADES) reportadas na literatura .....	6
TABELA 2 - Programa de aquecimento utilizado no preparo de amostra utilizando a digestão ácida assistida por micro-ondas .....	16
TABELA 3 – Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Ca, K, Mg, Na e P por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES) .....	17
TABELA 4 – Identificação das espécies de pescados utilizados no estudo .....	18
TABELA 5 – Matriz experimental do planejamento Doehlert e resposta experimental (MR) .....	28
TABELA 6 – Análise de variância para o modelo quadrático obtida no planejamento Doehlert.....	28
TABELA 7 - Condição ótima de extração predita pelo modelo matemático obtido por metodologia de superfície de resposta.....	29
TABELA 8 – Parâmetros das curvas analíticas, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de correlação e faixas lineares obtidas para a determinação dos analitos por ICP - OES .....	32
TABELA 9 – Avaliação da homogeneidade de variâncias (Teste de Cochran) aplicado aos dados de linearidade .....	33
TABELA 10 – Avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro Wilk aplicado às curvas analíticas.....	33
TABELA 11 - Análise de variância (ANOVA) da regressão linear das curvas analíticas utilizadas na validação do método .....	34
TABELA 12 – Avaliação do efeito de matriz por comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas realizadas sem matriz e com matriz determinadas por ICP – OES.....	34
TABELA 13 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações realizadas em ICP-OES .....	35
TABELA 14 – Critério de aceitação para recuperação.....	36
TABELA 15 – Valores de referência (base seca), concentrações determinadas e recuperações obtidas para o material de referência de tecido de peixe (MR-Agro E3002A, Embrapa, n=3).....	36
TABELA 16 – Recuperações obtidas para quatro níveis de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no ensaio de adição e recuperação determinado por ICP-OES.....	36
TABELA 17 – Avaliação da repetibilidade do método em diferentes níveis de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) determinado por ICP -OES.....	37
TABELA 18 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações utilizando $\text{HNO}_3$ no preparo de amostra .....	38
TABELA 19 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações utilizando NADES no preparo de amostra .....	38
TABELA 20 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos convencional e alternativo para determinação de Ca, K, Mg, Na e P no material de referência tecido de peixe (MR – Agro E3002A, Embrapa, n=3) .....	39

TABELA 21 - Concentrações médias dos macronutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e DPR (%) das amostras analisadas via método convencional .....	40
Tabela 22 - Concentrações médias dos macronutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e DPR (%) das amostras analisadas via método alternativo.....	40

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas químicas dos precursores utilizados na preparação dos solventes eutéticos profundos naturais (NADES).....	6
FIGURA 2 - 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).....	13
FIGURA 3 – Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido fórmico (1:1), n=2.....	21
FIGURA 4 - Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido oxálico (1:1), n=2 .....	22
FIGURA 5 – Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido malônico, n=2 .....	22
FIGURA 6 - Recuperações (%) e DPR (%) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) variando a proporção de água na composição do NADES, n=2.....	23
FIGURA 7 – Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do cloreto de colina .....	24
FIGURA 8 – Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do ácido fórmico.....	25
FIGURA 9 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do NADES composto por cloreto de colina, ácido fórmico e água na proporção molar 1:1:4 .....	26
FIGURA 10 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados obtidos no planejamento Doehlert.....	30
FIGURA 11 – Gráfico de contorno obtida pelo planejamento Doehlert.....	30
FIGURA 12 – Avaliação da sustentabilidade do método convencional de preparo de amostras por digestão ácida assistida por micro ondas utilizando a métrica AGREEprep.....	42
FIGURA 13 – Avaliação da sustentabilidade do método alternativo de preparo de amostras utilizando NADES e banho termostático com agitação utilizando a métrica AGREEprep.....	42

## RESUMO

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS EMPREGANDO NADES PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE PEIXES VISANDO À DETERMINAÇÃO DE MACROELEMENTOS POR ICP-OES. A etapa de preparo de amostra é crucial para obter resultados coerentes nas análises químicas, pois é nesse processo que podem ocorrer contaminações e perdas de alguns analitos. Os métodos convencionais de digestão empregam ácidos fortes, como o ácido nítrico, que promovem a decomposição da matriz, porém são perigosos e geram resíduos significativos. Como alternativa, neste trabalho foi avaliado o uso de solventes verdes, como os eutéticos (DES/NADES). Os solventes eutéticos profundos (DES - Deep Eutectic Solvents), são formados por um receptor de ligação de hidrogênio (HBA) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD), originando um sistema eutético que apresenta menor ponto de fusão. Os solventes eutéticos naturais profundos (NADES -Natural Deep Eutectic Solvents) são formados por compostos naturais, ou seja, formados por aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e possuem vantagens como menor toxicidade, biodegradabilidade, sustentabilidade e preparo relativamente simples. Os teores de Ca, K, Mg, Na e P extraídos de tecidos de peixe foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), que apresenta boa sensibilidade e capacidade multielementar. Foram avaliados diferentes ácidos orgânicos como doadores de ligação de hidrogênio (ácido fórmico, malônico e oxálico) e cloreto de colina como receptor de ligação de hidrogênio, na proporção 1:1. A extração foi realizada em material de referência tecido de peixe (MR-agro E3002A), utilizando banho termostático e ultrassom, sendo comparadas a recuperação (%) e desvio padrão relativo (DPR %) dos analitos avaliados. As extrações realizadas em banho termostático apresentaram recuperações entre 68% e 100% em relação aos valores descritos no material de referência e DPR < 18%. Em seguida, foi avaliada a influência da adição de água na composição dos solventes eutéticos (1 a 4 mol de H<sub>2</sub>O). As recuperações e os desvios-padrão relativos indicaram que o NADES composto por cloreto de colina: ácido fórmico: água (1:1:4) apresentou melhor desempenho. Planejamento experimental (Doehlert) foi realizado considerando as variáveis tempo de extração, volume do solvente eutético e múltipla resposta (MR) para otimizar de maneira simultânea a resposta da extração dos cinco analitos. As respostas obtidas indicaram que a condição otimizada, com recuperações de 77 –92% e DPR (%) de 0,1-18% foi: 90 min de extração e 4 mL de NADES. A validação demonstrou adequada confiabilidade do método desenvolvido e a avaliação pela métrica AGREEprep resultou em pontuação de 0,48. A substituição da digestão ácida tradicional por solventes eutéticos profundos, especialmente os NADES, como etapa de preparo de amostras de tecidos de peixes, introduz uma abordagem mais sustentável, menos tóxica e com menor geração de resíduos, mantendo a eficiência na extração de nutrientes, reduzindo riscos laboratoriais, simplificando o preparo e fortalecendo o alinhamento com práticas de química verde.

**Palavras chaves:** Solventes Eutéticos Profundos, Preparo de amostras, ICP-OES, Determinação elementar, Matriz biológica, Química verde

## ABSTRACT

EVALUATION OF STRATEGIES EMPLOYING NADES FOR THE PREPARATION OF FISH SAMPLES AIMING AT THE DETERMINATION OF MACROELEMENTS BY ICP-OES. The sample preparation step is crucial for obtaining consistent results in chemical analyses, since contamination and loss of some analytes can occur in this process. Conventional digestion methods employ strong acids, such as nitric acid, which promote matrix decomposition but are dangerous and generate significant waste. As an alternative to reduce these impacts, this work evaluated the use of green solvents, such as eutectics (DES/NADES). Deep eutectic solvents (DES) are formed by a hydrogen bond acceptor (HBA) and a hydrogen bond donor (HBD), resulting in a eutectic system with a lower melting point. Natural deep eutectic solvents (NADES) are composed of natural compounds, namely amino acids, organic acids, and sugars, and offer advantages such as lower toxicity, biodegradability, sustainability, and relatively simple preparation. The levels of Ca, K, Mg, Na, and P extracted from fish tissues were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), which exhibits good sensitivity and multi-element capability. Different organic acids (formic, malonic, and oxalic acids) were evaluated as hydrogen bond donors, and choline chloride was used as a hydrogen bond acceptor in a 1:1 ratio. Extraction was performed on fish tissue reference material (MR-agro E3002A) using a thermostatic bath and ultrasound, and the recovery (%) and relative standard deviation (RSD%) of the evaluated analytes were compared. Extractions performed in a thermostatic bath showed recoveries between 68% and 100% compared to the values described in the reference material and a relative standard deviation (RSD) < 18%. Subsequently, the influence of adding water to the composition of the eutectic solvents (1 to 4 mol H<sub>2</sub>O) was evaluated. Recoveries and relative standard deviations indicated that the NADES composed of choline chloride: formic acid: water (1:1:4) showed the best performance. An experimental design (Doehlert) was carried out to simultaneously optimize the extraction responses of the five analytes, considering extraction time and eutectic solvent volume, and to evaluate the multiple response (MR). The results obtained indicated that the optimized condition, with recoveries of 77–92% and RSD (%) of 0.1–18%, was: 90 min of extraction and 4 mL of NADES. Validation demonstrated adequate reliability of the developed method, and the evaluation using the AGREEprep metric resulted in a score of 0.48. Replacing traditional acid digestion with deep eutectic solvents, especially NADES, as a sample preparation step for fish tissue introduces a more sustainable, less toxic approach with lower waste generation, while maintaining nutrient extraction efficiency, reducing laboratory risks, simplifying preparation, and strengthening alignment with green chemistry practices.

**Keywords:** Deep Eutectic Solvents, Sample preparation, ICP-OES, Elemental Determination, Biological matrix, Green chemistry

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1	PREPARO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR ..3	
2.1.1	MÉTODO CONVENCIONAL: DIGESTÃO ÁCIDA .....	3
2.1.2	MÉTODO ALTERNATIVO: SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) E SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS (NADES) .....	4
2.2	TÉCNICAS ANALÍTICAS BASEADAS EM PLASMA .....	7
2.3	TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS E ESPECTROSCÓPICAS .....	9
2.4	QUÍMICA VERDE APLICADA NO PREPARO DE AMOSTRAS E MÉTRICAS VERDES NA QUÍMICA ANALÍTICA.....	10
2.5	ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO .....	11
2.6	OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (ODS) E O CONTEXTO AMBIENTAL.....	13
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	OBJETIVO GERAL .....	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	16
4.1	MATERIAIS E REAGENTES .....	16
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	16
4.3	AMOSTRAS E ANALITOS ESTUDADOS.....	17
4.4	MÉTODO DE REFERÊNCIA: DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS .....	19
4.5	PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS (NADES) .....	19
4.6	MÉTODO ALTERNATIVO: EXTRAÇÃO UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES) .....	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1	PREPARO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES).....	20
5.2	EXTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZANDO NADES.....	20
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO NADES.....	23
5.3.1	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TGA) .....	23
5.4	DESENVOLVIMENTO DO MODELO E OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA.....	27
6	VALIDAÇÃO .....	32
6.1	LINEARIDADE E FAIXA LINEAR.....	32
6.2	ESTUDO DE EFEITO DE MATRIZ .....	34

6.3	LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) .....	35
6.4	VERACIDADE .....	35
6.5	PRECISÃO .....	37
7	DETERMINAÇÃO DE NUTRIENTES INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE PEIXES .....	38
8	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZANDO MÉTRICAS VERDES (AGREEprep) 42	
9	CONCLUSÃO .....	45
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	46
	ANEXOS .....	53
	ANEXO 1 – 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA ANALÍTICA .....	54
	ANEXO 2 – 10 PRINCÍPIOS DE PREPARO DE AMOSTRA VERDE (GSP).....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A composição mineral de organismos aquáticos constitui um parâmetro essencial para a compreensão tanto do valor nutricional dos alimentos quanto das condições ambientais dos ecossistemas onde esses organismos se desenvolvem. No contexto brasileiro, o Rio São Francisco destaca-se como um dos mais relevantes sistemas hidrográficos, desempenhando funções ecológicas, sociais e econômicas fundamentais para as populações ribeirinhas e para a atividade pesqueira regional (SANTOS et al., 2019). A ictiofauna desse rio é diretamente influenciada por fatores como a composição mineral das águas, o uso e ocupação do solo, práticas agrícolas e aquícolas, além de intervenções antrópicas que modificam o regime hidrológico. Essas variáveis afetam a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, a composição mineral dos pescados, tornando o monitoramento dos macronutrientes como cálcio, potássio, magnésio, sódio e fósforo, importante para avaliar a qualidade ambiental, possíveis alterações no ecossistema e também contribui para assegurar a oferta de alimentos seguros e nutritivos, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS, ONU), especialmente o ODS 3 (Boa saúde e Bem-estar), ODS 6 (Água potável e saneamento), ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e o ODS 14 (Vida na Água), ao promover práticas de manejo sustentável e redução de impactos ambientais.

A determinação desses nutrientes depende de etapas analíticas que devem ser realizadas com bastante rigor. Dentre essas etapas o preparo de amostras se destaca como uma das mais críticas. Os métodos convencionais, baseados em digestões ácidas com ácidos concentrados e peróxido de hidrogênio, apresentam limitações como consumo relativamente elevado de substâncias tóxicas, além de riscos ocupacionais e significativa geração de resíduos. Considerando a crescente preocupação com a sustentabilidade, surge a demanda pelo desenvolvimento de procedimentos que reduzam o impacto ambiental sem comprometer a eficiência analítica. Nesse contexto, os solventes eutéticos profundos (Deep Eutectic Solvents – DES) e os solventes eutéticos profundo naturais (Natural Deep Eutectic Solvents – NADES) apresentam-se como alternativas promissoras. Os DES são formados pela combinação de um aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD), que, ao interagirem por meio de extensas redes de ligações de hidrogênio, originam sistemas eutéticos com ponto de fusão bastante inferior aos seus constituintes individuais. Essa característica resulta em solventes com propriedades físico-químicas importantes, como baixa volatilidade, elevada estabilidade térmica e grande capacidade de solubilização. Por sua vez, os NADES representam um subgrupo de DES compostos por substâncias de origem natural, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos (DAI et al., 2015), o que confere a esses solventes vantagens adicionais, incluindo biodegradabilidade, baixa toxicidade e compatibilidade biológica, tornando-os particularmente alinhados aos princípios da química verde.

A versatilidade dos DES e NADES permite modular propriedades como polaridade, viscosidade e acidez por meio da escolha adequada dos componentes e de suas proporções, além da possibilidade de adição controlada de água, o que amplia ainda mais sua aplicabilidade em processos de extração. No âmbito da química analítica, DES e NADES têm se destacado como alternativas sustentáveis para o preparo de amostras, especialmente em matrizes biológicas. Sua capacidade de extrair os analitos sem o uso de ácidos minerais agressivos reduz substancialmente a geração de resíduos perigosos e os riscos associados ao manuseio de reagentes tóxicos. Além disso, a simplicidade de preparo e o baixo custo dos componentes tornam esses solventes acessíveis para diferentes contextos laboratoriais. Em análises multielementares, como aquelas realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (HOU; JONES, 2000), esses solventes têm demonstrado desempenho satisfatório, desde que suas propriedades sejam devidamente otimizadas (SANTANA et al., 2021).

Desta forma, nesta dissertação foi avaliado se os solventes eutéticos, especialmente os NADES, são capazes de substituir de forma eficaz e ambientalmente responsável os métodos tradicionais de digestão ácida na extração de nutrientes inorgânicos de tecidos de peixes. Procurou-se verificar a eficiência das extrações, com recuperações adequadas, boa precisão e redução do impacto ambiental associado ao preparo de amostras. O emprego de métrica específica para avaliação da sustentabilidade analítica, como o Green Analytical Procedure Index (GAPI), Eco-Scale (PLOTKA-WASYLKA, 2018), AGREE baseada nos princípios da química verde (PENA-PEREIRA et al., 2020) e AGREEprep que é voltada para a etapa de preparo de amostras (WOJNOWSKI et al., 2022), possibilita quantificar aspectos como consumo de reagentes, toxicidade, energia empregada e geração de resíduos, oferecendo uma avaliação abrangente do desempenho ambiental dos métodos desenvolvidos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 PREPARO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR**

#### **2.1.1 MÉTODO CONVENCIONAL: DIGESTÃO ÁCIDA**

O preparo de amostras é uma etapa muito relevante na análise de elementos principalmente para a determinação de macro e micronutrientes por técnicas baseadas em plasma como a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP–OES). Em matrizes biológicas, os elementos estão associados a proteínas e lipídios necessitando de preparos capazes de promover a decomposição da matéria orgânica e a solubilização dos analitos. A eficiência do preparo de amostra depende diretamente de parâmetros como tempo, temperatura e volume do solvente, pois essas variáveis influenciam a cinética de solubilização, os processos de transporte de massa e equilíbrio entre fases envolvidas (KRUG et al., 2019; SKOOG et al., 2004).

A digestão ácida convencional utilizando ácidos minerais concentrados é muito utilizada devido à elevada capacidade oxidante e à capacidade de converter a matéria orgânica em espécies voláteis, mantendo os elementos inorgânicos em solução (KRUG, 2019). A utilização de HNO<sub>3</sub> é adequada para técnicas de plasma por gerar soluções compatíveis com sistemas de nebulização e introdução de amostras, reduzindo ocorrências de precipitação, entupimentos de sistema e interferências físico-químicas (HOU; JONES, 2000). Para garantir a confiabilidade analítica principalmente em determinações em baixos níveis de concentração, o ácido nítrico pode ser submetido à purificação por destilação “sub boiling” que é o aquecimento abaixo do ponto de ebulição do ácido promovendo evaporação controlada e re-condensação, com significativa redução de impurezas metálicas e essa etapa é importante para minimizar sinais de brancos analíticos elevados e melhorar limites de detecção e quantificação e custo reduzido.

Os sistemas que podem ser utilizados para realizar a digestão ácida são o bloco digestor que consiste no aquecimento convencional das amostras em recipientes geralmente em sistema aberto, sob temperatura controlada, e é uma técnica muito utilizada devido ao baixo custo e facilidade de obtenção para rotinas laboratoriais (KRUG, 2019). Porém, sistemas abertos podem favorecer a perda de espécies voláteis e a maior suscetibilidade à contaminação. A digestão assistida por radiação micro-ondas permite aquecimento homogêneo sob condições controladas de temperatura e pressão em sistemas fechados, ocorrendo maior eficiência na decomposição da matéria orgânica, redução do tempo de digestão e menor risco de perdas por volatilização (KRUG, 2019). Além disso, o sistema fechado contribui com o controle de contaminação. Porém, o custo elevado dos equipamentos é um impedimento para sua utilização em larga escala.

Além do bloco digestor e do micro-ondas, tem-se a extração assistida por ultrassom, que se baseia no fenômeno de cavitação caracterizado pela formação e implosão de microbolhas no meio líquido, gerando micro-jatos e regiões localizadas

de alta energia capazes de promover ruptura celular, aumentando a área de contato entre amostra e solvente extrator (CHEMAT et al., 2017). Em alguns casos, a adição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é utilizada para aumentar a eficiência da digestão, devido a seu elevado poder oxidante. Vale ressaltar que o controle da temperatura pode reduzir a viscosidade do solvente, favorecendo a mobilidade dos analitos do interior da matriz para o meio extrator (KRUG, 2019).

A digestão ácida com  $HNO_3$  é reconhecida por sua robustez, eficiência de extração e ampla aplicabilidade em diferentes matrizes. Porém, essa abordagem apresenta desvantagens relacionadas ao elevado consumo de ácidos concentrados e à geração de resíduos químicos, à manipulação de reagentes, em sua maioria, perigosos, ao custo elevado de reagentes, a eventuais dificuldades logísticas para aquisição e armazenamento de ácidos controlados e a um maior impacto ambiental (ANASTAS; WARNER, 1998). Embora a digestão ácida convencional permaneça como técnica estabelecida na análise elementar, observa-se crescente interesse por estratégias alternativas que têm como objetivo reduzir o uso de reagentes agressivos e a geração de resíduos.

### **2.1.2 MÉTODO ALTERNATIVO: SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) E SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS (NADES)**

Os líquidos iônicos (LIs) são constituídos por sais orgânicos formados por um cátion volumoso (imidazólio, piridínio) e um ânion orgânico ou inorgânico que apresenta ponto de fusão inferior a  $100^\circ C$  (PLECHKOVA; SEDDON, 2008; NASIRPOUR et al., 2020) e são obtidos a partir de processos complexos como reações de alquilação, troca aniônica e várias etapas de purificação para remover haletos residuais, e essas etapas acabam aumentando o custo do preparo do solvente. Apesar de terem sido considerados alternativas mais seguras, muitos líquidos iônicos apresentam uma certa toxicidade principalmente os que possuem cadeias alquilas extensas ou ânions fluorados. Portanto, a classificação como solventes verdes começou a ser reavaliada. Os solventes eutéticos profundos (DES) surgem como alternativa aos líquidos iônicos devido ao preparo simples, baixo custo e principalmente menor impacto ambiental.

Os DES são uma classe de solventes formados pela combinação de componentes que, misturados em proporções molares específicas, apresentam pontos de fusão menores se comparados aos precursores, devidos às interações estabelecidas, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio e demais interações eletrostáticas, que acabam promovendo desorganização da estrutura cristalina (ABBOTT et al., 2003; DAI et al., 2015). O método mais utilizado para o preparo desses solventes é realizado pela mistura dos precursores em aquecimento moderado ( $50^\circ C - 100^\circ C$ ) com agitação por no mínimo 2 horas e observa-se a formação de um líquido homogêneo. O aquecimento fornece energia suficiente para enfraquecer as interações intermoleculares, favorecendo a formação de uma nova rede longa de ligações de hidrogênio entre os aceptores de ligação de hidrogênio

(HBA) e o doadores de ligação de hidrogênio (HBD) (DAI et al., 2015). Outro tipo de preparo destes solventes é realizado pela moagem mecânica, na qual os precursores são submetidos à fricção, que promove defeitos cristalinos, permitindo que os componentes sólidos interajam, formando uma rede de ligações de hidrogênio sem a necessidade de aquecimento; porém, como a interação ocorre no estado sólido, as ligações de hidrogênio formadas podem apresentar menor organização estrutural, se comparadas à utilização de aquecimento prolongado (OLAWUYI et al., 2025).

O HBA utilizado é um sal de amônio quaternário (cloreto de colina - ChCl) e a escolha desse HBA se faz devido a estabilidade térmica, baixo custo, disponibilidade comercial e principalmente pela presença de um ânion com alta densidade eletrônica que atua como um acceptor de ligações de hidrogênio, já os HBD utilizados podem ser ácidos orgânicos, álcool, amida ou outro composto capaz de estabelecer ligações de hidrogênio (SMITH et al., 2014). Para o cloreto de colina, o cátion apresenta caráter polar e o ânion cloreto (Cl<sup>-</sup>) atua como acceptor de ligações de hidrogênio devido à elevada densidade eletrônica e à interação entre Cl<sup>-</sup> e os grupos funcionais do HBD escolhido (hidroxila, carboxila) resultam na formação de uma rede longa de ligações de hidrogênio que são responsáveis pelas propriedades físico-químicas do solvente.

Os primeiros DES descritos na literatura (ChCl:Ureia) (ABBOTT et al., 2003) foram formados por espécies químicas sintéticas; portanto, fez-se necessário avaliar o impacto ambiental destes solventes. A partir deste enfoque surgiu o conceito de solvente eutético profundo natural (NADES - Natural Deep Eutectic Solvents) que são combinações de metabólitos naturais (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos) que formam misturas líquidas estáveis (CHOI et al., 2011). Esses solventes podem ser classificados conforme sua afinidade com água, sendo hidrofílicos, que são formados pela combinação de cloreto de colina e açúcares, ácidos orgânicos, e apresentam alta miscibilidade, sendo adequados para extração de compostos polares (SMITH et al., 2014), e hidrofóbicos, que são formados por reagentes menos polares (ácidos graxos, mentol), formando solventes parcialmente imiscíveis em água (VAN OSCH et al., 2019). A principal diferença entre DES e NADES ocorre pela natureza dos precursores envolvidos, sendo que os DES são formados por compostos sintéticos e os NADES por substâncias de origem natural, tornando-os potencialmente biodegradáveis (CHOI et al., 2011; ESPINO et al., 2016). As vantagens incluem baixa volatilidade, preparo simples, baseado na mistura, aquecimento moderado dos precursores e possibilidade de alterar as propriedades físico-químicas, como polaridade, viscosidade e acidez, por meio da escolha dos reagentes e de suas proporções molares. Os reagentes utilizados na formação dos solventes são cloreto de colina (HBA) e diferentes ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido oxálico e ácido malônico) (HBD) (Figura 2). Os ácidos apresentam grupos carboxílicos (-COOH), cujo hidrogênio possui caráter parcialmente positivo, o que permite uma forte interação com o ânion cloreto. Os ácidos contendo dois grupos carboxílicos (oxálico e malônico) aumentam as possibilidades de formação de

ligações de hidrogênio e isso ocorre devido a cada grupo  $-COOH$  participar tanto como doador, quanto acceptor de ligações de hidrogênio (CARVALHO et al., 2024).

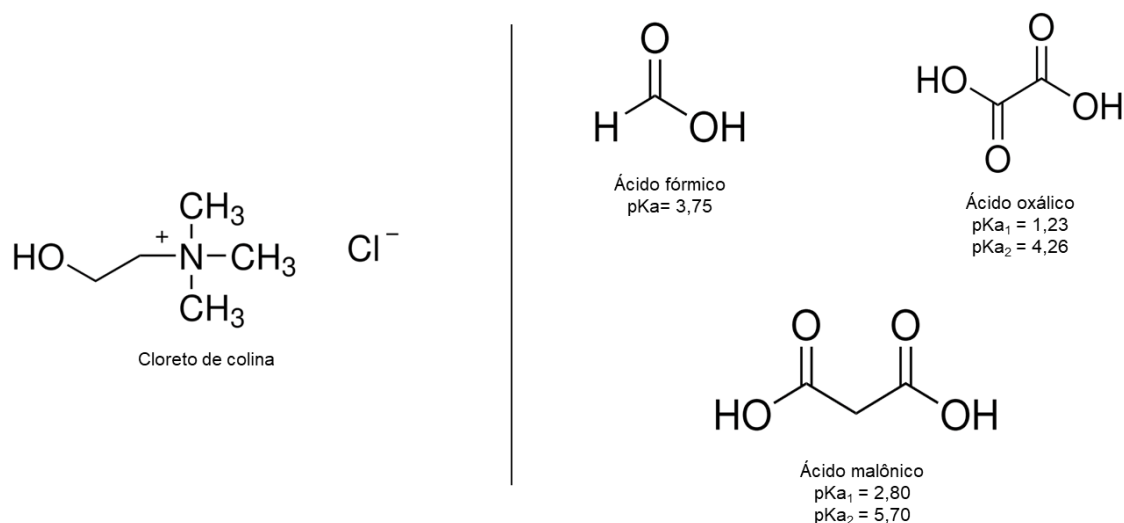


FIGURA 1 – Estruturas químicas dos precursores utilizados na preparação dos solventes eutéticos profundos naturais (NADES)  
Fonte – Elaborada pela autora

A principal limitação na utilização dos DES/NADES é a elevada viscosidade que acaba comprometendo a eficiência da extração. Portanto, é necessário reduzir a viscosidade, pois favorece a difusão do solvente na matriz e melhora a interação massa/solvente extrator. A água exerce papel importante na estrutura e nas propriedades dos solventes eutéticos e, apesar desses sistemas serem preparados sem água na sua composição, a adição controlada pode alterar propriedades físico-química como viscosidade, polaridade e mobilidade molecular (CHOI et al., 2011; DAI et al., 2015; ESPINO et al., 2016).

A utilização dos NADES tem sido estudada como solvente alternativo no preparo de amostra, pois possui elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixa volatilidade, minimizando riscos relacionados ao meio ambiente e ao operacional, e capacidade de solubilização dos analitos (LIU et al., 2018; VANDA et al., 2018). A literatura destaca a versatilidade e a eficiência dos DES/NADES na extração de analitos em diferentes matrizes (Tabela 1).

TABELA 1 - Métodos de extração utilizando solventes eutético profundos (DES/NADES) reportadas na literatura

Matriz	Analitos	Recuperação (%)	Técnica de quantificação	Referência
Peixe	Cu, Fe, Zn	83-95	FAAS	Habibi et al., 2013
Peixes e algas	Cu, Fe, Ni, Zn	96-98	ICP - OES	Ghanemi et al., 2014
Leite cru	Pb	102-103	FAAS	Borahan et al., 2019
Petróleo	Pb, Co, Ni, Mn	95-98	FAAS	Soylak; Koksak, 2019
Leite	Cd, Cu, Pb	88 - 103	FAAS	Sorouraddin; Farajzadeh; Dastoori, 2020
Fosfato de Rocha e suplemento mineral	As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn	58-113	ICP-OES e ICP-MS	Santana et al., 2021
Peixes e enguias	Zn	93-101	FAAS	Haq, H. U et al., 2021
Peixes	Pb, Cd, Hg	89-111	GFAAS	Hanifar et al., 2023
Tecido animal	Cu, Cd, Co, Cr, Fe, Pb, Zn	85-95	ICP-OES	Ninayan et al., 2024
Peixe	Ca, K, Mg, Na, P	77-92	ICP-OES	Atual trabalho

No contexto de matrizes complexas como o leite, foi utilizado um DES ternário composto por mentol, sorbitol e ácido mandélico para a extração de Cd, Cu e Pb alcançando recuperações entre 88-104% pela técnica FAAS (SOROURADDIN et al., 2020). Em outro estudo, foi utilizado um DES composto por cloreto de colina e fenol para extrair chumbo em leite cru obtendo recuperações de 102 a 103% (BORAHAN et al., 2019). Em matrizes inorgânicas como rocha fosfática e suplementos minerais, foi utilizado o NADES composto por xilitol, ácido cítrico e ácido málico obtendo recuperações entre 56-113% (SANTANA et al., 2021). Para amostras biológicas como peixes, foi utilizado um DES composto por cloreto de colina e ácido oxálico para a extração de Cu, Fe e Zn obtendo recuperações de 83-95% (HABIBI et al., 2013). Para a extração de zinco em peixes e enguias, utilizou-se DES formado por cloreto de colina e fenol (1:2) com recuperações entre 93-101% realizando a determinação por FAAS (HAQ et al., 2021). Em estudos analisando elementos potencialmente tóxicos (Pb, Cd, Hg) em várias espécies de peixes, foi utilizado DES hidrofóbico de mentol e etilenoglicol (1:1) tendo recuperações entre 89-111% por GFAAS (HANIFAR et al., 2023). Em tecidos de animais, utilizou-se várias composições de DES apresentando recuperações entre 85-95% analisados por ICP-OES (NINAYAN et al., 2024). No presente trabalho, foi utilizado NADES composto por cloreto de colina, ácido fórmico e água (1:1:4) realizando a extração (tecido de peixe) de Ca, K, Mg, Na e P obtendo recuperações de 77-92%

## 2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS BASEADAS EM PLASMA

Os métodos espectrométricos fundamentam-se na interação da radiação eletromagnética com a matéria e podem ser explorados em diferentes regiões do espectro (ultravioleta, visível e infravermelho). As principais técnicas baseadas em plasma utilizadas são a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES), Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – MS) e a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP – OES) que são técnicas consolidadas sendo utilizadas em diversas áreas do conhecimento. Essas técnicas se consolidaram em análises multielementares devido à sua elevada sensibilidade, ampla faixa linear de trabalho e capacidade de análise simultânea de múltiplos elementos e versatilidade referente às matrizes (HOU; JONES, 2000).

A Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES) é muito utilizado na determinação de elementos em diferentes matrizes devido à capacidade multielementar, ampla faixa linear de trabalho e robustez. O princípio da técnica baseia-se na introdução da amostra em um plasma de argônio mantido por radiofrequência, promovendo uma sequência de processos fundamentais sendo dessolvatação, vaporização, atomização e excitação dos analitos. Após a introdução da amostra sob a forma de aerossol, ocorre a dessolvatação, etapa em que o solvente é retirado das gotículas. Em seguida, ocorrem a vaporização, que é a decomposição das partículas em moléculas no estado gasoso, a atomização, que é a quebra das moléculas gasosas em átomos, e

a excitação, na qual os átomos absorvem energia térmica do plasma e são excitados, sendo promovidos para um nível energético maior, e, ao retornarem ao estado fundamental, ocorre a emissão da radiação em comprimentos de onda específicos, permitindo a quantificação dos analitos. A elevada temperatura do plasma (aproximadamente 10.000 K) é responsável pela eficiência dessas etapas e torna essa técnica menos suscetível a interferências (espectrais e físicas) quando comparada às demais cujas temperaturas do plasma são menores, como no MIP-OES.

O sistema de introdução de amostras é uma das etapas importantes para o desempenho analítico. Dito isto, os principais tipos de nebulizadores são o concêntrico no qual o líquido proporciona aerossol de gotas mais finas e melhor sensibilidade, porém, é mais suscetível a entupimentos e menor tolerância a amostras com alto teor de sólidos dissolvidos e o nebulizador de fluxo cruzado que funciona com o gás incidindo de maneira perpendicular ao fluxo da solução, portanto, se torna mais robusto e tolerante a matrizes complexas (HOU; JONES, 2000). Após a nebulização, o aerossol é conduzido à tocha de quartzo que é constituída por três tubos concêntricos nos quais circulam fluxos distintos de argônio: o gás externo (plasma) responsável por sustentar e isolar o plasma das paredes da tocha, o gás auxiliar que contribui para a estabilidade e posicionamento do plasma e o gás nebulizador que transporta o aerossol ao interior do plasma. A configuração da tocha influencia diretamente a região de observação e o desempenho analítico, sendo a configuração radial, na qual o plasma opera na orientação vertical, proporcionando maior robustez e menor suscetibilidade a efeitos de matriz, e é utilizada para determinações em níveis mais elevados de concentração, e na configuração axial, na qual a observação ocorre na posição horizontal, aumentando o caminho óptico e a sensibilidade, porém, pode aumentar as interferências espectrais e os efeitos de matriz. Após a emissão da radiação característica pelos átomos excitados no plasma, a radiação é direcionada para o policromador com grade de difração de alta resolução, onde ocorre a dispersão da radiação emitida em seus diferentes comprimentos de onda, permitindo a separação simultânea das linhas de interesse. Em seguida, a radiação dispersa atinge o detector (CCD) que converte a energia em sinal elétrico proporcional à intensidade da emissão e o encaminha ao sistema de processamento de dados.

A escolha pelo ICP-OES se justifica pela robustez da técnica e pela alta temperatura do plasma, que possibilita maior eficiência dos processos de vaporização, atomização e excitação dos analitos. Portanto, essa técnica apresenta elevado desempenho analítico, propiciando elevada sensibilidade e reprodutibilidade e interferências controláveis.

## **2.3 TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS E ESPECTROSCÓPICAS**

### **2.3.1. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)**

É uma técnica termoanalítica muito utilizada na caracterização térmica de materiais que é baseada na diferença de fluxo de calor entre uma amostra e um material de referência inerte, ambos submetidos a um mesmo programa térmico, permitindo identificar eventos associados a transformações físicas e químicas como fusão, cristalização, reorganizações estruturais, volatilização. O conceito dessa técnica fundamenta-se no monitoramento da energia necessária para manter a amostra e a referência em uma mesma temperatura ao longo da análise. A ocorrência de um evento térmico na amostra acarreta em uma variação no fluxo de calor em relação ao material de referência, sendo registrada em formas de picos endotérmicos ou exotérmicos. De forma geral, essa técnica detecta a decomposição térmica, possibilitando a compreensão das interações estruturais do material (HOHNE; HEMMINGER; FLAMMERSHEIM, 2003).

Na caracterização dos solventes eutéticos profundos (DES) e solventes eutéticos naturais profundos (NADES) a técnica possui um papel de extrema importância, pois os solventes são formados a partir da combinação de diferentes componentes que possuem uma forte interação através de ligações de hidrogênio. A formação de um sistema eutético está ligado à redução do ponto de fusão em relação aos percussores, permitindo estabelecer limites térmicos compatíveis e garantindo que as condições adotadas não promovam a degradação química do solvente, mas apenas alterações físicas e estruturais reversíveis (ABBOTT et al., 2003; ZHANG et al., 2012; DAI et al., 2013; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014). Em resumo, a determinação das transições térmicas através desta técnica possibilita estabelecer limites de temperatura adequados para utilização dos solventes. Desta forma é possível garantir que as condições experimentais utilizadas não promovam a degradação química, garantindo maior confiabilidade nos experimentos em que esses solventes serão utilizados.

### **2.3.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)**

É uma análise termoanalítica muito utilizada para avaliar a estabilidade térmica e a decomposição de diferentes materiais. É baseada no monitoramento da variação de uma pequena quantidade de massa de amostra que é aquecida de acordo com as condições de temperatura previamente estabelecidos sob fluxo controlado de gás (nitrogênio ou ar sintético) e mediante as variações de massa registradas durante o processo é possível identificar eventos que estão associados à perda de espécies voláteis, processos de degradação térmica, decomposição térmica (BROWN, 2001; IONASHIRO, 2004). Em conjunto com a TGA, tem-se a análise termogravimétrica derivada (Derivative Thermogravimetry – DTG) que é utilizada para determinar com maior precisão as etapas de perda de massa que ocorrem durante o aquecimento.

Na caracterização de solventes eutéticos profundos e solventes eutéticos naturais profundos essas análises são importantes para avaliar o comportamento térmico, pois é possível identificar diferentes etapas de perda de massa relacionadas à evaporação da água, volatilização de componentes e processos de decomposição térmica e também pode-se determinar temperaturas características associadas ao início da degradação térmica. Dito isto, os dados obtidos são fundamentais para definir condições experimentais mais adequadas garantindo que o solvente seja utilizado em faixas de temperaturas que não comprometam a estabilidade (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014; DAI et al., 2015).

A principal diferença em relação à Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA/DTG) está relacionada ao tipo de observação adquirida em cada técnica. A TGA/DTG avalia a variação de massa da amostra durante o aquecimento, já a DSC mede a diferença de fluxo de calor entre a amostra e um material de referência, portanto, são técnicas frequentemente utilizadas para caracterização térmica de materiais (BROWN, 2001; HOHNE; HEMMINGER; FLAMMERSHEIM, 2003).

## **2.4 QUÍMICA VERDE APLICADA NO PREPARO DE AMOSTRAS E MÉTRICAS VERDES NA QUÍMICA ANALÍTICA**

O preparo de amostras é considerado uma das etapas mais críticas de uma análise química, devido ao tempo necessário e onde ocorrem os maiores erros. Além disso, do ponto de vista ambiental, alguns procedimentos utilizam grandes volumes de solventes potencialmente perigosos, como, por exemplo, a digestão ácida, com o uso, em muitos casos, de ácido sulfúrico, fluorídrico, clorídrico e nítrico na decomposição de matrizes com diferentes características.. A química verde surgiu como uma abordagem voltada à prevenção e à redução dos impactos ambientais. Esse conceito foi proposto por Paul Anastas e John Warner e baseia-se no desenvolvimento de processos que reduzem o uso e a geração de substâncias perigosas ao meio ambiente e à saúde humana (ANASTAS; WARNER, 1998). Foram estabelecidos doze princípios da química verde que orientam o desenvolvimento de metodologias mais sustentáveis, reduzindo o consumo de reagentes e promovendo o uso de solventes menos tóxicos. Esses princípios têm sido empregados no desenvolvimento de métodos analíticos mais sustentáveis, o que deu origem ao conceito de química analítica verde (Green Analytical Chemistry – GAC), que tem o objetivo de reduzir o impacto ambiental das análises químicas ao longo do procedimento, desde a coleta até o momento do descarte de resíduos. (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; GALUSZKA et al., 2013; LÓPEZ-LORENTE et al., 2022; WOJNOWSKI et al., 2022).

A avaliação da sustentabilidade do método é um grande desafio, pois envolve vários parâmetros para serem analisados e tem-se a dificuldade de quantificar de maneira única e objetiva todos os aspectos relacionados ao impacto ambiental da metodologia, dificultando a padronização das avaliações. Portanto, o desenvolvimento de ferramentas que permitem avaliar o grau de sustentabilidade

doss procedimentos analíticos tornou-se necessário. Para isso, diferentes métricas verdes têm sido propostas com o objetivo de avaliar o impacto ambiental desses procedimentos, permitindo comparações entre diferentes atividades. Levam em consideração fatores como consumo de reagentes, toxicidade dos reagentes envolvidos, geração de resíduos, consumo energético e a segurança do processo.

Entre as métricas desenvolvidas, a métrica analítica de sustentabilidade (Analytical Greenness metric - AGREE) é baseada nos doze princípios da química verde (GAC), e as pontuações são de 0 a 1, sendo que valores próximos de 1 indicam métodos mais sustentáveis e permitem realizar comparações entre abordagens analíticas (PENA-PEREIRA et al., 2020). Outra métrica que pode ser utilizada é a métrica analítica de preparo de amostra sustentável (Analytical Greenness Metric for Sample Preparation - AGREEprep) que foi desenvolvida para avaliar a etapa de preparo de amostras que é baseada nos dez princípios do GSP (Green Sample Preparation) considerando critérios como a quantidade de amostra utilizada, consumo de solventes, toxicidade dos reagentes, geração de resíduos, consumo de energia e automação do processo. O AGREEprep fornece uma pontuação global que permite identificar os pontos fortes e limitações do procedimento (WOJNOWSKI et al., 2022).

As métricas mencionadas visam fornecer uma avaliação e comparação de sustentabilidade dos métodos que permitem identificar etapas que podem ser otimizadas para reduzir impactos ambientais, contribuindo para o desenvolvimento de metodologias analíticas mais seguras.

## **2.5 ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO**

A otimização de métodos é uma etapa fundamental no desenvolvimento de procedimentos experimentais, pois diferentes variáveis podem influenciar diretamente o desempenho analítico, afetando as respostas como a temperatura, massa da amostra, volume do solvente, tempo, entre outros. Dito isto, essa etapa tem o objetivo de identificar melhores condições experimentais e, por consequência, melhorar as respostas.

A otimização de métodos pode ser realizada através da estratégia univariada (one variable at a time - OVAT) no qual apenas um parâmetro experimental é variado enquanto os demais permanecem constantes, porém, esse tipo de abordagem mesmo sendo considerado simples apresenta algumas limitações sendo a dificuldade de avaliar possíveis interações entre as variáveis devido os fatores serem estudos de maneira isolada e pode ter um número elevado de experimentos, aumentando o consumo de reagentes, tempo de análises e também por não identificar as condições ótimas (BEZERRA et al., 2008). Diante dessas limitações, foi necessário buscar estratégias mais eficientes baseadas em planejamento experimental multivariado que permitem avaliar de maneira simultânea os efeitos de múltiplas variáveis e possíveis interações, tornando esse processo mais eficiente e mais rápido.

A metodologia de superfície de resposta (Response Surface Methodology - RSM) é um conjunto de técnicas estatísticas utilizadas para desenvolver modelos e otimizar processos em que uma ou mais respostas são influenciadas por diferentes variáveis. As equações obtidas pelo modelo são ajustadas com o objetivo de descrever o comportamento do sistema e permitir a previsão das respostas em diferentes condições experimentais, portanto, a RSM possibilita determinar de maneira simultânea os níveis ótimos das variáveis escolhidas, indicando o melhor desempenho analítico (BEZERRA et al., 2008). A utilização da RSM envolve algumas etapas sendo a etapa de triagem, que tem como objetivo identificar variáveis que apresentam influência significativa na resposta analítica, a etapa de modelagem da superfície de resposta através de delineamentos experimentais de segunda ordem que são capazes de descrever possíveis curvaturas e localizar pontos críticos correspondentes a máximos e mínimos.

Entre os delineamentos mais utilizados, tem-se o delineamento composto central (Central Composite Design - CCD), utilizado na construção de modelos quadráticos e na avaliação de curvaturas de superfície de resposta, composto por pontos fatoriais, axiais e centrais. O delineamento Box-Behnken (BBD) requer um número reduzido de experimentos, e os fatores são estudados em três níveis. Um ponto importante desse delineamento é a ausência de experimentos nos pontos extremos do domínio experimental, o que pode ser vantajoso em condições perigosas (FERREIRA et al., 2018). O delineamento Doehlert que é considerado uma alternativa mais econômica, pois permite estudar variáveis em diferentes números de níveis e pode ser aplicado a partir de duas variáveis (BEZERRA et al., 2008).

Diferentes variáveis podem influenciar a resposta analítica tornando-se necessário considerar essas respostas de forma conjunta durante o processo de otimização e a avaliação de maneira isolada de cada resposta pode não representar de maneira adequada as melhores condições experimentais para todos os analitos, portanto, torna-se necessário utilizar a abordagem de múltiplas respostas (Multiple Response - MR) que se baseia na combinação das respostas avaliadas (recuperação, sinal de intensidade) permitindo identificar condições experimentais que representem uma resposta adequada para os analitos estudados e é muito utilizada para sistemas multielementares. Esse resultado é obtido dividindo cada valor das medições individuais pelo valor máximo do conjunto de dados (BEZERRA et al., 2019).

As estratégias multivariadas representam ferramentas muito importantes para o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos, possibilitando a compreensão mais aprofundada das respostas obtidas do método desenvolvido contribuindo para obtenção de condições analíticas robustas e eficientes (BEZERRA et al., 2019).

## 2.6 OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (ODS) E O CONTEXTO AMBIENTAL

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) por meio da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável constituem orientações políticas públicas, estratégias de desenvolvimento e a produção científica em modelos sustentáveis de crescimento econômico, proteção ambiental e inclusão social (ONU, 2015) (Figura 14). No âmbito da pesquisa, os ODS fornecem um referencial conceitual e ético para o desenvolvimento de tecnologias, métodos analíticos que priorizem a sustentabilidade e a redução de impactos ambientais.

A pesquisa científica voltada ao desenvolvimento e otimização de métodos de preparo de amostras apresenta papel crucial na construção de soluções sustentáveis, sendo que os métodos analíticos podem ser utilizados para o monitoramento ambiental, avaliação da qualidade de ecossistemas, controle de contaminantes e a segurança do alimento. Estudos que envolvem matrizes biológicas possuem relevância, pois atuam como bioindicadores ambientais, refletindo a qualidade dos ecossistemas aquáticos (FAO, 2018). Dentre os ODS relacionados a esta pesquisa, destacam-se ODS 3 (Boa saúde e Bem-estar), ODS 6 (Água potável e saneamento), ODS 12 (Consumo e produção responsáveis) e o ODS 14 (Vida na água).



FIGURA 2 - 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)  
FONTE – GT Agenda 2030 (2015)

O ODS 3 tem como meta assegurar vida saudável, portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de nutrientes em pescados contribui para a avaliação da qualidade nutricional e o uso de metodologias analíticas mais sustentáveis também reduz a exposição a reagentes potencialmente perigosos frequentemente utilizados em procedimentos convencionais como a digestão ácida. O ODS 6 estabelece metas voltadas à melhoria da qualidade da água como redução da poluição, tratamento adequada de

efluentes e proteção de ecossistemas aquáticos destacando a necessidade de sistemas eficientes de monitoramento e controle de contaminantes utilizando a aplicação de técnicas analíticas para a determinação de nutrientes inorgânicas em matrizes biológicas que acabam refletindo a qualidade do ambiente em que está inserido. A utilização de técnicas baseadas em plasma (ICP-OES) associadas a estratégias de preparo de amostras mais sustentáveis permite a obtenção de dados analíticos confiáveis sobre a composição inorgânica de organismos aquáticos, contribuindo para a avaliação da qualidade ambiental. O ODS 12 propõe a transição para modelos de produção e consumo responsáveis, incentivando a redução do uso de substâncias tóxicas, a diminuição da geração de resíduos e o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente adequadas. Na química analítica, esse objetivo acontece através do desenvolvimento de metodologias baseadas nos princípios da química verde que buscam reduzir o impacto ambiental dos processos laboratoriais (ANASTAS; WARNER, 1998). A investigação e aplicação de solventes alternativos e a otimização de técnicas de preparo de amostras menos agressivas e tóxicas ao meio ambiente podem ser associadas a esse ODS, ou seja, a substituição parcial ou total de digestões ácidas convencionais por estratégias mais sustentáveis associadas a técnicas instrumentais de alta sensibilidade representa uma contribuição para a redução do consumo destes reagentes tóxicos e da geração de resíduos químicos. Já o ODS 14 tem o objetivo a conservação e o uso sustentável dos ecossistemas aquáticos com ênfase na redução da poluição, proteção da biodiversidade e preservação dos recursos naturais.

A análise de peixes fornece informações importantes, pois esses organismos acumulam nutrientes ao longo da cadeia trófica, atuando como indicadores de qualidade ambiental (FAO, 2018). A aplicação de técnicas analíticas avançadas para a determinação de elementos inorgânicos em peixes permite a avaliação da bioacumulação, fornecendo informações para políticas públicas de conservação ambiental e de segurança alimentar. Estudos realizados para o preparo de amostras utilizando solventes alternativos contribuem diretamente para os objetivos do ODS 14 ao gerar conhecimento científico aplicável à preservação dos ecossistemas aquáticos e à proteção da vida aquática. Ao integrar o desenvolvimento de estratégias de preparo de amostras e o uso de solventes alternativos sustentáveis (DES/NADES), estabelece-se um vínculo com os princípios dos ODS 3, 6, 12 e 14.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar e otimizar técnica de preparo de amostra alternativa de peixes visando a determinação de nutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) em tecido de peixe por técnica de plasma com foco em métodos ambientalmente responsáveis

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a digestão ácida assistida por micro-ondas e o método alternativo como a utilização de solventes eutéticos naturais (NADES);
- Utilizar técnicas de caracterização (TGA, DSC)
- Empregar planejamento experimental (DoE) e metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimização;
- Aplicar ferramentas estatísticas (ANOVA e demais testes estatísticos) para interpretação do modelo obtido;
- Validar as condições ótimas obtidas pelo modelo;
- Utilizar métrica verde (AGREEprep);
- Divulgar os resultados por meio de publicação de artigos científicos;

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

A pesagem dos reagentes e das amostras foi realizada em balança analítica (Shimadzu, modelo AUX220). As vidrarias utilizadas foram descontaminadas em banho ácido ( $\text{HNO}_3$  10% v v<sup>-1</sup>) por 24 h e submetidas a enxágue com água ultrapura e secagem em capela. O preparo das soluções foi realizado utilizando água ultrapura (Resistividade 18,2 MΩ cm, Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) e os solventes utilizados foram preparados à base de cloreto de colina puro (Êxodo Científica), ácido oxálico (Synth), ácido malônico 99% (Acros Organics), ácido fórmico 88% (J. T. Baker®), ácido nítrico 65% m m<sup>-1</sup> (Synth) e purificado por sistema de bi-destilação (Distilacid, modelo BSB-939-IR, Berghof, Eningen, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 35% v v<sup>-1</sup> (Neon). Para o método de referência, sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas com rotor para 12 frascos (Multiwave GO Plus, Anton Paar, Graz, Áustria) e para as extrações, banho termostático (Dubnoff, 90 ± 5°C, 90 minutos), ultrassom (7Lab, 45Hz, 35 ± 5°C, 60 minutos) e agitador de soluções (Phoenix Lufenco, AP-56, 50Hz). Nas etapas de separação, foram utilizados centrífuga (Fanem São Paulo – Brasil, 206 BL, 3000 rpm, 10 minutos) e filtros (Analítica, PTFE hidrofílico 22 µm). O material de referência (MR-AgroE3002A, Embrapa) foi utilizado na etapa de desenvolvimento de preparo de amostra, otimização e na validação do método.

### 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para o preparo do método de referência, utilizou-se um sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas com rotor para 12 frascos (Multiwave GO Plus, Anton Paar, Graz, Áustria). O programa de aquecimento empregado foi uma rampa de aquecimento de 10 minutos até atingir 100°C mantendo a temperatura por 10 minutos, seguida por uma outra rampa de 10 minutos até atingir 180°C mantendo a temperatura por mais 10 minutos. Após esta etapa, iniciou-se o resfriamento até a temperatura atingir 55 °C (Tabela 2). Já para o método alternativo, utilizou-se um banho termostático (Dubnoff, 90 ± 5 °C, 90 minutos), ultrassom (7Lab, 45Hz, 35 ± 5 °C, 60 minutos), agitador de soluções (Phoenix Lufenco, AP-56, 50Hz), centrífuga e filtros de 22 µm.

TABELA 2 - Programa de aquecimento utilizado no preparo de amostra utilizando a digestão ácida assistida por micro-ondas

	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Permanência (min)
1° Aquecimento	10	100	10
2° Aquecimento	10	180	10
Resfriamento	-	55	25

A determinação dos nutrientes inorgânicos (Ca, K, Mg, Na e P) foi realizada por meio da Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES - Agilent Technologies, 5110) utilizando argônio de alta pureza (99,99%), nebulizador Duramist, câmara de nebulização ciclônica e tocha de quartzo (Tabela 3). O preparo das soluções utilizadas para a curva analítica foi realizado a partir de diluição de soluções padrão comerciais de 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol, Quimilab Química & Metrologia, São Paulo).

TABELA 3 – Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Ca, K, Mg, Na e P por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES)

<b>Parâmetro Instrumental</b>	<b>Condição operacional</b>
<b>Potência aplicada ao plasma (kW)</b>	1,2
<b>Fluxo de gás no plasma ( L min<sup>-1</sup>)</b>	12
<b>Fluxo do gás de nebulização ( L min<sup>-1</sup>)</b>	0,7 ( todos analitos)
<b>Posição de visualização</b>	SVDV
<b>Tempo de estabilização (s)</b>	15
<b>Tempo de integração (s)</b>	3
<b>Nebulizador</b>	Duramist™
<b>Analitos</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>
Ca	422,673
K	766,491
Mg	285,213
Na	589,592
P	253,561

As análises para a caracterização dos solventes alternativos foram executadas na Embrapa Instrumentação de São Carlos, sendo realizadas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) utilizando um calorímetro (DSC Q200) equipado com um sistema de resfriamento. O ensaio foi conduzido na faixa de temperatura de 25 a 140 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Para análise termogravimétrica (TGA) foi utilizado um analisador termogravimétrico (TGA Q500) e a análise foi conduzida sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de gás de 60 mL min<sup>-1</sup> para a amostra e 40 mL min<sup>-1</sup> para o balanço. As análises foram conduzidas com aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> e temperatura até 300 °C.

#### 4.3 AMOSTRAS E ANALITOS ESTUDADOS

Na fase inicial de desenvolvimento de método, utilizou-se material de referência de tecido de peixe (MR-AgroE3002A, Embrapa) desenvolvido pela Embrapa Pecuária Sudeste em função de sua similaridade com as amostras utilizadas no projeto “Indicadores ambientais e socioeconômicos para a gestão

integrada participativa dos recursos hídricos da região estuarina do Rio São Francisco e das zonas costeiras adjacentes”. Os pescados foram coletados em diferentes pontos do corpo hídrico e de diferentes espécies com o objetivo de monitorar fatores naturais e antropogênicos (Tabela 4). As amostras foram liofilizadas por no mínimo 72 horas (Modelo EC, MicroModulyo, New York, EUA) e a moagem foi realizada com nitrogênio líquido e moinho analítico (A11 Basic, IKA). Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno devidamente fechados, identificados e armazenados para as próximas etapas.

TABELA 4 – Identificação das espécies de pescados utilizados no estudo

<b>NOME CIENTÍFICO</b>	<b>NOME POPULAR</b>
<i>Cathorops agassizii</i>	Bagre
<i>Lycengraulis grossidens</i>	Manjuba
<i>Lutjanus sp.</i>	Vermelha
<i>Eucinostomus melanopterus</i>	-
<i>Pygocentrus piraya</i>	Piranha
<i>Cichla kelberi</i>	Tucunaré amarelo
	Em Identificação

Os pescados são importante fontes de nutrientes como cálcio, potássio, magnésio e fósforo, pois desempenham funções fisiológicas vitais e a ingestão dos nutrientes está associada à prevenção de doenças (FAO, 2024). Dentre os nutrientes, o cálcio atua na formação de ossos e escamas e está associado aos mecanismos de controle da pressão osmótica que realiza o equilíbrio da água e dos sais minerais nos fluídos do corpo (osmorregulação) e acaba sendo influenciado tanto pela dieta quanto pela concentração no ambiente aquático e a deficiência desse macronutriente resulta em crescimento reduzido e alterações estruturais do esqueleto (LALL, 2021). O fósforo é um componente estrutural para adenosina trifosfato (ATP) que é a molécula transportadora de energia, ácidos nucleicos e dos fosfolipídios de membrana e a deficiência está relacionada à redução do crescimento e deficiência no metabolismo energético. O fósforo possui relevância nutricional e ambiental, pois seu excesso em ecossistemas aquáticos pode contribuir para processos de eutrofização impactando de maneira negativa ecossistemas aquáticos (HO et al., 2019). O magnésio atua como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo participando da síntese de proteínas por meio da liberação de energia garantindo a estabilidade dos ribossomos e a tradução do código genético, carboidrato e lipídios regulam a sensibilidade à insulina e a glicólise e a deficiência pode levar à redução do crescimento, alterações metabólicas e comprometimento do desempenho fisiológico (GROBER et al., 2015; SCHWALFENBERGS et al., 2017). Já o sódio e potássio são eletrólitos que desempenham papel na manutenção do equilíbrio osmótico e regulação do equilíbrio eletroquímico celular e alterações da

disponibilidade desses elementos pode comprometer mecanismos de osmorregulação e afetar o metabolismo (LALL, 2021).

#### **4.4 MÉTODO DE REFERÊNCIA: DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS**

As amostras foram digeridas por meio de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, em sistema fechado. Utilizou-se uma balança analítica e pesaram-se aproximadamente 200 mg de mostra, 6 mL de  $\text{HNO}_3$  25% v v<sup>-1</sup> e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% m m<sup>-1</sup> e foram submetidos ao programa de aquecimento (Tabela 2). Após esta etapa, os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno e avolumados para 20 mL com água ultrapura. Para não ultrapassar os limites de acidez do equipamento, foram realizadas as devidas diluições para a leitura.

#### **4.5 PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS (NADES)**

A preparação dos solventes eutéticos naturais (NADES) consistiu na mistura do cloreto de colina (ChCl – aceptor de ligação de hidrogênio – HBA) e diferentes doadores de ligação de hidrogênio (ácido fórmico (FA), ácido oxálico (OX) e ácido malônico (ML - HBD)) em diferentes proporções. Os tubos devidamente fechados foram submetidos a aquecimento em banho-maria a 90 °C por no mínimo 2 horas e a cada 15 minutos foram agitados para garantir a homogeneização. Os tubos foram retirados do banho-maria e armazenados, observando-se se o líquido permaneceria homogêneo em temperatura ambiente. Os NADES foram preparados na proporção 1:1 (HBA:HBD) e também com água para estudar o efeito de sua adição em sua composição variando de 1 a 4 mol (HBA:HBD:água).

#### **4.6 MÉTODO ALTERNATIVO: EXTRAÇÃO UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES)**

Inicialmente, a extração foi assistida por duas técnicas, que foram comparadas: banho ultrassônico e banho com aquecimento termostático. Com o auxílio de uma balança analítica, pesaram-se em um tubo de polipropileno de 15 mL aproximadamente 150 mg da amostra de tecido de peixe (MR – Agro E3002A, Embrapa). A seguir, foram adicionados 3 mL de NADES e as misturas submetidas a banho ultrassônico (60 minutos,  $35 \pm 5^\circ\text{C}$ , 45 Hz) e banho com aquecimento termostático (90 minutos,  $90 \pm 5^\circ\text{C}$ , 180 rpm) com agitação. Após os proporcionais tempos de extração, as amostras foram avolumadas para 10 mL utilizando água ultra pura e os extratos centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e filtradas (Analítica, PTFE Hidrofílico 22  $\mu\text{m}$ ). Vale ressaltar que a etapa de centrifugação foi realizada em um único tubo, evitando perdas de amostra na transferência. As soluções foram devidamente diluídas com uma solução de  $\text{HNO}_3$  1% v v<sup>-1</sup> e realizadas as leituras na técnica de plasma escolhida. A partir desta comparação, foi escolhida uma técnica de extração e realizada a otimização para aprimorar a extração.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES)

A escolha dos ácidos orgânicos como doadores de ligação de hidrogênio (HBD) para a formação dos solventes eutéticos profundo naturais (NADES) está relacionada com a baixa toxicidade quando comparados a outros doadores de ligação de hidrogênio sintéticos e por apresentarem maior variedade no mercado. A formação do NADES ocorre pelas ligações de hidrogênio entre o ânion cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) proveniente do cloreto de colina e os hidrogênios ácidos dos grupos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) dos ácidos orgânicos.

Os solventes eutéticos profundo naturais (NADES) foram preparados a partir da mistura do cloreto de colina ( $\text{ChCl} - \text{HBA}$ ) com diferentes doadores de ligação de hidrogênio (HBD) sendo ácido fórmico (FA), ácido oxálico (OX) e ácido malônico (ML) na proporção molar 1:1 ( $\text{HBA}:\text{HBD}$ ). O preparo baseou-se na formação de sistemas líquidos e homogêneos por meio de uma rede extensa de ligações de hidrogênio (ABBOTT et al., 2003). A escolha dos doadores de ligação de hidrogênio está relacionada com as propriedades ácido-base sendo o  $\text{pK}_a$  (dissociação ácida) que determina a capacidade de doar prótons. Por apresentarem menor grau de dissociação em comparação aos ácidos minerais fortes, os ácidos orgânicos possuem grupos carboxílicos parcialmente protonados que favorecem a formação de redes de ligações de hidrogênio com o cloreto de colina (HBA). Essas interações são fundamentais para a formação e estabilização do solvente sendo responsáveis pelas propriedades físico-químicas características dos NADES. O ácido fórmico apresenta  $\text{pK}_a = 3,75$ , ácido oxálico  $\text{pK}_{a1} = 1,23$  e  $\text{pK}_{a2} = 4,28$ , e ácido malônico  $\text{pK}_{a1} = 2,80$  e  $\text{pK}_{a2} = 5,70$  influenciam a propriedades físico-químicas como viscosidade, polaridade e eficiência de extração. Além, disso, foram preparados NADES com adição de água em sua composição (1 a 4 mol) com o objetivo de avaliar o efeito da água na estrutura e desempenho do solvente. A água pode atuar como moduladora da rede de ligações de hidrogênio estabelecendo interações com o HBA e HBD, portanto, essa reorganização intermolecular reduz a força de interações entre os componentes do solvente acarretando na diminuição da viscosidade e também o favorecimento da eficiência de extração (DAI et al., 2015).

### 5.2 EXTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZANDO NADES

A extração dos analitos foi realizada por duas técnicas diferentes, sendo banho ultrassônico e banho com aquecimento termostático. Para que uma extração seja efetiva parâmetros como tempo, temperatura e volume do solvente desempenham papel importante para a eficiência na extração, portanto, para o estudo inicial optou-se por condições intermediárias reportadas na literatura para a obtenção de recuperações adequadas. A comparação entre os preparos de amostra demonstrou que o banho ultrassônico apresentou desvios maiores (DPR %) e recuperações inferiores quando comparado com o banho termostático (Figuras 3, 4

e 5). Esse comportamento pode estar relacionado à viscosidade dos NADES na composição 1:1, que limita a propagação eficiente das ondas ultrassônicas (cavitação), dificultando a interação entre amostra e solvente extrator e também devido à temperatura alcançada pelo equipamento. Já o banho termostático proporcionou maiores recuperações e desvios menores, que podem ser associados ao tempo e à temperatura utilizada que favoreceu a redução da viscosidade do solvente. Vale ressaltar que não foi possível utilizar os mesmos parâmetros de tempo e temperatura para ambas as técnicas de extração, devido às limitações dos equipamentos. A temperatura foi fixada durante os experimentos no banho termostático com o objetivo de minimizar variações experimentais, pois o equipamento não possui um controle rigoroso da temperatura e esse tipo de variação pode introduzir erros aleatórios no processo analítico, afetando a reprodutibilidade dos resultados.

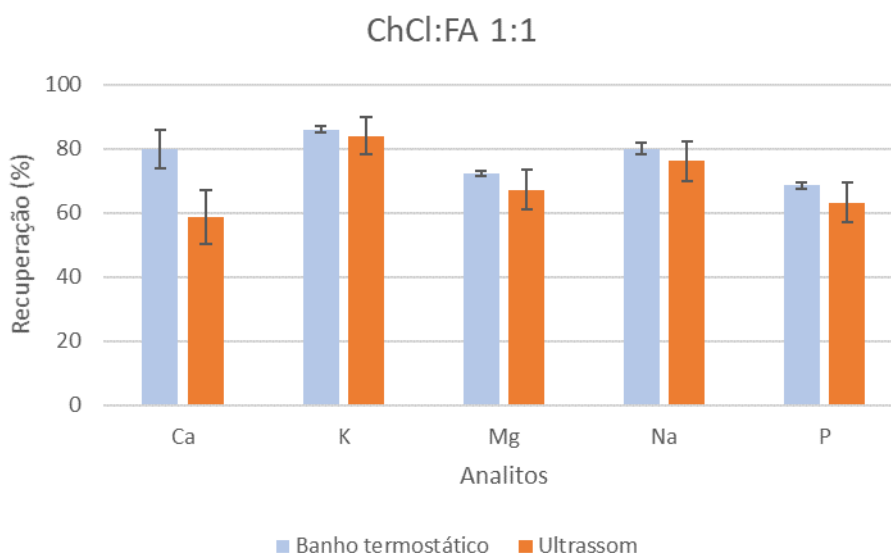


FIGURA 3 – Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido fórmico (1:1), n=2

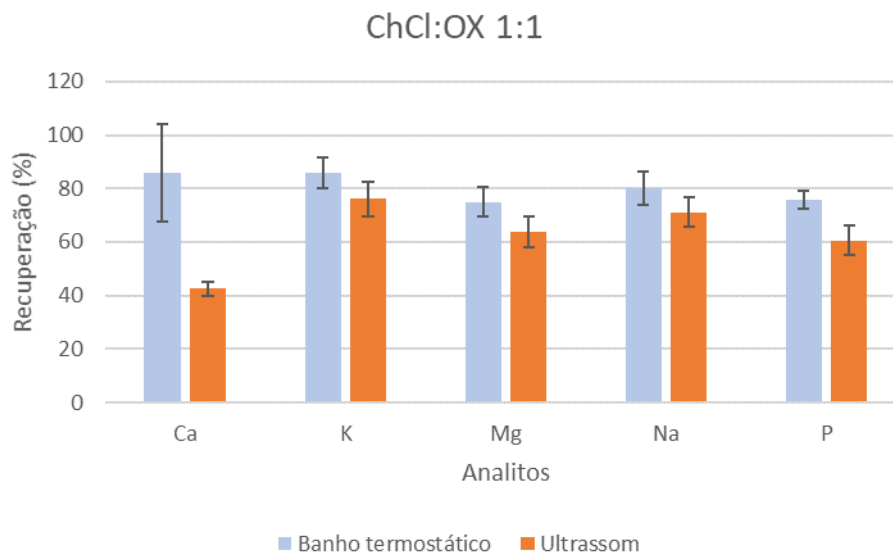


FIGURA 4 - Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido oxálico (1:1), n=2

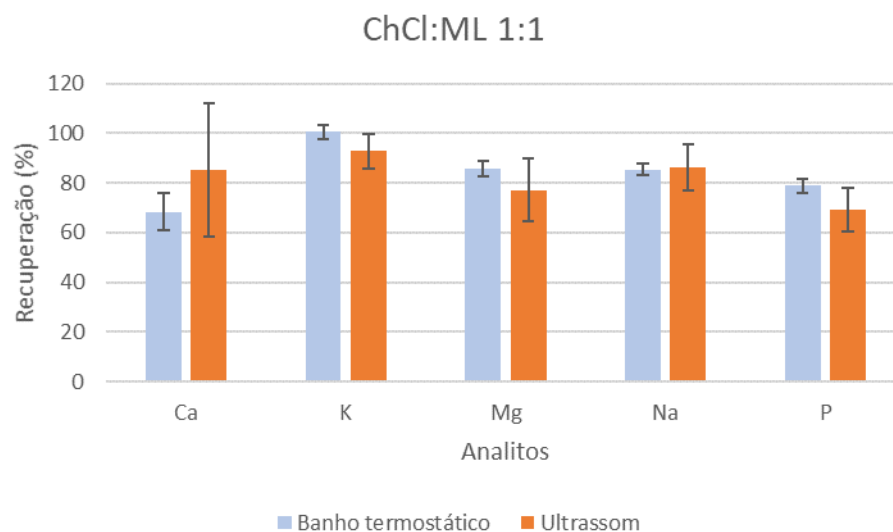


FIGURA 5 – Recuperação (%) e Desvio Padrão Relativo (DPR %) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) dos macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) obtidos após extração utilizando NADES composto por cloreto de colina e ácido malônico, n=2

Após a avaliação inicial dos NADES na proporção 1:1, conduziu-se o estudo com água, na composição dos solventes, com o objetivo de melhorar o desempenho na etapa de extração dos analitos e utilizar solventes extratores mais brandos. Em quantidades adequadas, a água reduz significativamente a viscosidade, favorecendo a interação entre a amostra e o solvente. Vale ressaltar que para as diluições das amostras foi utilizado HNO<sub>3</sub> 1% devido à estabilização das espécies metálicas na solução para evitar precipitação.

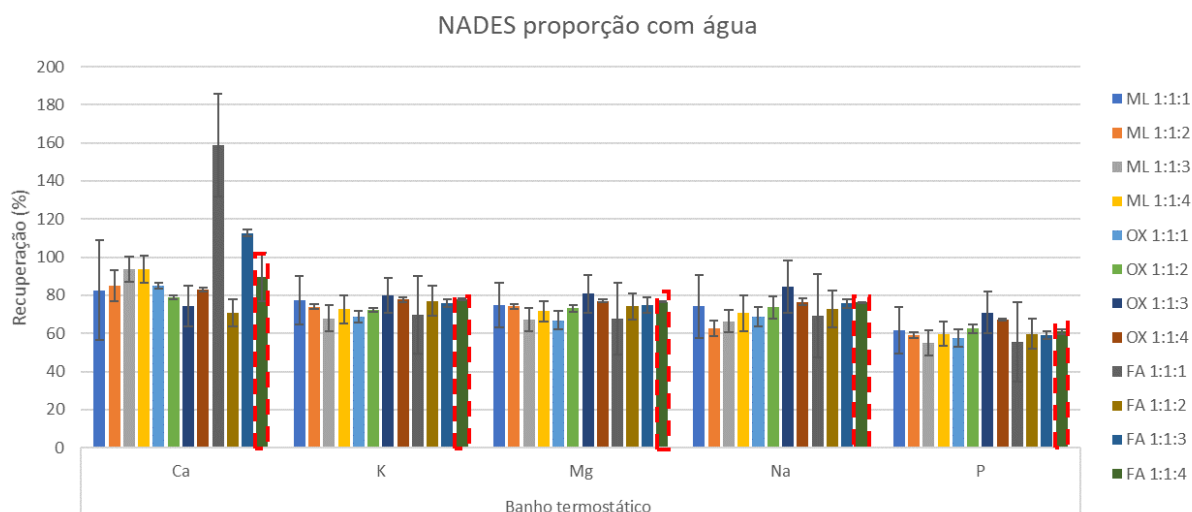


FIGURA 6 - Recuperações (%) e DPR (%) de amostra de referência (Tecido de peixe, MR – Agro E3002A) variando a proporção de água na composição do NADES, n=2

O ácido fórmico favorece a extração dos analitos devido à presença do grupo carboxílico (-COOH) que possui átomos de oxigênio que são capazes de interagir com íons metálicos e também por apresentar menor estrutura molecular entre os ácidos carboxílicos avaliados (ácido oxálico e malônico), o ácido fórmico possui baixa viscosidade favorecendo a transferência de massa para a fase extratora (SCHAEFFER et al., 2018; SHISHOV et al., 2022). O NADES formado por cloreto de colina:ácido fórmico:água na proporção 1:1:4, destacado em vermelho (Figura 6), foi selecionado para as próximas etapas, pois as recuperações (%) foram de 60-90% e DPR (%) de 0,3-13%, apresentou menor viscosidade em comparação aos demais solventes formados e o ácido fórmico, por ter menor acidez ( $pK_a = 3,75$ ), contribuiu para condições mais brandas para extração.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO NADES

#### 5.3.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA) permite compreender tanto a estabilidade térmica quanto os processos físico-químicos envolvidos na organização estrutural. Eventos observados por DSC são classificados como endotérmicos, que correspondem a processos que absorvem energia térmica, como fusão, evaporação, reorganizações estruturais que exigem quebra de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, forças dipolo-dipolo), e eventos exotérmicos são processos que liberam energia como cristalização, reorganização de estruturas e decomposição (SMITH et al., 2014; BROWN, 2001).

A formação de um DES/NADES ocorre por meio da reorganização molecular de seus precursores em uma nova fase líquida que acarreta alterações em algumas

propriedades, como viscosidade, polaridade, capacidade de solvatação; portanto, é importante compreender a organização estrutural e a estabilidade. A estabilidade térmica do sistema NADES cloreto de colina–ácido fórmico–água (1:1:4) foi avaliada por meio da análise integrada das curvas TGA, DTG e DSC (Figura 9).

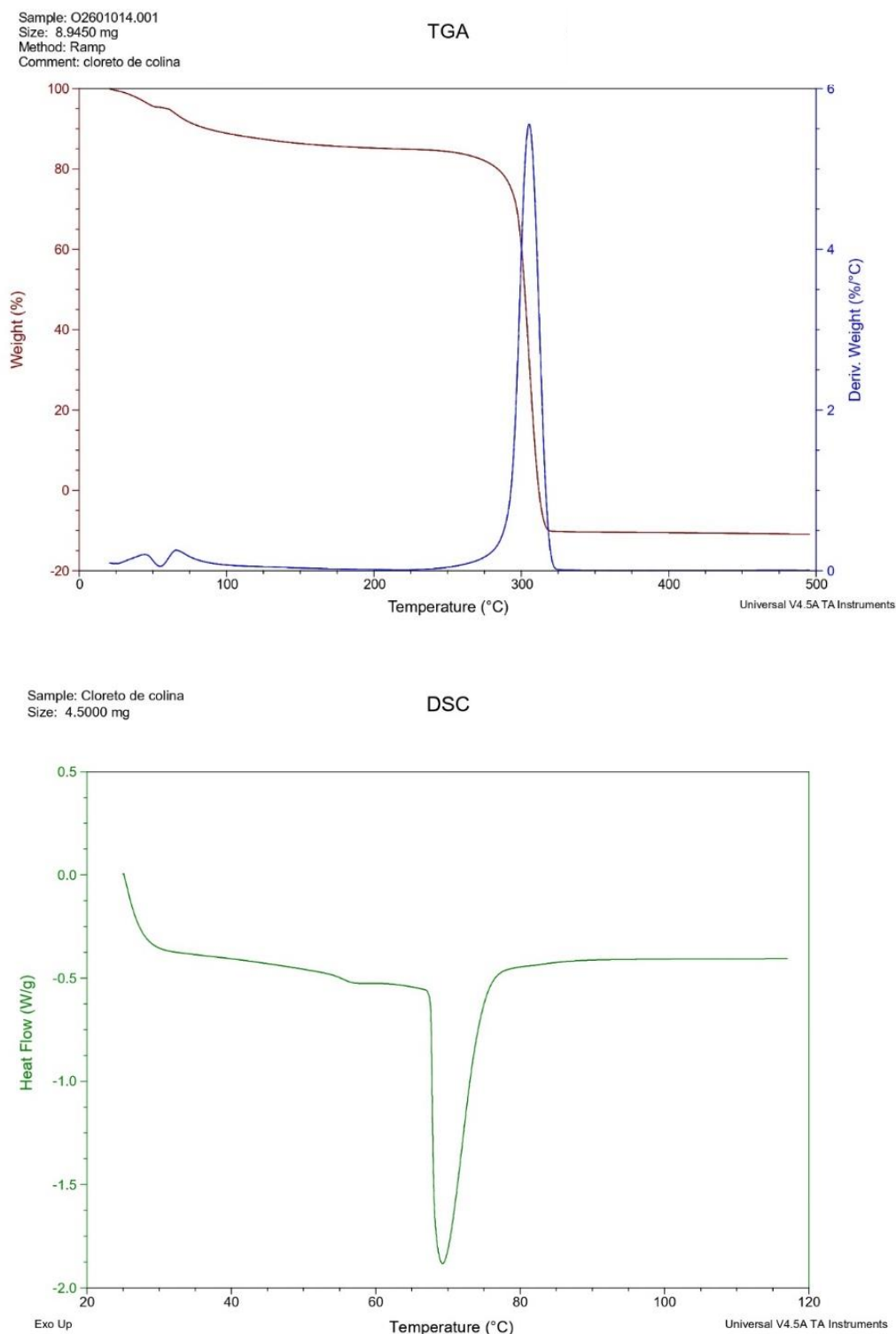


FIGURA 7 – Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do cloreto de colina

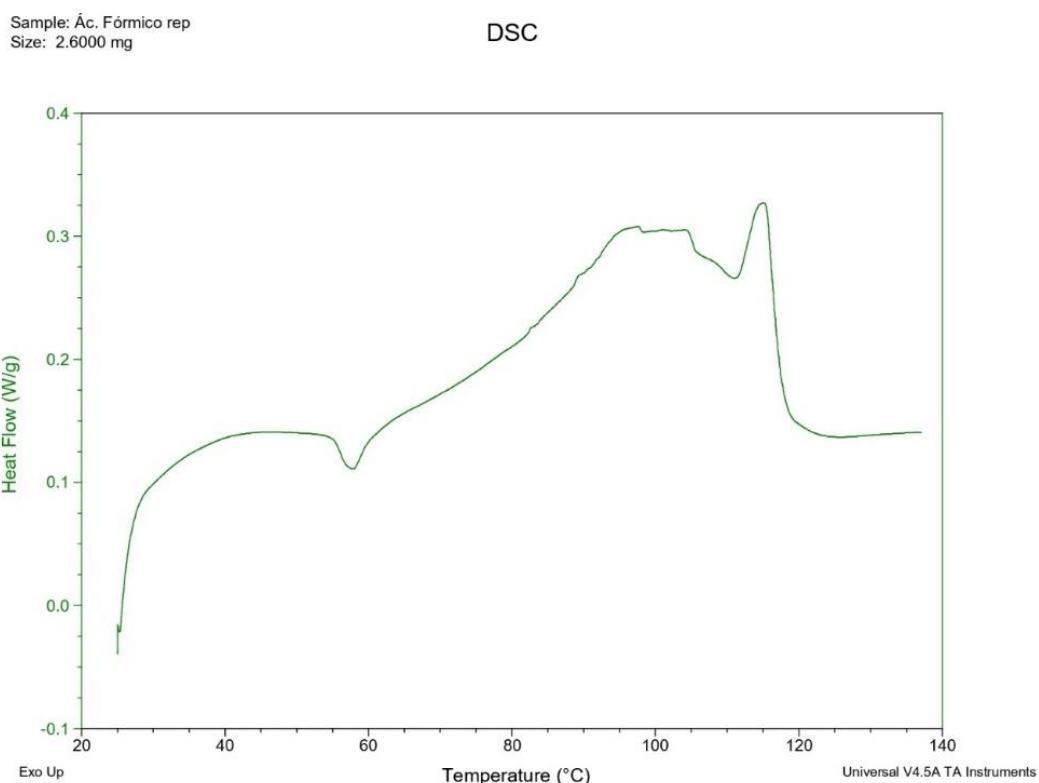
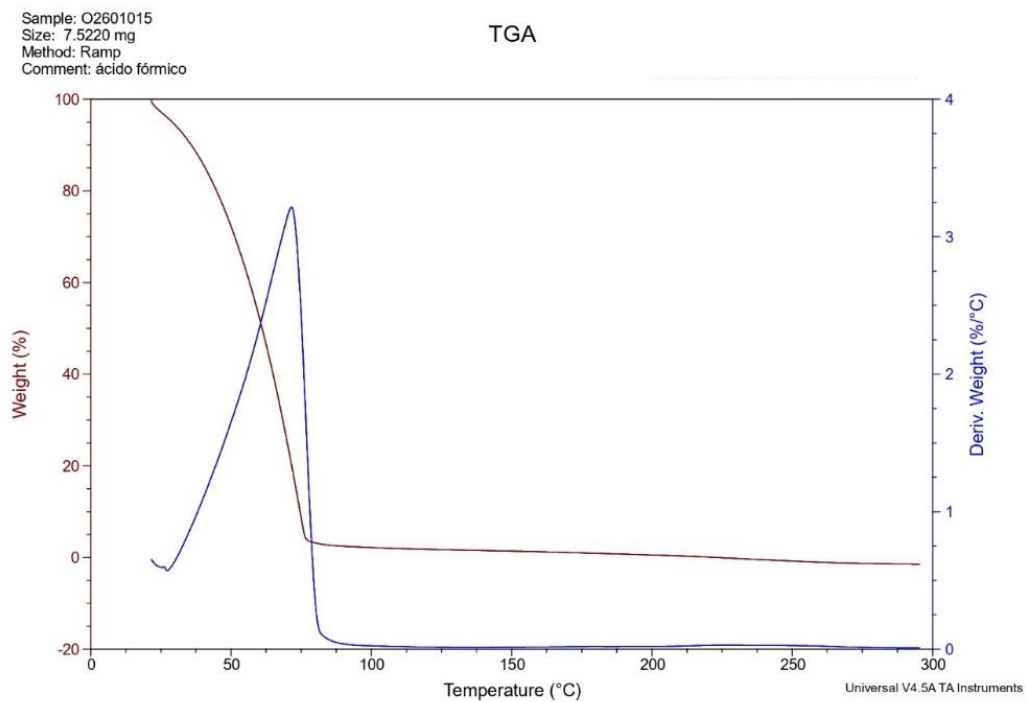


FIGURA 8 – Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do ácido fórmico

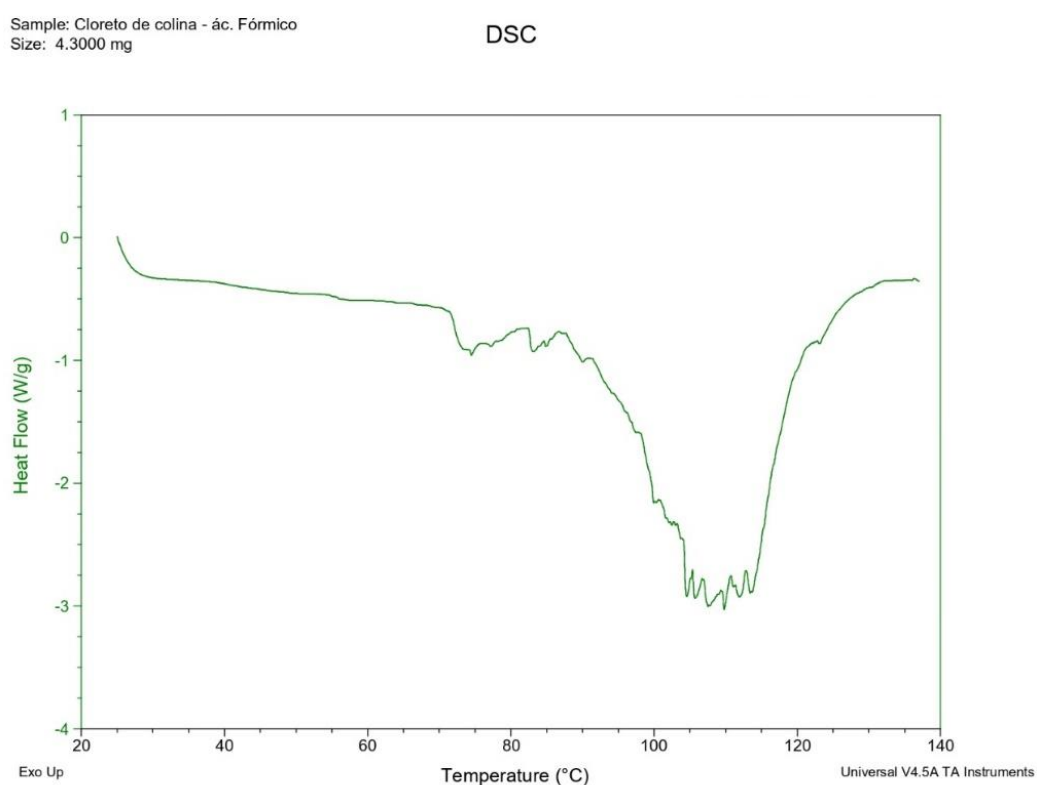
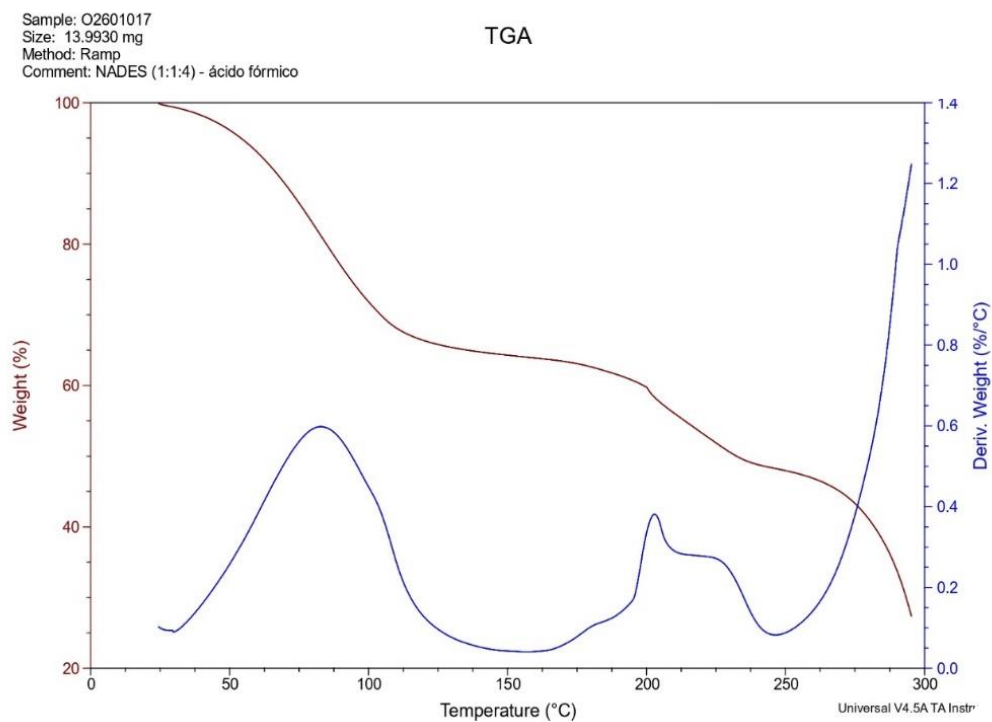


FIGURA 9 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do NADES composto por cloreto de colina, ácido fórmico e água na proporção molar 1:1:4

Nas Figuras 7 e 8, estão representadas as análises de TGA e DSC dos precursores cloreto de colina e ácido fórmico, respectivamente. Para o cloreto de colina, a perda de massa significativa que indica a degradação térmica ocorre em temperaturas de aproximadamente 300°C. Já para o ácido fórmico, a degradação térmica ocorre em temperaturas de aproximadamente 80°C. Na Figura 9, até aproximadamente 100°C, observa-se uma perda inicial de massa na curva TGA, relacionada à liberação de espécies voláteis e fracamente ligadas à estrutura do solvente, principalmente água estrutural e frações do ácido fórmico. Dito isto, a presença de quatro partes de água na composição do solvente (1:1:4) exerce papel importante na organização do NADES, pois a água participa diretamente da formação da rede de ligações de hidrogênio, atuando como uma interação entre o cloreto de colina e o ácido fórmico, favorecendo a estabilidade do sistema (CHOI et al., 2011; DAI et al., 2015). Do ponto de vista térmico, a água contribui para a perda de massa (< 100°C), associada à liberação de água fracamente ligada sem indicar decomposição química, e promove maior flexibilidade na composição do solvente, redução da viscosidade e aumento da mobilidade molecular do NADES. A curva DSC apresenta eventos endotérmicos que podem ser a volatilização ao longo da faixa de temperatura que não necessariamente correspondem à decomposição química do sistema, mas a fenômenos físicos de reorganização estrutural e desorganização parcial da rede intermolecular que são característicos destes solventes, ampliando a eficiência de solvatação (CHOI et al., 2011; SMITH et al., 2014; DAI et al., 2015). Aproximadamente na faixa de 95-180°C, a perda de massa ocorre de forma lenta e gradual, sem picos intensos na curva DTG (em azul), evidenciando a liberação gradual de espécies mais fortemente ligadas, o que indica que o ácido fórmico não se encontra como molécula livre, mas ligada à estrutura do NADES. A partir de 180–200°C, observa-se um aumento acentuado da taxa de perda de massa na TGA, acompanhado por um pico na DTG (em azul) caracterizando o início da decomposição térmica do sistema, que está associada à degradação do cloreto de colina e à ruptura da rede eutética, o que configura o limite de estabilidade térmica do solvente. A utilização do NADES em processos de extração a 90 °C é quimicamente segura, sem ocorrer degradação térmica do solvente.

#### **5.4 DESENVOLVIMENTO DO MODELO E OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA**

Após a definição do NADES (ChCl: FA: água 1:1:4) como solvente extrator e do banho termostático como técnica de extração, foi realizada a etapa de otimização das variáveis. O desenvolvimento do modelo empregou o planejamento experimental do tipo Doehlert e foram avaliadas duas variáveis independentes: volume de NADES (mL) e tempo de extração (min). As variáveis independentes são fatores experimentais que podem ser controlados, ou seja, parâmetros que podem ser ajustados com o objetivo de avaliar sua influência sobre a resposta. No presente estudo, o volume de NADES (mL) e o tempo de extração (min) foram definidos como variáveis, pois são parâmetros potencialmente capazes de influenciar a eficiência da extração. Já a variável dependente é a múltipla resposta (MR) que representa a

junção das recuperações dos cinco analitos (Ca, K, Mg, Na e P) determinados de maneira simultânea por técnica de plasma (ICP-OES).

O planejamento Doehlert caracteriza-se pela distribuição uniforme dos pontos experimentais, proporcionando a exploração eficiente da superfície de resposta com um número reduzido de experimentos. Para dois fatores, os ensaios são distribuídos geometricamente, de modo a permitir estimar os efeitos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis. Foram realizados seis experimentos distribuídos e três repetições no ponto central, as quais permitiram a estimativa do erro puro e a avaliação da reprodutibilidade (Tabela 5).

TABELA 5 – Matriz experimental do planejamento Doehlert e resposta experimental (MR)

Experimento	DES – X (mL)	Tempo – Y (min)	MR
1	4,0	90	4,96
2	3,5	120	4,27
3	2,0	90	4,40
4	2,5	60	4,05
5	3,5	60	4,14
6	2,5	120	4,19
7 <sup>PC</sup>	3,0	90	4,60
8 <sup>PC</sup>	3,0	90	4,62
9 <sup>PC</sup>	3,0	90	4,49

<sup>PC</sup> Ponto central

Os dados experimentais foram ajustados a um modelo quadrático de segunda ordem que inclui termos lineares (A e B), termos quadráticos (A<sup>2</sup> e B<sup>2</sup>) e termo de interação (A\*B). A segunda ordem é devida à presença dos termos quadráticos que são fundamentais em estudo de otimização, pois permite descrever comportamentos não lineares e identificar pontos de máximo ou mínimo na superfície de resposta.

TABELA 6 – Análise de variância para o modelo quadrático obtida no planejamento Doehlert

Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	p-value	R <sup>2</sup>
Regressão	0,63	5	0,12	10,39	0,041** ✓	0,954 (95,4%) ✓
Falta de ajuste	0,03	1	0,03	5,01	0,155*** ✓	
Erro puro	0,01	2	0,01			
Total	0,66	8				

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>)

\* Nível de confiança de 95% (p = 0,05)

\*\* Modelo significativo (p < 0,05) - ✓ Adequado

\*\*\* Falta de ajuste NÃO significativa (p > 0,05) - ✓ Adequado

A análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático ajustado (Tabela 6) foi utilizada para avaliar a significância estatística da regressão, qualidade do ajuste e a capacidade explicativa do modelo. A soma de quadrados da regressão ( $SS=0,63$ ;  $gl= 5$ ) representa a fração da variabilidade da resposta que é explicada pelos termos do modelo (lineares, quadráticos e de interação). Quanto maior esse valor em relação à soma dos quadrados totais, maior é a capacidade do modelo de descrever o comportamento do sistema. Já a soma de quadrados total ( $SS=0,66$ ;  $gl= 8$ ) corresponde à variabilidade global observada experimentalmente, ou seja, à dispersão total dos dados em relação à média geral. A partir da razão entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados total obtém-se o coeficiente de determinação ( $R^2=0,954$ ) e esse parâmetro indica a proporção da variabilidade da resposta (MR) que é explicada pelo modelo. Desta forma, um  $R^2$  de 0,954 indica que 95,4% da variação observada experimentalmente pode ser descrita pela equação quadrática proposta, enquanto aproximadamente 4,6% está associada a fatores que não podem ser explicados pelo modelo. O valor de F indica quantas vezes a variabilidade explicada pelo modelo é maior do que a variabilidade residual, ou seja, compara a média quadrática da regressão ( $MS_{regressão}$ ) com a média quadrática do erro ( $MS_{erro}$ ). Considerando o nível de significância de 95%, o valor de F calculado foi de 10,39 com p-valor de 0,041, pode-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa, ou seja, a probabilidade de que a variação explicada pelo modelo tenha ocorrido de maneira aleatória é inferior a 5% indicando que os termos lineares, quadráticos e de interação contribuem de forma relevante para explicar a variação da resposta. A avaliação da falta de ajuste apresentou p-valor de 0,155 que é superior a 5% o que indica que a falta de ajuste não é significativa, ou seja, a diferença entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo são compatíveis com o erro puro ( $SS=0,01$ ;  $gl = 2$ ) que foi estimado pelas replicatas no ponto central. Considerando a significância da regressão (p-valor < 0,05), ausência de falta de ajuste (p-valor > 0,05) e o coeficiente de determinação ( $R^2= 95,4\%$ ) pode-se concluir que o modelo quadrático de segunda ordem apresenta ajuste estatisticamente adequado.

TABELA 7 - Condição ótima de extração predita pelo modelo matemático obtido por metodologia de superfície de resposta

Fator	Valor*	R-Predita
<b>Volume NADES (mL)</b>	4	4,896
<b>Tempo (min)</b>	90	

\*Determinado a partir do modelo com melhor ajuste

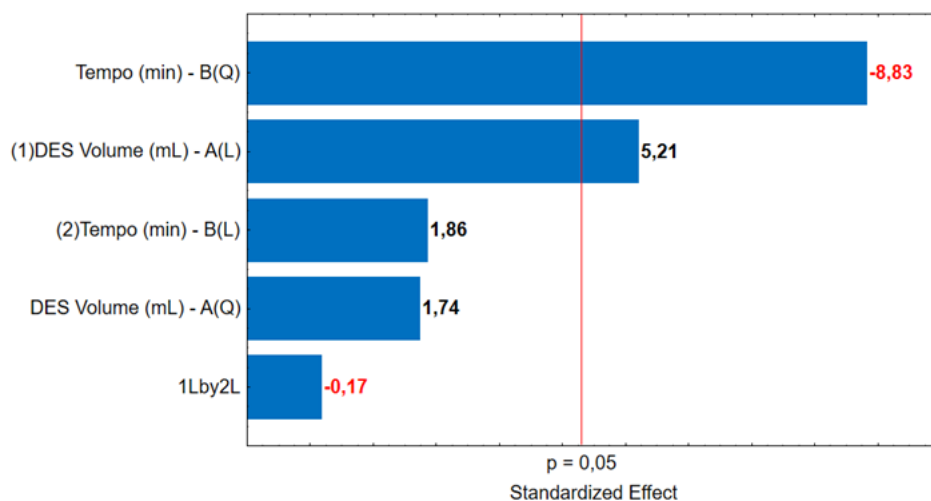


FIGURA 10 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados obtidos no planejamento Doehlert

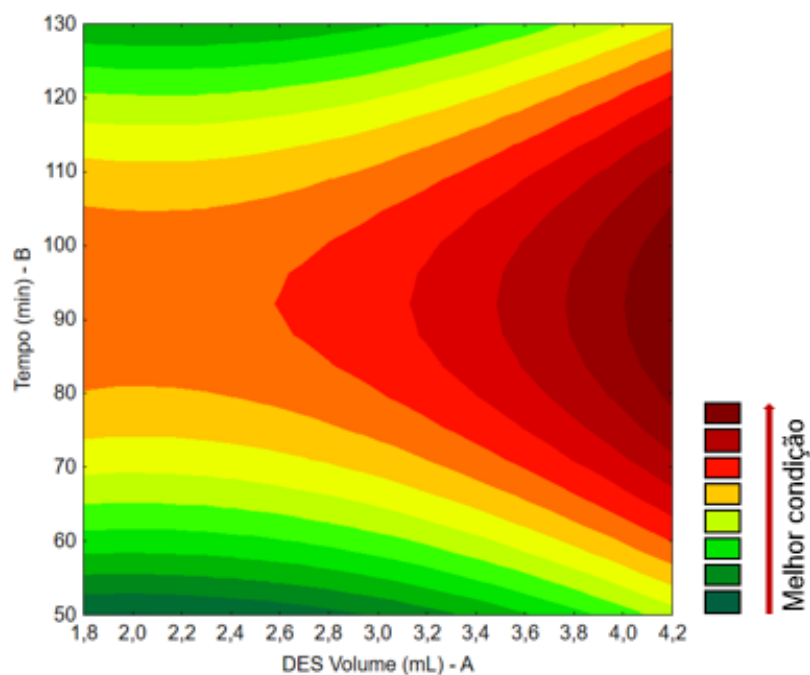


FIGURA 11 – Gráfico de contorno obtida pelo planejamento Doehlert

Através do modelo quadrático de segunda ordem obteve-se a seguinte equação:

$$z = 0,7296 - 0,4290x + 0,1137x^2 + 0,0902y - 0,000482y^2 - 0,000417xy$$

(Equação 2)

Onde  $z$  representa a capacidade preditiva,  $x$  o volume de NADES (mL) e  $y$  tempo de extração (min).

A análise dos coeficientes do modelo permite compreender, de forma mais simples, como cada variável influencia a resposta (Equação 2). Para o volume de NADES ( $x$ ), observa-se que o coeficiente do termo linear é negativo ( $x$ ), enquanto o coeficiente do termo quadrático ( $x^2$ ) é positivo, mostrando comportamento curvilíneo da resposta em função dessa variável, ou seja, indica que o efeito do volume não é totalmente linear; portanto, a resposta não diminui de maneira constante ao longo de toda a faixa testada. O termo linear negativo sugere que de início o aumento do volume tende a reduzir a resposta, porém, a presença do termo quadrático positivo mostra uma curvatura da superfície mudando essa tendência ao longo da faixa estudada. Para o tempo de extração ( $y$ ), o coeficiente linear ( $y$ ) é positivo e o termo quadrático ( $y^2$ ) é negativo. O termo linear positivo mostra que, de início o aumento do tempo favorece a resposta promovendo maior eficiência de extração. Porém, o termo quadrático negativo também indica a presença de um ponto máximo no domínio experimental. Esse comportamento confirma que aumentos excessivos no tempo não necessariamente resultam em melhoria da resposta devido ao efeito de curvatura representado pelo termo quadrático. O modelo descreve matematicamente uma superfície com região ótima por meio de modelos quadráticos de segunda ordem aplicados à metodologia de superfície de resposta (RSM).

O gráfico de Pareto e os efeitos padronizados (SE) representam a relevância dos coeficientes do modelo ajustados pelo erro padrão, ou seja, correspondem aos coeficientes divididos pela respectiva estimativa de incerteza, permitindo avaliar a significância estatística de cada termo. Eventuais diferenças de sinal entre os coeficientes da equação e os efeitos apresentados no Pareto podem ocorrer devido à padronização estatística, o que não representa inconsistência entre os resultados. A equação do modelo descreve o comportamento físico do sistema, o gráfico de Pareto mostra quais termos exercem influência estatisticamente significativa sobre a resposta. Na figura 10, mostra-se que o termo quadrático do tempo apresenta o maior efeito estatístico ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) seguido pelo termo linear do volume.

A partir da substituição das condições ótimas determinadas pelo modelo (Tabela 7) e utilizando a equação (Equação 2), obteve-se um valor da capacidade preditiva do modelo de 4,89 indicando o aumento da resposta analítica nas condições otimizadas. Para realizar a verificação da confiabilidade do modelo, realizou-se a validação experimental da região ótima (4 mL de NADES e 90 minutos de extração) realizada em triplicata ( $n=3$ ) e o valor médio da capacidade experimental foi 4,71 que é muito próximo do valor previsto do modelo (4,89). A diferença pequena entre os valores experimentais e previsto demonstra boa concordância entre os resultados, portanto, o modelo apresenta adequada capacidade preditiva.

## 6 VALIDAÇÃO

### 6.1 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados linearmente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa analítica (ANVISA, 2017). A avaliação da linearidade foi realizada através de curvas analíticas para cada elemento (Ca, K, Mg, Na e P) com sete níveis e três réplicas por nível, com o intuito de avaliar o coeficiente de correlação ( $r$ ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ), análise dos resíduos da regressão e a verificação de heterocedasticidade. De acordo com o INMETRO, os resultados obtidos demonstraram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação ( $r$ ) acima de 0,995 indicando alta linearidade dentro da faixa dinâmica estudada, assegurando confiabilidade dos resultados (Tabela 8)

TABELA 8 – Parâmetros das curvas analíticas, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de correlação e faixas lineares obtidas para a determinação dos analitos por ICP - OES

Analitos	Equação da reta	$R^2$	$r$	Faixa linear ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Ca	$y = 46866x + 650,33$	0,999	0,999	0,09 - 15
K	$y = 1422x + 31,55$	0,999	0,999	0,2 - 15
Mg	$y = 13875x - 343,52$	0,996	0,997	0,01 - 15
Na	$y = 8448x + 1935,3$	0,999	0,999	0,06 - 15
P	$y = 444,95x + 5,78$	0,999	0,999	0,09 - 15

A homocedasticidade refere-se à maneira como as variâncias dos erros experimentais se distribuem ao longo da faixa linear analisada, ou seja, a dispersão dos resíduos não depende do nível de concentração. Já a heterocedasticidade ocorre quando o tamanho dos resíduos não é constante, ou seja, apresenta aumento ou redução à medida que a concentração aumenta. Em situações de homocedasticidade, a regressão linear simples pelos mínimos quadrados ordinários não ponderados é apropriada; já quando se tem heterocedasticidade, faz-se necessária a aplicação de modelos de regressão ponderada. Dito isto, o teste de Cochran foi aplicado para avaliar a presença de heterocedasticidade (Tabela 9). Os valores de C calculados foram inferiores ao valor de C tabelado (0,561) o que mostra que todas as curvas analíticas possuem comportamento homocedástico, portanto, foi utilizado o modelo de regressão linear simples utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados para a quantificação dos analitos.

TABELA 9 – Avaliação da homogeneidade de variâncias (Teste de Cochran) aplicado aos dados de linearidade

<b>COCHRAN</b>		
<b>Analitos</b>	<b>C calculado</b>	<b>Condição</b>
<b>Ca</b>	0,477	Homocedástico
<b>K</b>	0,453	Homocedástico
<b>Mg</b>	0,464	Homocedástico
<b>Na</b>	0,455	Homocedástico
<b>P</b>	0,459	Homocedástico

$$C_{\text{tabelado}} = 0,561$$

A normalidade dos resíduos foi avaliada por teste de Shapiro – Wilk que é utilizado para verificar se os erros experimentais seguem uma distribuição normal. Os resultados indicaram que os resíduos apresentam distribuição normal, ou seja, o valor calculado foi maior que o valor tabelado (0,908) indicando que os desvios entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo são aleatórios e independentes (Tabela 10).

TABELA 10 – Avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro Wilk aplicado às curvas analíticas

<b>SHAPIRO - WILK</b>		
<b>Analitos</b>	<b>SW<sub>calculado</sub></b>	<b>Resíduo</b>
<b>Ca</b>	0,923	Normal
<b>K</b>	0,954	Normal
<b>Mg</b>	0,960	Normal
<b>Na</b>	0,927	Normal
<b>P</b>	0,965	Normal

$$SW_{\text{tabelado}} = 0,908$$

A adequação do modelo de regressão foi confirmada por meio da análise de variância (ANOVA) (Tabela 11). Os elevados valores de F calculado ( $gl = 1,19$ ) e valores de p menores que 5% para todos os analitos indicam que a regressão é estatisticamente significativa e que existe relação entre a variável independente (concentração) e a variável dependente (sinal analítico), portanto, os resultados demonstram que o modelo explica uma grande parte da variabilidade dos dados obtidos.

TABELA 11 - Análise de variância (ANOVA) da regressão linear das curvas analíticas utilizadas na validação do método

ANOVA		
Analitos	F <sub>calculado</sub>	p - valor
Ca	32949	3,04E-32
K	40542	4,25E-33
Mg	63366	6,11E-35
Na	36780	1,07E-32
P	34335	2,06E-32

F<sub>tabelado</sub> = 4,38

## 6.2 ESTUDO DE EFEITO DE MATRIZ

A avaliação do efeito de matriz tem como objetivo identificar se os elementos estão sendo quantificados de forma seletiva, ou seja, sem influência de componentes que estão na amostra (INMETRO, 2020) e essa etapa é importante para comprovar a seletividade do método analítico.

TABELA 12 – Avaliação do efeito de matriz por comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas realizadas sem matriz e com matriz determinadas por ICP – OES

Analitos	Coefficiente angular - sem matriz	Coefficiente angular - matriz	t - calculado	p - valor
Ca	47458,6	47454,8	0,01	1,0
K	1425,5	1416,4	0,7	0,5
Mg	13872,8	13839,1	0,8	0,5
Na	8415,7	8249,3	2,8	0,1
P	434,9	434,3	1,4	0,3

t - tabelado = 4,3

Utilizou-se o tecido de peixe (MR – Agro E3002A, Embrapa) devido à similaridade em relação às amostras que foram utilizadas posteriormente. Dito isto, foram construídas curvas analíticas com e sem matriz, cada curva com sete níveis de concentração preparados e cada nível em triplicata. A curva analítica sem matriz foi preparada utilizando NADES 2,66% (v v<sup>-1</sup>) com o objetivo de realizar a compatibilização de matriz para minimizar possíveis diferenças de composição e efeitos no processo de nebulização durante a determinação no instrumento. Os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas foram comparados através de teste t pareado (gl = 2). A partir dos resultados obtidos (Tabela 12), demonstra que a matriz não causa efeito em relação a determinação dos elementos, pois o t – calculado é menor que o t – tabelado (4,30) e os valores de p foram acima de 5%, portanto, o método apresenta seletividade adequada.

### 6.3 LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como a menor concentração do analito detectável, porém, a quantificação não é estatisticamente confiável. Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração que pode ser determinada de forma quantitativa confiável (ANVISA, 2017). Na tabela 13, os limites foram calculados a partir da expressão simplificada pelo INMETRO (Equações 3 e 4) e foi considerado o desvio padrão (s) das medições do branco (n=10) e o coeficiente angular (b).

$$LOD = 3,3 s/b \text{ (Equação 3)}$$

$$LOQ = 10 s/b \text{ (Equação 4)}$$

TABELA 13 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações realizadas em ICP-OES

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	LOD	LOQ
<b>Ca</b>	0,03	0,09
<b>K</b>	0,07	0,2
<b>Mg</b>	0,003	0,01
<b>Na</b>	0,02	0,06
<b>P</b>	0,03	0,09

Os resultados de LOD e LOQ indicam boa sensibilidade do método em baixas concentrações, ou seja, o método apresenta desempenho analítico adequado para determinar nutrientes inorgânicos (Ca, K, Mg, Na e P).

### 6.4 VERACIDADE

A veracidade expressa o grau de concordância entre o valor médio a partir do resultado experimental e o valor de referência, sendo a exatidão a combinação entre a veracidade e precisão (VIM, 2012). A avaliação da veracidade pode ser realizada por diferentes abordagens, sendo a utilização de materiais de referência certificados (CRM), comparação de métodos de referência e adição e recuperação dos analitos (INMETRO, 2020). A veracidade do método foi avaliada por meio da análise de material de referência tecido de peixe (MR – Agro E3002A) e de ensaios de adição e de recuperação na matriz. O critério de aceitabilidade para recuperação está representado na Tabela 14, os valores determinados para o material de referência tecido de peixe estão representados na Tabela 15 e os ensaios de adição e recuperação na Tabela 16.

TABELA 14 – Critério de aceitação para recuperação

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média, %
100	1	100%	98 – 102
10	10 <sup>-1</sup>	10%	98 – 102
1	10 <sup>-2</sup>	1%	97 – 103
0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	95 – 105
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: AOAC, 2016

TABELA 15 – Valores de referência (base seca), concentrações determinadas e recuperações obtidas para o material de referência de tecido de peixe (MR-Agro E3002A, Embrapa, n=3)

Analitos	Valor certificado ± U (mg kg <sup>-1</sup> )	Valor obtido ± IC (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
<b>Ca</b>	466,89 ± 32,06	456,62 ± 11,83	98
<b>K</b>	10282,76 ± 9,38	9085,73 ± 7,90	88
<b>Mg</b>	902,53 ± 9,76	836,99 ± 6,87	93
<b>Na</b>	1160,59 ± 28,42	897,53 ± 8,01	77
<b>P</b>	5931,05 ± 6,35	4509,02 ± 5,83	76

U = incerteza

IC = intervalo de confiança

TABELA 16 – Recuperações obtidas para quatro níveis de concentração (mg L<sup>-1</sup>) no ensaio de adição e recuperação determinado por ICP-OES

Concentração adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)				
	Ca	K	Mg	Na	P
1,5	89	98	93	101	119
3	98	98	95	99	107
9	101	101	99	99	108
15	102	99	99	97	100

A utilização do material de referência tecido de peixe (MR – Agro E3002A) contendo as concentrações conhecidas dos analitos estudados (Ca, K, Mg, Na e P) permitiu avaliar a eficiência do método, pois os resultados obtidos envolvem todas as etapas do preparo de amostra. Após a etapa de extração, foram realizados ensaios de adição e recuperação com objetivo de verificar o comportamento instrumental avaliando aspectos relacionados ao sistema de introdução de amostra e eficiência de nebulização. As recuperações foram avaliadas utilizando a faixa de aceitabilidade de 80 – 110%, pois o método proposto envolve etapa de extração utilizando solventes mais brandos (NADES) e estão de acordo com a literatura

(Tabela 1). Dito isto, as recuperações obtidas para o material de referência (Tabela 15) indicaram desempenho satisfatório para cálcio, potássio e magnésio, com valores acima de 80%; porém, sódio e fósforo apresentaram recuperações inferiores, que podem ser atribuídas a estarem mais fortemente ligados a estruturas celulares, o que dificulta a completa extração destes analitos durante o preparo da amostra. Já no ensaio de adição e recuperação na matriz (Tabela 16), as recuperações obtidas indicaram desempenho satisfatório.

## 6.5 PRECISÃO

A precisão é um parâmetro que mede a concordância entre os resultados obtidos a partir de medições repetidas; ou seja, representa a proximidade entre os valores medidos em ensaios replicados de uma mesma amostra (VIM, 2012). É expresso por medidas estatísticas como coeficiente de medição (CV) e é utilizado para definir a repetibilidade e a reprodutibilidade de medição (VIM, 2012). Para avaliar a precisão do método, realizou-se a repetibilidade a partir dos valores obtidos em quatro níveis diferentes de concentração, com seis réplicas cada, e também foram avaliados os desvios-padrão relativos (DPR%) utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Na Tabela 17 os valores obtidos da repetibilidade, determinado por diferentes níveis de concentração determinado por ICP-OES.

TABELA 17 – Avaliação da repetibilidade do método em diferentes níveis de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) determinado por ICP -OES

Analitos	Concentração adicionada ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração obtida ( $\text{mg L}^{-1}$ )						DPR(%)
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	
Ca	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,1
	3	2,9	2,9	2,8	3,0	2,9	2,8	2,7
	9	9,0	9,0	8,9	9,1	9,1	8,9	0,9
	15	15,2	15,0	14,9	15,2	15,2	14,9	1,0
K	1,5	1,4	1,4	1,6	1,5	1,4	1,5	5,2
	3	3,0	3,1	3,0	3,0	3,0	3,1	1,8
	9	8,9	8,9	9,0	9,1	9,1	9,1	1,1
	15	14,8	14,7	15,0	14,9	14,8	15,0	0,9
Mg	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	0,9
	3	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	0,5
	9	8,9	9,0	8,9	9,0	9,0	8,9	0,4
	15	14,8	14,8	14,9	14,8	14,9	14,8	0,2
Na	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	3	3,0	3,0	2,9	3,0	3,0	3,0	1,0
	9	8,9	8,9	8,9	8,9	9,0	8,9	0,5
	15	14,6	14,7	14,7	14,7	14,8	14,7	0,4
P	1,5	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,9	1,2
	3	3,3	3,4	3,3	3,3	3,3	3,3	1,3
	9	9,2	9,3	9,2	9,2	9,2	9,2	0,4
	15	14,9	14,9	15,0	14,9	15,0	15,0	0,4

De acordo com os resultados, todos os níveis de concentração avaliados apresentaram valores de DPR % inferiores a 5%, indicando uma boa precisão e confiabilidade do método.

## 7 DETERMINAÇÃO DE NUTRIENTES INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE PEIXES

Com o objetivo de comparar o desempenho analítico dos métodos de preparo de amostra, utilizando digestão ácida convencional com HNO<sub>3</sub> e extração com NADES, foram avaliados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Os limites obtidos para os elementos Ca, K, Mg, Na e P, utilizando o método convencional (HNO<sub>3</sub> 3,75% v v<sup>-1</sup>) e o método alternativo (NADES 2,66% v v<sup>-1</sup>) no preparo das amostras, encontram-se apresentados nas Tabelas 18 e 19.

TABELA 18 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações utilizando HNO<sub>3</sub> no preparo de amostra

Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> ) - HNO <sub>3</sub>		
	LOD	LOQ
Ca	22,4	68,0
K	88,3	267,5
Mg	1,8	5,5
Na	21,4	64,9
P	24,8	75,0

TABELA 19 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as quantificações utilizando NADES no preparo de amostra

Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> ) - NADES		
	LOD	LOQ
Ca	60,3	182,7
K	98,7	299,0
Mg	40,7	123,4
Na	26,6	80,5
P	43,3	131,3

Os limites de detecção e de quantificação demonstraram diferenças entre os preparos. Os menores valores foram observados para o método convencional (HNO<sub>3</sub>), o que indica maior sensibilidade analítica quando comparado ao método

alternativo (NADES). Para o método convencional, o ácido utilizado foi previamente purificado por destilação abaixo de seu ponto de ebulição (sub-boiling), o que acaba reduzindo de maneira significativa a presença de impurezas. A utilização de reagentes com elevado grau de pureza acaba por refletir-se em valores menores de LOD e LOQ. Já para o método alternativo, os percursos não foram submetidos a processo de purificação, o que pode acarretar maiores impurezas, elevando o sinal do branco analítico e, conseqüentemente, aumentando os valores de LOD e LOQ. Apesar dos limites obtidos para o método alternativo (NADES) terem sido superiores, não houve comprometimento da aplicabilidade do método, pois os elementos avaliados estão presentes em teores relativamente elevados nos tecidos de peixe sendo que os limites estão adequados, garantindo sensibilidade suficiente para a quantificação.

TABELA 20 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos convencional e alternativo para determinação de Ca, K, Mg, Na e P no material de referência tecido de peixe (MR – Agro E3002A, Embrapa, n=3)

	Ca	DPR (%)	K	DPR (%)	Mg	DPR (%)	Na	DPR (%)	P	DPR (%)
REC (%) - HNO <sub>3</sub>	100,6	9,4	95,8	4,4	75,1	5,8	83,5	5,3	91,8	4,9
REC (%) - NADES	84,0	17,4	91,8	0,12	77,6	0,43	60,2	0,18	76,8	0,19

A determinação dos macroelementos (Ca, K, Mg, Na e P) foi realizada utilizando dois métodos de preparo de amostras, sendo a digestão ácida assistida por micro-ondas (método convencional) e a extração utilizando solvente eutéctico profundo natural (NADES) ChCl:ácido fórmico:água na proporção de 1:1:4, conforme previamente estabelecido nos experimentos anteriores. A avaliação do desempenho foi realizada por meio da análise do material de referência para verificar a veracidade do método (Tabela 20).

Para o método convencional, foram obtidas recuperações mais próximas de 75-101%, o que indica boa exatidão do método, demonstrando que o procedimento de digestão foi eficiente na decomposição da matriz orgânica. Já para o método alternativo, foi observado que as recuperações obtidas foram inferiores às observadas para o método convencional (Tabela 20), portanto, mesmo que o NADES apresente potencial para a extração de alguns elementos, a eficiência depende das características químicas dos analitos e da interação destes com a matriz e solvente extrator. Por exemplo, observou-se recuperação acima de 92% para o potássio e, para o sódio, uma recuperação de 60%, o que indica que o processo de extração utilizando NADES pode não ter sido muito eficiente para promover a disponibilidade do analito, devido ao NADES não promover a completa decomposição da matriz orgânica. Apesar das recuperações inferiores observadas para alguns elementos, os resultados mostram que o método alternativo possui potencial, uma vez que a utilização de NADES como solvente extrator apresenta vantagens do ponto de vista da química analítica verde, como a redução do uso de ácidos minerais concentrados e o uso de solventes com menor toxicidade.

TABELA 21 - Concentrações médias dos macronutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e DPR (%) das amostras analisadas via método convencional

Amostras	Método convencional ( $\text{mgKg}^{-1}$ )									
	Média e DPR (%)									
	Ca		K		Mg		Na		P	
376	279,6	62,2	18308,7	9,9	930,4	3,6	2412,0	1,5	7197,5	6,0
402	1307,0	40,5	16343,1	5,8	998,5	3,6	2898,8	4,2	13044,7	3,7
420	11102,8	6,2	18394,2	9,3	966,9	4,0	2588,0	3,9	8018,3	6,1
424	2282,7	40,6	20137,1	3,6	912,4	7,5	1869,2	7,6	8480,9	6,1
430	67,8	49,7	16408,3	6,5	1064,1	2,6	2603,6	1,9	8572,2	11,9
434	2816,6	68,4	16011,0	5,6	919,8	4,0	2475,6	2,2	7780,699	11,4
535	1901,5	99,0	21289,3	0,8	1094,2	1,5	1962,3	2,0	10039,5	1,5
538	1050,1	14,4	17808,8	4,5	1022,2	5,7	1421,1	6,7	8872,351	5,8
539	1468,5	15,8	19901,8	8,1	1173,1	5,0	1531,2	4,7	9734,479	5,1
553	1697,7	15,9	23490,6	16,3	1137,7	1,4	1538,2	0,4	9350,626	1,3

Tabela 22 - Concentrações médias dos macronutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e DPR (%) das amostras analisadas via método alternativo

Amostras	Método alternativo ( $\text{mgKg}^{-1}$ )									
	Média e DPR (%)									
	Ca		K		Mg		Na		P	
376	1003,3	28,4	13401,6	2,3	928,2	1,8	2167,1	2,4	5679,1	2,3
402	9773,7	3,8	13825,7	1,7	994,6	4,3	2670,1	1,7	10926,7	2,8
420	1354,6	37,1	14126,9	4,0	1005,3	5,1	2339,1	4,5	6506,0	5,7
424	206,6	61,6	17231,5	0,9	984,9	2,1	1661,2	2,0	7469,0	0,7
430	1004,2	75,8	14853,3	1,5	1051,4	2,6	2262,2	1,5	6382,2	5,8
434	1252,8	65,2	13720,2	1,8	939,2	6,2	2143,0	2,8	6085,12	9,2
535	922,9	29,2	18809,2	0,8	1112,6	0,5	1683,9	1,3	8379,669	0,9
538	1398,2	43,1	15661,0	1,0	1101,5	8,4	1164,0	3,2	7473,104	0,9
539	2689,0	49,2	16999,0	0,1	1196,6	0,8	1262,3	0,7	8739,221	7,1
553	1258,1	7,1	17221,5	0,8	1178,9	2,5	1215,4	1,5	7687,989	0,7

Nas Tabelas 21 e 22, foram selecionadas dez amostras para avaliação da aplicabilidade do método alternativo (NADES) utilizando banho termostático com agitação em comparação com o método convencional de digestão ácida assistida por micro-ondas e as análises foram realizadas em triplicatas. Para comparação entre os métodos estudados (convencional e alternativo), foi aplicado o teste F com nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) para avaliar a homogeneidade das variâncias entre os grupos. O resultado desse teste foi utilizado como critério para seleção do teste t mais adequado, ou seja, quando o teste F indicou ausência de diferença significativa entre as variâncias ( $p > 0,05$ ) aplicou-se o teste t considerando variâncias equivalentes e quando observou-se diferença estatística entre as variâncias ( $p < 0,005$ ) utilizou-se o teste t para variância não equivalente.

Para o cálcio, observou-se diferenças estatísticas para as amostras 376, 402 e 420 ( $p < 0,05$ ), enquanto as demais amostras apresentaram valores de p superiores a 0,05 indicando que o método alternativo foi capaz de extrair o cálcio de forma semelhante ao método convencional para a maior parte das amostras estudadas. Para o potássio, foi observado a presença de diferenças estatísticas significativas entre os métodos para várias amostras sendo as amostras 376, 402, 420, 424, 538 e 539 indicando que a digestão ácida assistida por micro-ondas promove uma decomposição mais eficiente da matriz orgânica, porém, algumas amostras não

apresentaram diferenças estatísticas indicando que a eficiência do método alternativo pode variar de acordo com a composição da matriz. Em relação ao sódio, foi indicado que os resultados obtidos pelos dois métodos alternativos foram estatisticamente diferentes e esse comportamento está relacionado à maior eficiência da digestão ácida na ruptura da matriz e liberação do sódio presente na amostra. Para o fósforo, apenas as amostras 424 e 539 não apresentaram diferenças estatísticas entre os métodos, pois o fósforo está presente em formas orgânicas complexas (fosfolipídios) que necessita de uma decomposição mais eficiente da matriz para ficar completamente disponível. Por fim, para o magnésio não foram observadas diferenças estatísticas entre os métodos para nenhuma das amostras ( $p > 0,05$ ) demonstrando concordância entre os métodos de preparo de amostras estudados, ou seja, o método alternativo utilizando NADES apresentou desempenho comparável ao método convencional para a determinação.

Os resultados utilizando o método alternativo (NADES) demonstrou potencial para a determinação de macronutrientes em amostras de pescados, especialmente para magnésio e também apresentando vantagens relacionadas à redução do uso de ácidos minerais concentrados, menor geração de resíduos químicos.

## 8 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZANDO MÉTRICAS VERDES (AGREEprep)

A avaliação da sustentabilidade dos métodos foi realizada através da métrica AGREEprep que considera os princípios do GSP (Green Sample Preparation) permitindo avaliar o impacto ambiental associado à etapa de preparo de amostra (ANEXO 2). Essa métrica considera diferentes parâmetros como a quantidade de amostra utilizada, consumo e toxicidade de reagentes, geração de resíduos, consumo energético e nível de automação do processo (WOJNOWSKI et al., 2022).

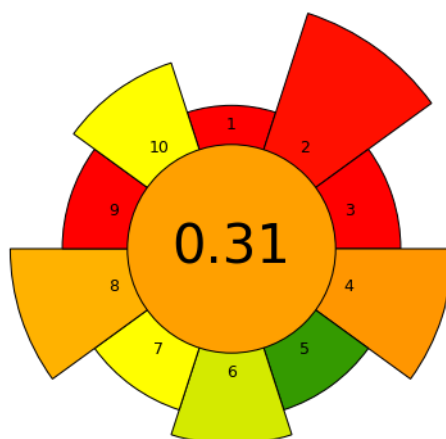


FIGURA 12 – Avaliação da sustentabilidade do método convencional de preparo de amostras por digestão ácida assistida por micro ondas utilizando a métrica AGREEprep



FIGURA 13 – Avaliação da sustentabilidade do método alternativo de preparo de amostras utilizando NADES e banho termostático com agitação utilizando a métrica AGREEprep

Para o método convencional (Figura 12), baseado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, foi obtida uma pontuação de 0,31, enquanto o método alternativo utilizando NADES sob aquecimento em banho

termostático com agitação (Figura 13) apresentou pontuação de 0,48 indicando uma melhoria na sustentabilidade do método. Em relação ao princípio 1, ambos os métodos não foram realizados *in situ*, pois precisaram de etapas laboratoriais para o preparo da amostra. No princípio 2 (utilização de solventes e reagentes mais seguros), o método convencional utilizou  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  que são amplamente empregados devido a eficiência na decomposição da matéria orgânica, porém, são classificados como corrosivos e potencialmente perigosos ao operador. Já no método alternativo foi utilizado um solvente mais brando, no caso NADES composto por cloreto de colina, ácido fórmico e água (1:1:4), reduzindo parcialmente a utilização de ácidos minerais fortes, porém, apesar de menor toxicidade do solvente eutético a pontuação não foi elevada devido ao volume de solvente utilizado (4 mL), pois a métrica AGREEprep considera a periculosidade e a quantidade de reagente utilizada simultaneamente. No princípio 3 (uso de materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis), o método alternativo apresentou vantagem devido à utilização de compostos considerados menos agressivos e biodegradáveis. Para o princípio 4 (redução do desperdício), o método alternativo apresentou melhoria devido à utilização de um único tubo durante as etapas de extração e centrifugação minimizando perdas de amostra e ao menor consumo de reagentes agressivos se comparado ao método convencional que utilizou 6 mL de  $\text{HNO}_3$  e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No princípio 5 (diminuição da quantidade de amostra, reagentes e materiais), ambos os métodos empregaram pouca massa de amostra (200 mg e 150 mg, respectivamente). O princípio 6 (aumento de rendimento analítico), no método convencional o número de amostras processadas por extração foi limitado pela capacidade operacional, ou seja, no método convencional foi realizado doze amostras simultaneamente. Já o método alternativo utilizando o banho termostático apresentou melhora no rendimento analítico, realizando a extração de quarenta amostras ao mesmo tempo no banho termostático com agitação, portanto, mesmo apresentando maior tempo de extração (90 minutos), o método alternativo demonstrou maior fluxo analítico. O princípio 7 (integração de etapas e automação), apresentou limitação para ambos os métodos principalmente para o alternativo devido às etapas adicionais de centrifugação e filtração. No princípio 8 (minimização do consumo energético), apesar da necessidade de extração por um período mais prolongado, o método alternativo apresentou maior eficiência quando avaliado em relação ao número de amostras processadas por ciclo analítico, portanto, o consumo energético foi distribuído entre um número maior de amostras resultando em melhor aproveitamento do consumo energético. No princípio 9 (escolha da técnica analítica), ambos os métodos apresentaram pontuações reduzidas, pois a determinação dos analitos foi realizada por ICP-OES. Embora a técnica possua vantagens analíticas como elevada sensibilidade, ampla faixa de trabalho e capacidade de determinação simultânea dos elementos é necessário a utilização de argônio de alta pureza e elevado consumo energético. Por fim, o princípio 10 (segurança do procedimento), o método alternativo apresentou melhoria em relação ao convencional devido à menor utilização de substâncias corrosivas, reduzindo riscos operacionais e a geração de resíduos químicos perigosos.

A diferença entre as pontuações obtidas por ambos os métodos está associada ao melhor desempenho do método alternativo nos princípios 3, 6, 8 e 10 da métrica AGREEprep (ANEXO 2) que se referem a utilização de um solvente composto por precursores de menor toxicidade e biodegradável, processamento de um número maior amostras de maneira simultânea por ciclo analítico, aproveitamento energético devido ao número de amostras analisadas de maneira simultânea e a substituição parcial de ácidos minerais fortes por solventes mais brandos. A abordagem utilizando NADES apresenta potencial promissor no contexto da química analítica verde, pois demonstra que é possível reduzir parcialmente o uso de reagentes agressivos e desenvolver estratégias de preparo de amostras mais sustentáveis.

## 9 CONCLUSÃO

O estudo mostra que o emprego de NADES cloreto de colina:ácido fórmico: água na proporção de 1:1:4 apresentou-se como um método alternativo promissor se comparado ao método convencional de digestão ácida que depende de reagentes altamente perigosos e gera uma grande quantidade de resíduos. A otimização multivariada, realizada por meio de delineamento experimental do tipo Doehlert, permitiu identificar estrategicamente a condição de 90 minutos de extração no banho termostático, com agitação, e 4 mL de solvente (NADES). O método alternativo apresentou limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) superiores comparados ao método convencional devido à pureza dos precursores do NADES que não foram submetidos a etapas de purificação; Porém a sensibilidade mostrou-se adequada para a quantificação dos elementos em matrizes de peixe.

O método alternativo, NADES, apresentou desempenho analítico promissor na determinação de macronutrientes (Ca, K, Mg, Na e P) em amostras de peixes. Embora possua diferenças estatísticas para os elementos cálcio, potássio, sódio e fósforo, o método demonstrou boa concordância com o método convencional para o magnésio, portanto, apesar de algumas limitações associadas ao método alternativo se mostra uma estratégia que no futuro pode ser aplicável principalmente levando em consideração à química analítica verde focando na redução de ácidos minerais concentrados e menor geração de resíduos.

A avaliação dos métodos por meio da métrica verde (AGREEprep) mostrou que o método utilizando NADES apresentou uma melhoria na sustentabilidade do preparo de amostra, o método alternativo se destaca pela substituição parcial de reagentes mais agressivos e redução do volume de substâncias potencialmente tóxicas, ou seja, a utilização de solvente eutéticos profundos naturais (NADES) pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras mais sustentáveis, porém, se faz necessário estudos adicionais para melhorar a eficiência de extração de determinados elementos.

A adoção de abordagens analíticas mais sustentáveis, especialmente em ecossistemas sensíveis e de grande relevância socioambiental, como o Rio São Francisco, contribui para o avanço da química verde e para a consolidação de práticas laboratoriais responsáveis. Essa perspectiva reforça a importância de desenvolver métodos que conciliem rigor científico, eficiência analítica e compromisso ambiental.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, p. 70–71, 2003. DOI: 10.1039/b210714g.

ABBOTT, A. P. et al. Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations. *Chemistry: A European Journal*, v. 13, n. 22, p. 6495–6501, 2007. DOI: 10.1002/chem.200601738.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford University Press, 1998.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília, 2017.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*. Washington: AOAC, 2002.

AOAC International, *Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

AUXILIADORA DE BARROS REIS<sup>2</sup>, Marise; VELLOSO, Lício Augusto; REYES REYES, Felix Guillermo. Alterações do metabolismo da glicose na deficiência de magnésio. *Revista de Nutrição, [S. l.]*, v. 15, n. 3, 2002.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008. doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.

BEZERRA, M. A. et al. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta*, v. 194, p. 941–959, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.088.

BORAHAN, T. et al. Determination of lead in milk samples using vortex assisted deep eutectic solvent based liquid phase microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry system. *Food Chemistry*, v. 299, p. 125065, 2019

BROWN, M. E. Introduction to thermal analysis: techniques and applications. Dordrecht: Springer Science Business Media, 2001.

CARVALHO, E. S.; GHOSH, A.; CHAUDHURI, P. Intermolecular Hydrogen-Bonded Interactions of Oxalic Acid Conformers with Sulfuric Acid and Ammonia. ACS Omega, v. 9, n. 41, p. 42470-42487, 2024. doi.org/10.1021/acsomega.4c06290

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A-S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. Ultrasonics Sonochemistry, v. 34, p. 540-560, 2017. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.

COSTA, Floriatan dos Santos. Solventes eutéticos profundos aplicados no desenvolvimento de métodos para determinação elementar em amostras de composição orgânica e inorgânica. 2023. 150 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

CHOI, Y. H. et al. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? Plant Physiology, v. 156, p. 1701–1705, 2011. DOI: 10.1104/pp.111.178426.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. Analytica Chimica Acta, v. 766, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.

DAI, Y. et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. Food Chemistry, v. 187, p. 14–19, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.123.

ESPINO, M. et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. Trends in Analytical Chemistry, v. 76, p. 126–136, 2016. DOI: 10.1016/j.trac.2015.11.006.

Fatima G, Dzupina A, B Alhmadi H, Magomedova A, Siddiqui Z, Mehdi A, Hadi N. Magnesium Matters: A Comprehensive Review of Its Vital Role in Health and Diseases. Cureus. 2024 Oct 13;16(10):e71392. doi: 10.7759/cureus.71392.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry – An overview. *Microchemical Journal*, v. 140, p. 176–182, 2018. DOI: 10.1016/j.microc.2018.04.002.

GHANEMI, K. et al. Ultra-fast microwave-assisted digestion in choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, Ni and Zn in marine biological samples. *Analytical Methods*, v. 6, p. 1774–1781, 2014. DOI: 10.1039/C3AY41843J.

GAŁUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 37, p. 61–72, 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2012.03.013.

GAŁUSZKA, A. et al. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78–84, 2013. DOI: 10.1016/j.trac.2013.04.010.

GT AGENDA 2030. ODS. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://gtagenda2030.org.br/ods/>. Acesso em: 11 jan. 2026

GRÖBER, U.; SCHMIDT, J.; KISTERS, K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*, v. 7, n. 9, p. 8199–8226, 2015. DOI: 10.3390/nu7095388.

GROPPER, S. S.; SMITH, J. L.; CARR, T. P. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 7. ed. Boston: Cengage Learning, 2018.

HABIBI, E. et al. A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 762, p. 61–67, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.054.

HANIFAR, K. et al. An Environmental-friendly Procedure Based on Deep Eutectic Solvent for Extraction and Determination of Toxic Elements in Fish Species from Different Regions of Iraq. *Journal of Food Protection*, v. 86, n. 100102, 2023. doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100102

HAQ, H. U. et al. Deep eutectic solvents based assay for extraction and determination of zinc in fish and eel samples using FAAS. *Journal of Molecular Liquids*, v. 333, n. 115930, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.115930

HÖHNE, G. W. H.; HEMMINGER, W. F.; FLAMMERSHEIM, H.-J. *Differential Scanning Calorimetry*. 2. ed. rev. Berlin: Springer-Verlag, 2003.

HO, J. C.; MICHALAK, A. M.; PAHLEVAN, N. Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s. *Nature*, v. 574, p. 667–670, 2019.

HOU, X.; JONES, B. T. Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, 2000.

INORGANIC VENTURES. ICP Operations Guide. Christiansburg, VA: Inorganic Ventures, [s.d.]. Disponível em: [https://www.inorganicventures.com/pub/media/IV\\_ICP\\_OperationsGuide\\_6x9\\_1.pdf](https://www.inorganicventures.com/pub/media/IV_ICP_OperationsGuide_6x9_1.pdf). Acesso em: 28 fev. 2026.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE 008, Rev. 09. Duque de Caxias: Inmetro, 2020.

IONASHIRO, M. Giolito: fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. São Paulo: Giz Editorial, 2004

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. São Paulo: EditSBQ, 2019.

Lall, Santosh P., and Sadasivam J. Kaushik. 2021. "Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish" *Animals* 11, no. 9: 2711. doi.org/10.3390/ani11092711

LEE, J.; PARK, Y. S.; LEE, H. J.; KOO, Y. E. Microwave-assisted digestion method using diluted nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of major and minor elements in milk samples by ICP-OES and ICP-MS. *Food chemistry*, v. 373, p. 131483, 2022.

Li B, Li L, Li P, Dong L, Xue M, Liu X, Zhang H, Zhang X, Wang K, Xia G, Liu X. The overlooked contribution of aquaculture to phosphorus pollution in estuary water with phosphate oxygen isotope. *Sci Total Environ.* 2025 Mar 10;968:178905. doi: 10.1016/j.scitotenv.2025.178905.

LIU, Y. et al. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, v. 81, n. 3, p. 679–690, 2018. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.

LOPES, G. S. et al. An Evaluation of the Use of Formic Acid for Extraction of Trace Elements from Brazil Nut and Babassu Coconut and Its Suitability for Multi-Element Determination by ICP-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 7, p. 1229–1235, 2016. DOI: 10.5935/0103-5053.20160018.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I. et al. The ten principles of green sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 148, p. 116530, 2022. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116530.

MARTINS, M. A. R. et al. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, v. 48, n. 7, p. 962–982, 2019. DOI: 10.1007/s10953-018-0793-1.

NASIRPOUR, N.; MOHAMMADPOURFARD, M.; HERIS, S. Z. Ionic liquids: Promising compounds for sustainable chemical processes and applications. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 160, p. 264–300, 2020

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NINAYAN, R. et al. Deep eutectic solvents vs. Aqueous acids in metal extraction from animal tissues. *Microchemical Journal*, v. 200, n. 110252, 2024.

Olawuyi O, Hasan MR, Kruczyński T, Hannan A, Halim MA. A Comparative Study on Mechanochemically and Thermally Prepared Deep Eutectic Solvents. *ACS Omega*. 2025 May 28;10(22):23335-23347. doi: 10.1021/acsomega.5c01788.

OLIVEIRA, A. F. et al. The use of diluted formic acid in sample preparation for macroand microelements determination in foodstuff samples using ICP OES. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 66, p. 7–12, 2018. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.11.001.

ONU – Organização das Nações Unidas. *Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável*. Nova York: ONU, 2015.

PENA-PEREIRA, F. et al. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01887.

PENA-PEREIRA, F. et al. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *Advances in Sample Preparation*, v. 3, p. 100025, 2022. DOI: 10.1016/j.sampre.2022.100025.

Plechkova, N. V, Seddon, K.R., Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chem. Soc. Rev.*, 37, 2008, 123-150. DOI: 10.1039/b006677j

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, v. 181, p. 204–209, 2018. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.01.013.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; WOJNOWSKI, W. Complementary green analytical procedure index (Complex GAPI) and software. *Green Chemistry*, v. 23, n. 21, p. 8657–8665, 2021. DOI: 10.1039/d1gc02318g.

SANTANA, A. P. R. et al. Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. *Talanta*, v. 199, p. 361–369, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.02.083.

SANTANA, A. P. R. et al. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, v. 293, n. 1, p. 111452, 2019b. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111452.

SANTANA, A. P. R. et al. Solventes eutéticos naturais profundos (NADES) no preparo de amostras de rocha fosfática e suplemento mineral para determinação elementar por técnicas de plasma. *Química Nova*, v. 44, n. 6, p. 689-695, 2021.

SANTOS, R. Á. et al. Perfil econômico da região hidrográfica do Rio São Francisco: uma análise insumo produto. *Revista de Economia e Agronegócio*, v.18, n.1, 2019. DOI:10.25070/rea.v18i1.8421

Schwalfenberg, Gerry K.; Genuis, Stephen J. . (2017). The Importance of Magnesium in Clinical Healthcare. *Scientifica*, 2017(), 1–14. doi:10.1155/2017/4179326

SCHAEFFER, N. et al. Sustainable hydrophobic terpene-based eutectic solvents for the extraction and separation of metals. *Chemical Communications*, v. 54, n. 58, p. 8104–8107, 2018. DOI: 10.1039/C8CC04152K.

SHISHOV, A. et al. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*, v. 135, p. 33–38, 2017. DOI: 10.1016/j.microc.2017.07.015.

SHISHOV, A. et al. Deep eutectic solvents are not only effective extractants. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 129, p. 115956, 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115956.

SHISHOV, A. et al. Deep eutectic solvents based on carboxylic acids for metals separation from plant samples: Elemental analysis by ICP-OES. *Food Chemistry*, v. 366, p. 130634, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130634.

SHISHOV, A. et al. Deep eutectic solvent-based extraction of metals from oil samples for elemental analysis by ICP-OES. *Microchemical Journal*, v. 179, n. 107456, 2022. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107456

SKOOG, D. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, 2005.

Smith, Emma L et al. “Deep eutectic solvents (DESs) and their applications.” *Chemical reviews* vol. 114,21 (2014): 11060-82. doi:10.1021/cr300162p

SOROURADDIN, S. M.; FARAJZADEH, M. A.; DASTOORI, H. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method based on a ternary deep eutectic solvent as chelating agent and extraction solvent for preconcentration of heavy metals from milk samples. *Talanta*, v. 208, p. 120485, 2020

SOYLAK, M.; KOKSAL, M. Deep eutectic solvent microextraction of lead(II), cobalt(II), nickel(II) and manganese(II) ions for the separation and preconcentration in some oil samples from Turkey prior to their microsampling flame atomic absorption spectrometric determination. *Microchemical Journal*, v. 147, p. 832-837, 2019

VANDA, H. et al. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, v. 21, p. 628–638, 2018. DOI: 10.1016/j.crci.2018.04.002.

VAN OSCH, D. J. G. P. et al. A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 7, n. 3, p. 2933–2942, 2019. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b03520.

VIM - VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA – Conceitos básicos e gerais e termos associados. 3. ed. Sèvres: Joint Committee for Guides in Metrology, 2012.

Wasserscheid, P, and W Keim. "Ionic Liquids-New "Solutions" for Transition Metal Catalysis." *Angewandte Chemie (International ed. in English)* vol. 39,21 (2000): 3772-3789. doi:10.1002/1521-3773(20001103)39:21<3772::aid-anie3772>3.0.co;2-5

Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids. *Solvents for Synthesis and Catalysis*. *Chem Rev.* 1999 Aug 11;99(8):2071-2084. doi: 10.1021/cr980032t.

WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M.; PENA-PEREIRA, F.; PSILLAKIS, E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 149, p. 116553, 2022. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116553.

Yan, H., Song, K.Y., Guo, H.F., Shen, M.Y., Xu, A., Zhao, L.Y., et al., 2023. A concise way to prevent bloom risk in ecological use of reclaimed water: determination of the threshold by model calculation. *Water Cycle* 4, 216–220.

ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 21, p. 7108, 2012. DOI: 10.1039/c2cs35178a.

**ANEXOS**

ANEXO 1 – 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA ANALÍTICA .....	54
ANEXO 2 – 10 PRINCÍPIOS DE PREPARO DE AMOSTRA VERDE (GSP).....	55

**ANEXO 1 – 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA ANALÍTICA**

<b>Química analítica verde (GAC)</b>
1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar tratamento de amostra
2. Tamanho mínimo de amostra
3. Medições in situ
4. Economia de energia e redução do uso de reagentes
5. Métodos automatizados e miniaturizados
6. Derivatização evitada
7. Geração de resíduos elevada deve ser evitada
8. Seleção de métodos multianalitos ou multiparâmetros
9. Redução de uso de energia
10. Reagentes obtidos de fontes renováveis
11. Eliminação ou substituição de reagentes potencialmente tóxicos
12. Segurança do operador

FONTE – GALUSZKA et al., 2013

**ANEXO 2 – 10 PRÍNCÍPIOS DE PREPARO DE AMOSTRA VERDE (GSP)**

<b>Preparo de amostra verde (GSP)</b>
1. Preparo de amostra in situ
2. Utilização de solvente e reagentes mais seguros
3. Materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis
4. Redução do desperdício
5. Diminuição da quantidade de amostra, reagentes e materiais
6. Aumento do rendimento da amostra
7. Integração de etapas e automação
8. Minimização do consumo de energia
9. Escolha de preparo de amostra mais sustentável para análise
10. Procedimentos mais seguros

FONTE – LÓPEZ – LORENTE et al., 2022