



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Arlene Santos Silva

**Aplicação e desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação
de minerais em fórmulas infantis a base de cereais empregando ICP OES e
HR-CS ET AAS**

Salvador
2014

Arlene Santos Silva

Aplicação e desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de minerais em fórmulas infantis a base de cereais empregando ICP OES e HR-CS ET AAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Domingues Matos

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador

2014

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Silva, Arlene Santos.

Aplicação e desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de minerais em fórmulas infantis a base de cereais empregando ICP OES e HR-CS ET AAS / Arlene Santos Silva. - 2015.

78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Domingues Matos

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2014.

1. Alimentos - Teor mineral. 2. Crianças – Nutrição. 3. Cromo na nutrição humana. 4. Cereais. 5. Análise multivariada. 6. Análise espectral. I. Matos, Geraldo Domingos. II. Ferreira, Sérgio Luís Costa. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 613.285

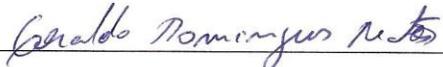
CDU – 543.42:664.48

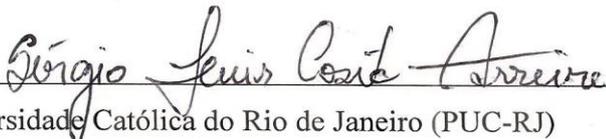
TERMO DE APROVAÇÃO

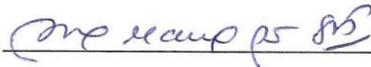
ARLENE SANTOS SILVA

Aplicação e desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de minerais em fórmulas infantis a base de cereais empregando ICP OES e HR-CS ET AAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Domingues Matos 
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Ana Maria Pinto dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira 
Doutorado em Química, Universidade Federal Fluminense (UFF)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 14 de abril de 2014.

A minha família, especialmente meus pais Célia e Arnaldo, meu irmão Cléverson, meu sobrinho Yan, aos amigos que de algum modo contribuíram e se fizeram presentes e a meus orientadores Prof. Dr. Geraldo domingos Matos e Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por conceder-me o dom da vida, da sabedoria e o discernimento necessário durante o desenvolvimento do trabalho;

A meus pais, Arnaldo e Célia, por acreditarem em minha capacidade e por todo esforço, apoio e dedicação incondicional em todos os momentos de minha vida;

A meu irmão Cléverson pela amizade, presença, força e incentivo durante mais esta etapa de realização e conquista em minha vida;

A meu sobrinho Yan por cada sorriso, cada bom dia, cada alegria, pelo amor, carinho e cuidados sempre sinceros;

A minha família, em especial tio Jorge Lourenço e meu primo Matheus, pela torcida e credibilidade em meu potencial;

Ao Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ), em especial ao professor Sérgio L. C. Ferreira por me permitir fazer parte do Grupo e pela co-orientação;

A meu orientador professor Geraldo Domingues Matos por toda atenção, orientação e ensinamentos durante o decorrer das atividades;

A Geovani Brandão pelo essencial auxílio durante a execução e desenvolvimento do trabalho;

A Laiana pela amizade, colaboração e por se fazer presente mesmo estando distante;

A Mário, Danilo, Isa e Geysa por toda a ajuda e colaboração, diretas e indiretas.

A todos os amigos e colegas do GRPQQ e do GPQA pela amizade, momentos de descontração e colaboração;

Aos amigos da UFBA conquistados durante a minha graduação de Bacharel em Química: Lidiane, Jorge, Wadton, Augusto, Márcio, Jeane, Flávia e Wellington;

A meus amigos e colegas, novos e antigos, por todo apoio, paciência, compreensão e por me acompanhar e estimular durante minha jornada;

A todos os professores e mestres que contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional;

A CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho de mestrado.

A cada um de vocês o meu muito obrigada!

“A semente é livre mas a colheita é obrigatória”

(Autor desconhecido)

*“A mente que se abre a uma ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

Resumo

A ingestão de nutrientes minerais é fundamental ao desenvolvimento físico e mental das crianças e à manutenção da saúde dos indivíduos em todas as faixas etárias. Motivo pelo qual as agências de regulação da saúde e assistência humana, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e OMS (Organização Mundial de Saúde) estabeleceram o IDR (ingestão diária recomendada) de nutrientes, vitaminas e minerais. Nos primeiros seis meses de vida, a incorporação destes nutrientes via aleitamento materno na dieta infantil é suficiente segundo estes órgãos. A partir desta fase, sugere-se a complementação da nutrição destes indivíduos com alimentos de origem animal e vegetal. As fórmulas infantis, utilizadas para este fim, merecem especial atenção no que tange ao teor dos nutrientes minerais. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o teor de minerais, bem como sua biodisponibilidade, em fórmulas infantis à base de cereais e desenvolver um método de amostragem direta sólidos para determinação de cromo nestas amostras. Para a determinação dos nutrientes aplicou-se um método de digestão por via úmida em bloco digestor, com dedo frio, utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio como oxidantes. Com o objetivo de classificar as amostras quanto ao teor de minerais realizou-se a análise multivariada dos dados. Para o estudo da biodisponibilidade de nutrientes minerais nas amostras foi aplicado um método de extração usando uma solução gástrica de HCl e pepsina. A quantificação dos macro e microelementos nas amostras avaliadas por ambos os métodos, foi realizada utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os nutrientes foram avaliados a nível de mg g^{-1} e as faixas de concentrações encontradas foram: Ca ($0,05 \pm 0,03$ a $5,62 \pm 0,13$); K ($0,26 \pm 0,09$ a $4,36 \pm 0,28$); Mg ($0,041 \pm 0,006$ a $1,515 \pm 0,510$); Na ($0,10 \pm 0,05$ a $4,71 \pm 0,098$); P ($0,79 \pm 0,07$ a $6,63 \pm 0,54$); Fe ($0,184 \pm 0,007$ a $0,536 \pm 0,074$); Mn ($0,0206 \pm 0,0007$ a $0,0663 \pm 0,0088$); Se ($0,0130 \pm 0,0069$ a $0,0168 \pm 0,0010$); e Zn ($0,026 \pm 0,007$ a $0,249 \pm 0,231$). A análise multivariada dos resultados permitiu a classificar as amostras segundo a sua composição e avaliar o teor nutricional das mesmas. Os resultados obtidos na extração de nutrientes minerais com a solução gástrica apontaram para uma maior biodisponibilidade dos elementos Ca, K e Mg para alimentos à base de aveia, percentuais de extração 72, 86 e 81 %, respectivamente; 35 % de Fe na amostra a base de multicereais; e 56 % de Zn e 46 % de P para amostra a base de milho. O desenvolvimento do método para determinação de cromo em fórmulas infantis a base de cereais foi realizado utilizando a espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução com atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS) e amostragem direta de sólidos. Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método foram: 3,74 e 12, 46 ng g^{-1} , respectivamente. A massa característica encontrada para o método foi 1,2 μg e RSD 10,76 %. O método proposto possui boa precisão e exatidão, para o CRM de folha de tomate NIST 1573a, na determinação de Cr em fórmulas infantis a base de cereais. As concentrações de Cr variaram de 33,9 a 58,1 ng g^{-1} ($n = 3$).

Palavras chave: Nutrição infantil, biodisponibilidade, análise multivariada, amostragem direta de sólidos e HR-CS ET AAS.

Abstract

The intake of nutrients is essential to physical and mental development of children and the maintenance of the health of individuals in all age. Therefore, the regulatory agencies of health and human assistance, ANVISA (National Health Surveillance Agency) and WHO (World Health Organization) established the IDR (recommended daily intake) of nutrients, vitamins and minerals. In the first six months of life, these nutrients incorporation through breastfeeding in children's diet is sufficient according to these organs. From this stage, it is suggested to complement the nutrition of these individuals with animal and plant foods. Infant formula, used for this purpose, need special attention with regard to the content of nutrients. Thus, this study aims to evaluate the mineral content as well as its bioavailability, infant formulas from cereals and develop a method of solid direct sampling for determination of chromium in these samples. To determine the nutrients applied a method of humid digestion in digester block, cold finger, using nitric acid and hydrogen peroxide as oxidizing. In order to classify the samples in mineral content was held on multivariate data analysis. To study the bioavailability of nutrients in the samples was applied to a method of extracting using a gastric solution of HCl and pepsin. The quantification of macro- and microelements in samples measured in both methods was performed by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). Nutrients were evaluated in terms of mg g⁻¹, and the concentration ranges found were: Ca (0.05 ± 0.03 to 5.62 ± 0.13), K (0.26 ± 0.09 to 4, 36 ± 0.28); Mg (0.041 ± 0.006 to 1.515 ± 0.510), Na (0.10 ± 0.05 to 4.71 ± 0.098); P (0.79 ± 0.07 to 6.63 ± 0.54); Fe (0.184 ± 0.007 to 0.536 ± 0.074); Mn (0.0206 ± 0.0007 to 0.0663 ± 0.0088); Se (0.0130 ± 0.0069-0.0168 ± 0.0010); and Zn (0.026 ± 0.007 to 0.249 ± 0.231). Multivariate analysis of the results allowed to classify the samples according to their composition and evaluate the nutritional content of them. The results obtained in the extraction of mineral nutrients to the gastric solution showed an increased bioavailability of Ca, K and Mg oat based foods, percentage extraction 72, 86 and 81%, respectively; 35% Fe in the sample multicereais base; and 56% Zn and 46% P for the sample based on corn. The development of the method for determination of chromium in infant formulas the cereal was performed using atomic absorption spectrometry with continuous source of high resolution with electrothermal atomization (HR-CS ET AAS) and direct solid. The limits of detection and quantification for the method found were 3.74 and 12, 46 ng g⁻¹, respectively. The characteristic mass found for method was 1.2 pg and RSD 10.76%. The proposed method showed good precision and accuracy, for tomato leaf CRM NIST 1573a, in determining Cr infant formulas cereal. The chromium concentrations varied from 33.9 to 58.1 ng g⁻¹ (n = 3).

Keywords: Infant Nutrition, bioavailability, multivariate analysis, direct solid sampling and HR-CS ET AAS.

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Ingestão diária recomendada (IDR) disponibilizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para alguns nutrientes minerais.
- Tabela 2.** Parâmetros operacionais do ICP OES.
- Tabela 3.** Analitos determinados e as respectivas linhas de emissão utilizadas.
- Tabela 4.** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para o método.
- Tabela 5.** Quantidade de minerais (mg g^{-1}) contida em determinadas massas de amostra, informadas nas embalagens.
- Tabela 6.** Valores médios das concentrações de macro e microelementos em amostras de fórmulas infantis determinados por ICP OES representado pelo valor médio \pm intervalo de confiança, com confiabilidade de 95% (teste-t).
- Tabela 7.** Faixas de concentração encontradas para os macro e microelementos estudados nas amostras de fórmulas infantis à base de cereais.
- Tabela 8.** Matriz fatorial utilizada na análise multivariada das amostras de fórmulas infantis a base de cereais.
- Tabela 9.** Pesos das variáveis das três primeiras componentes principais.
- Tabela 10.** Otimização univariada do volume de solução de suco gástrico simulado a ser empregado na extração de macro e microelementos em fórmulas infantis.
- Tabela 11.** Percentual de extração de macro e microelementos em fórmulas infantis com solução de suco gástrico simulado comparado à mineralização total da matriz.
- Tabela 12.** Aplicações da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólidos.
- Tabela 13.** Programa de aquecimento do forno de grafite empregado na determinação de Cr em farinha de arroz e amido de milho.
- Tabela 14.** Resultados obtidos no teste de modificadores químicos para determinação de Cr em fórmulas infantis.
- Tabela 15.** Equações das curvas de calibração obtidas com padrão aquoso e com CRM.
- Tabela 16.** Valores de LD e LQ obtidos para o método proposto considerando as curvas de calibração aquosa e com CRM.

Tabela 17. Valores de RSD % e massa característica para o método proposto.

Tabela 18. Concentração de Cr no CRM de folha de tomate expressa em ng g^{-1} , valor encontrado e valor certificado.

Tabela 19. Concentração média de Cr (\pm IC) em amostras de fórmulas infantis à base de cereais com confiabilidade de 95 % (teste-t).

Lista de Figuras

- Figura 1.** Agitação sob aquecimento das amostras durante a extração com a solução de suco gástrico simulado.
- Figura 2.** Curva das variâncias apresentadas em cada componente principal (CP).
- Figura 3.** Gráfico de peso das variáveis estudadas nas fórmulas infantis, (a) CP 1 x CP 2; (b) CP1 x CP 3 e (c) CP 2 x CP 3.
- Figura 4.** Gráfico de escores das matrizes das fórmulas infantis estudadas, (a) CP 1 x CP 2; (b) CP1 x CP 3 e (c) CP 2 x CP 3.
- Figura 5.** Dendrograma da quantidade de minerais presentes nas amostras de fórmulas infantis.
- Figura 6.** Representação esquemática da configuração atual de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.
- Figura 7.** Curva de pirólise (—■—) e curva de atomização (—●—) para determinação de Cr em fórmulas infantis empregando Mg como modificador químico.
- Figura 8.** Curva de pirólise (—■—) e curva de atomização (—●—) para determinação de Cr em fórmulas infantis sem uso de modificador químico.
- Figura 9.** Curvas de calibração para determinação de Cr em fórmulas infantis a base de cereais.

Lista de siglas e abreviaturas

AAS	<i>(Atomic Absorption Spectrometry)</i> – Espectrometria de absorção atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	<i>(Adenosine triphosphate)</i> – Trifosfato de adenosina
CCD	<i>(Coupled Charges Device)</i> – Dispositivo de cargas acopladas
CP	Componente principal
CPs	Componentes principais
CRM	<i>(Certified Reference Material)</i> – Material de referência certificado
DNA	<i>(Deoxyribonucleic acid)</i> – Ácido Desoxirribonucleico
ET AAS	<i>(Electrothermal atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
FAAS	<i>(Flame atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria de absorção atômica com chama
GF AAS	<i>(Graphite furnace atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
HCA	<i>(Hierarchical clustering analysis)</i> – Análise de agrupamentos hierárquicos
HR-CS AAS	<i>(High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria atômica com fonte contínua de alta resolução
HR-CS ET AAS	<i>(High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria atômica com fonte contínua de alta resolução com atomização eletrotérmica
ICP OES	<i>(Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)</i> Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ICP-MS	<i>(Inductively coupled plasma mass spectrometry)</i> – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IDR	Ingestão diária recomendada
LC AAS	<i>(Line source atomic absorption spectrometry)</i> – Espectrometria atômica com fonte de linha
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
OMS	Organização mundial de saúde
PCA	<i>(Principal Component Analysis)</i> – Análise dos componentes principais
RNI	<i>(Recommended nutrient intakes)</i> – Recomendação de ingestão de nutrientes
RNA	<i>(Ribonucleic acid)</i> – Ácido ribonucleico
SIS	<i>(Slurry sampling)</i> – Amostragem por suspensão
SS	<i>(Solid sampling)</i> – Amostragem de sólidos

Sumário

1. Introdução	17
Parte I – Composição mineral e avaliação da extração de macro e micronutrientes de fórmulas infantis a base de cereais empregando solução de suco gástrico simulado	
2. Nutrição infantil	19
3. Macro e micronutrientes	22
3.1. <i>Macronutrientes</i>	22
3.1.1. <i>Cálcio</i>	22
3.1.2. <i>Fósforo</i>	23
3.1.3. <i>Magnésio</i>	24
3.2. <i>Micronutrientes</i>	24
3.2.1. <i>Ferro</i>	24
3.2.2. <i>Manganês</i>	25
3.2.3. <i>Selênio</i>	26
3.2.4. <i>Zinco</i>	27
4. Análise multivariada	29
5. Objetivo	32
5.1. <i>Objetivo geral</i>	32
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	32
6. Parte experimental.....	33
6.1. <i>Equipamentos/ acessórios</i>	33
6.2. <i>Reagentes e soluções</i>	34
6.3. <i>Amostras</i>	34
6.4. <i>Procedimento experimental</i>	35
6.4.1. <i>Mineralização ácida a quente</i>	35
6.4.2. <i>Limites de detecção e quantificação</i>	35
6.4.3. <i>Extração com solução de suco gástrico simulado</i>	36
7. Resultados e discussão	38
7.1. <i>Composição mineral</i>	38
7.2. <i>Análise multivariada dos dados</i>	41
7.2.1. <i>Análise dos componentes principais - PCA</i>	41
7.2.2. <i>Análise de agrupamento hierárquico - HCA</i>	45
7.3. <i>Extração com suco gástrico simulado</i>	47
8. Conclusão parcial.....	49

Parte II – Desenvolvimento de método analítico para determinação de Cr em farinhas de cereais empregando amostragem direta de sólido e HR-CS ET AAS

9. Espectrometria de absorção atômica (AAS)	50
9.1. Aspectos gerais	50
9.2. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS)	51
9.3. Amostragem direta de sólidos	53
9.3.1. Fundamentos	53
10. Cromo	57
11. Objetivos	61
11.1. Objetivo geral	61
11.2. Objetivos específicos	61
12. Parte experimental	62
12.1. Equipamentos/ acessórios	62
12.3. Procedimento para determinação direta de cromo em amostras de fórmula infantil a base de cereal	63
12.3.1. Teste de modificador químico	64
12.3.2. Curvas de pirólise e atomização	64
13. Resultados e discussão	65
13.1. Teste com modificador químico	65
13.2. Curvas de pirólise e atomização	66
13.3. Curvas de calibração	68
13.4. Figuras de mérito	70
14. Aplicação nas amostras	72
15. Conclusão parcial	73
16. Conclusão geral	74
17. Referências bibliográficas	75

1. Introdução

O consumo diário de alimentos ricos em vitaminas e minerais (macro e micronutrientes) conduz à boa nutrição. Contudo, existe uma quantidade mínima de ingestão considerada fundamental a esta condição, a chamada ingestão diária recomendada (IDR) de nutrientes. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define a IDR como a quantidade que, ingerida diariamente, atende às necessidades nutricionais da maioria dos indivíduos e grupos de pessoas saudáveis [1].

Os macronutrientes e micronutrientes minerais são elementos químicos que desempenham funções no organismo estando presente em maior ou menor quantidade, respectivamente. No organismo humano compõem proteínas e enzimas, desempenhando atividades metabólicas, para síntese e degradação de outras substâncias; atuando na manutenção dos mecanismos de defesa (sistema imunológico); prevenindo doenças como anemia e osteoporose; formando tecidos, por exemplo, o tecido ósseo [2,3].

A deficiência de nutrientes minerais provoca distúrbios na saúde e, a depender do grau de deficiência, o indivíduo pode desenvolver enfermidades com possibilidade de morte. Por outro lado, altas concentrações destes nutrientes também podem causar doenças chegando a ser letais. São considerados macronutrientes os elementos: cálcio, magnésio, potássio e fósforo e micronutrientes: ferro, manganês, cobre, zinco, selênio e cromo [4,5].

O desenvolvimento físico e mental das crianças depende diretamente da presença de nutrientes em sua dieta diária. Na primeira fase da vida a incorporação destes nutrientes na dieta infantil ocorre via aleitamento materno. Com o tempo alimentos processados são incorporados à dieta das crianças. Contudo, estes alimentos, de um modo geral, apresentam um elevado teor de gorduras e conservantes. Assim, para garantir a boa nutrição deste grupo de indivíduos e complementar a alimentação deles de forma saudável, as fórmulas infantis à base de cereais são utilizadas como fonte complementar de nutrientes.

O monitoramento da presença destes nutrientes por meio de técnicas com elevada precisão e sensibilidade se faz necessário. No entanto, as amostras avaliadas por meio das técnicas espectroanalíticas quase sempre se encontram na forma sólida. Deste modo, ao quantificar uma espécie química faz-se necessária a mineralização ácida das amostras que as contém. Tornando necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos cuja manipulação das amostras seja mínima.

Diante do exposto, propõe-se realizar uma avaliação da presença de minerais, e sua biodisponibilidade, nos alimentos consumidos no dia a dia, bem como o desenvolvimento de métodos de amostragem que seja rápido, preciso e confiável. Portanto, na primeira parte deste trabalho propôs-se a avaliação nutricional de farinhas de cereais destinada à alimentação infantil a partir da determinação da composição mineral e avaliação da biodisponibilidade destes na matriz estudada. E, na segunda parte do trabalho propõe-se um método de determinação de cromo nesta classe de alimentos empregando amostragem direta de sólidos e HR-CS ET AAS.

Parte I – Composição mineral e avaliação da extração de macro e micronutrientes de fórmulas infantis a base de cereais empregando solução de suco gástrico simulado

2. Nutrição infantil

A ingestão diária de nutrientes minerais é fundamental para a manutenção da saúde humana. Na primeira fase da vida, 0 – 6 meses, a incorporação destes nutrientes ao organismo realiza-se basicamente via aleitamento materno [6]. Segundo as agências de regulação da saúde e assistência humana, OMS (Organização Mundial de Saúde) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os teores dos nutrientes presentes no leite materno atendem à *ingestão diária recomendada* (IDR) para este grupo de indivíduos, sendo indicado como única fonte de alimentação para esta fase da vida.

A partir dos primeiros seis meses de vida recomenda-se a complementação da alimentação das crianças com alimentos de origem animal e vegetal de modo a atender o IDR de acordo com a faixa etária. As fórmulas infantis à base de cereais são geralmente utilizadas como fonte suplementar de nutrientes para este grupo de indivíduos [7]. Assim, tais alimentos merecem especial atenção no que tange ao teor e biodisponibilidade dos nutrientes minerais.

Alguns pesquisadores realizam estudos com o intuito de avaliar o teor de nutrientes em alimentos utilizados na suplementação alimentar de indivíduos a partir do sexto mês de vida. Alguns destes estudos envolvem além da determinação de nutrientes minerais, a sua biodisponibilidade e a determinação de elementos-traço não essenciais ao organismo humano em fórmulas infantis.

Bosscher et al [8] avaliaram o efeito do uso de agentes de espessamento, com base em fibra dietética solúvel, na biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco em fórmulas infantis. Neste estudo foi desenvolvido um método *in vitro* de diálise com digestão intraluminal preliminar para analisar fórmulas à base de caseína e de soro de leite na presença de três tipos de espessantes: ácido algínico, goma

locust-bean e goma guar. As amostras foram analisadas usando espectrometria de absorção atômica com chama e utilizou-se leite humano como padrão de referência. A biodisponibilidade dos minerais em fórmulas à base de caseína e de soro de leite suplementados com 0,42 g de goma locust-bean/100 mL foi de 9,4% e 10,4% para o cálcio, 0,32 % e 1,45% para o ferro, e de 3,2 % e 5,6 % para o zinco, respectivamente. Usando 2 g de agentes à base de ácido alginico por 100 mL de amostra, a biodisponibilidade do cálcio reduziu de 13,3% para 5,3 %. No que diz respeito ao ferro e zinco, as biodisponibilidades aumentaram de 1,28 % para 6,05 %; e de 6,7 % para 10,2 %, respectivamente. Já o uso da goma de guar reduziu a biodisponibilidade do ferro de modo mais severo que a goma locust-bean. Assim, os estudos demonstraram que o uso das fibras solúveis como espessante alimentício afeta a biodisponibilidade dos minerais avaliados.

Saracoglu et al [9] estudaram a presença dos elementos-traço Cu, Mn, Fe, Zn, Se, Cr, Al, Ni e Co em alimentos destinados a bebês na Turquia empregando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). O objetivo do trabalho foi realizar uma comparação entre três procedimentos de mineralização de amostra: calcinação à seco, calcinação molhada e digestão em micro-ondas, sendo o último considerado o melhor método. Para os minerais Cu, Mn, Fe, Zn, Se e Ni as seguintes faixas de concentração, em $\mu\text{g g}^{-1}$, foram encontradas: 0,52 – 4,38; 0,22 – 7,20; 1,02 – 67,5; 0,92 – 37,2; 0,12 – 0,32 e 0,05 – 10,3, respectivamente. Para os elementos Cr, Al e Co as faixas de concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram: 2,02 – 68,8; 10,7 – 66,8; 2,67 – 25,4, respectivamente.

Ikem et al [10] avaliaram a presença de elementos tóxicos em fórmulas infantis (destinadas a bebês de 0 – 6 meses de idade) vendidas em grandes redes de supermercados da Nigéria, Reino Unido e EUA empregando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Neste trabalho 51 amostras de fórmulas infantis de diferentes fabricantes foram analisadas para vários elementos essenciais (Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, e Zn) e não-essenciais (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Fig, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U e V). As amostras foram submetidas a um método de digestão em micro-ondas e os resultados obtidos após determinação simultânea em ICP OES apontaram que os alimentos à base de soja, comparados aos alimentos à base

de leite em pó, apresentaram maiores teores dos analito analisados. As diferenças encontradas entre as concentrações dos elementos nas amostras foram atribuídas aos diferentes processos de produção e empacotamento nos referidos países. No entanto, os valores encontrados estão dentro dos limites de exigência nutricional da OMS.

3. Macro e micronutrientes

Presentes no organismos tanto na forma iônica, solubilizados em fluidos corporais, quanto constituindo biomoléculas, geralmente como co-fator enzimático, os minerais desempenham papéis essenciais no organismo humano. A quantidade demandada pelo organismo depende da faixa etária e das condições fisiológicas, a exemplo gravidez e lactação, e do estado nutricional de cada indivíduo. Os macronutrientes como o cálcio, fósforo, magnésio e potássio apresentam-se em grandes quantidades. Não menos importantes os microelementos, como o ferro, zinco, manganês e selênio cumprem seus papéis funcionais mesmo em pequenas quantidades no organismo.

3.1. *Macronutrientes*

3.1.1. *Cálcio*

Quinto elemento em abundância no corpo humano, o cálcio apresenta-se sob a forma de cátion bivalente, Ca^{2+} . A maior parte do cálcio presente no organismo humano localiza-se no tecido ósseo, aproximadamente 99 %, o restante encontra-se distribuído entre os dentes e tecidos moles. Este mineral é responsável pelas funções neuromusculares, mediação do funcionamento de enzimas e coagulação sanguínea [11].

A introdução do cálcio no organismo ocorre pela absorção deste via aparelho gastrointestinal após a ingestão de alimentos que o contém e por reabsorção da hidroxiapatita de cálcio $[\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6]$, presente no tecido ósseo [11]. As principais fontes alimentares de cálcio são o leite e seus derivados, vegetais folhosos, por exemplo, como couve, alface e carnes [12]. Um importante requisito da absorção do cálcio pelo organismo é a presença da vitamina D, uma vez que ela é responsável pela ionização do elemento absorvido

sob forma elementar. A falta ou excesso deste elemento no organismo se dá pelo balanço entre a quantidade ingerida e a quantidade excretada de forma a manter um nível constante.

3.1.2. Fósforo

O fósforo, combinado ao cálcio é um dos principais componentes dos ossos (fosfato de cálcio). Assim, os fatores que facilitam a absorção do cálcio no organismo são também os que facilitam a do fósforo. Contudo, a absorção destes elementos ocorre de forma inversamente proporcional havendo uma certa competição entre eles, quando um deles encontra-se em excesso o outro é obrigatoriamente excretado. Logo, para não haver competição, a presença destes minerais no organismo humano deve obedecer a uma proporção de 1:1 [11, 12].

Constituinte das membranas celulares distribui-se em todo o organismo e desempenha funções variadas. Dentre elas a participação na maior parte das reações metabólicas do organismo metabolismo de gordura, carboidrato e proteína; na síntese do ATP (trifosfato de adenosina), transferência energética; formação dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) transmissão genética; e como tampão sanguíneo e de fluidos corporais. Além do mais, é fundamental na manutenção dos ossos e dentes, à formação do sistema nervoso e à ação de várias enzimas [12].

A deficiência de fósforo no organismo é rara pois este elemento está presente em abundância nos alimentos. Por outro lado, o excesso deste mineral no organismo é comum devido ao uso de adubos fosfatados, carne e produtos industrializados em especial, queijos, presunto e embutidos [12].

3.1.3. Magnésio

Presente no organismo sob a forma de carbonatos, fosfatos e fluoretos, o magnésio age como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo energético, na síntese dos ácidos nucleicos (RNA e DNA), no equilíbrio do potencial elétrico celular e está presente também nas membranas celulares [11, 12].

A maior parte do magnésio presente no corpo humano localiza-se nos ossos, cerca de 60 %, 25 % nos músculos e os 15 % restantes distribuídos entre as demais partes do corpo. Sua quantidade no organismo depende diretamente da faixa etária variando de aproximadamente 760 miligramas após o nascimento a 25 gramas na fase adulta [11].

Os vegetais mais verdes, sementes de leguminosas, feijão, frutos do mar, damasco, água de coco e nozes são algumas das fontes naturais de magnésio para o organismo. A ingestão de álcool, fibras dietéticas e o excesso de cálcio no organismo são fatores que reduzem a capacidade do corpo de absorver o elemento. A deficiência deste mineral no organismo é raramente observada. Já o excesso é rapidamente controlado pela homeostase corpórea [11, 12].

3.2. Micronutrientes

3.2.1. Ferro

O ferro é um micronutriente de extrema importância para o organismo humano, uma vez que, ligado à hemoglobina, é responsável pelo transporte e troca de gases (oxigênio e gás carbônico) nas células. Cerca de 70 % do ferro presente no corpo está no sangue e nos músculos ligado à hemoglobina e a mioglobina, os 30 % restantes estão distribuídos entre a medula óssea, baço e fígado [12].

O ferro, presente no organismo nas formas orgânica, como complexos, e inorgânica, como íon Fe(II) é melhor absorvido sob a forma orgânica. Quando ligado ao grupo heme, anel porfirínico presente na hemoglobina, o ferro é melhor absorvido pelo organismo. As principais fontes de ferro heme são as carnes, aves e peixes. Outras fontes de ferro são as leguminosas, as frutas e legumes. Contudo, por apresentarem em sua constituição ferro não heme, quando provenientes destas fontes, a absorção deste elemento pelo organismo ocorre de forma dificultada. O pH ácido facilita a absorção deste mineral pelo organismo, podendo esta quantidade ser até três vezes maior. Por isso, aconselha-se a ingestão de sucos ácidos ou vitamina C durante ou após as refeições ricas em ferro. Quando presente em sua forma livre, não ligado, é um potencial gerador de radicais livres e responsável por desencadear doenças neurodegenerativas [13, 14].

A deficiência de ferro é mais comum em crianças, adolescentes e mulheres em idade fértil, sendo considerada a principal causa da anemia nestes indivíduos. Com relação ao excesso do mineral no organismo (hemossiderose ou hemocromatose), relata-se a ocorrência da sua deposição nos órgãos. A hemossiderose atinge principalmente o fígado e pode evoluir causando cirrose [14].

3.2.2. Manganês

O manganês possui várias funções no organismo humano, atua como ativador de sistemas enzimáticos importantes (metabolismo de carboidratos, aminoácidos e colesterol), na síntese de neurotransmissores, ácidos graxos e colesterol, e participa da formação e desenvolvimento de ossos, cartilagens e tendões. Em um indivíduo adulto pode atingir uma massa de até 20 gramas e distribui-se entre os ossos, rins, fígado e glândulas suprarrenais [11, 12].

A deficiência deste mineral no organismo está associada a baixos níveis de dopamina. Além disso, anomalias esqueléticas (má formação óssea), intolerância à glicose e a alteração no metabolismo de carboidratos e gorduras

também são associados ao déficit de manganês no organismo. Por outro lado o excesso deste elemento pode causar distúrbios neurológicos [12].

Grãos integrais, ervilha, beterraba, alfafa e nozes são consideradas fontes naturais de manganês para o organismo. Os cereais polidos e alimentos processados contém um baixo teor do mineral [12].

3.2.3. Selênio

Na forma de selenito de metal, forma inorgânica e selenometionina, forma orgânica, em baixas concentrações apresenta-se como nutriente essencial à manutenção da saúde humana. Distribui-se no organismo humano entre o sangue e os tecidos, compondo algumas metaloproteínas, estando cerca de 30 % localizado no fígado, 15 % no rim, 30 % nos músculos, e 10 % no plasma sanguíneo [15].

Associado à vitamina E, o selênio, apresenta uma eficiente ação antioxidante, principalmente para as membranas celulares. Além disso, auxilia na formação de anticorpos e na síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). Proporcionando também atividades anticarcinogênicas, uma vez que combate a ação de radicais livres enquanto componente de peroxidases e atua no metabolismo dos hormônios da tireoide, T3 e T4 [12, 16].

A deficiência deste elemento no organismo pode provocar mialgia e fraqueza muscular, havendo a possibilidade do desenvolvimento de insuficiência cardiovascular. Em contrapartida, o excesso, ingestão acima de 400 miligramas diários, pode ser letal. As principais fontes de selênio para o organismo são os vegetais folhosos (verdes), tomate, grãos, frutos do mar, levedo de cerveja, cebola e alho. A maior biodisponibilidade do mineral provém das fontes animais quando comparada com as fontes vegetais [12].

3.2.4. Zinco

O zinco é um dos micronutrientes responsáveis pelo imunológico humano. Em um indivíduo adulto estão presentes dois gramas que se distribuem entre todas as partes do corpo. A maior parte deste elemento está dividida entre a coróide do olho, a próstata e o tecido ósseo. O zinco integra também um grande número de enzimas e atua nos processos de síntese e degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, bem como no metabolismo de outros micronutrientes [17].

As fontes naturais de zinco dividem-se entre fontes com teores bons, moderados e baixos do elemento. As melhores fontes do mineral são as carnes vermelhas magras, cereais integrais, leguminosas e legumes. As fontes moderadas encontradas no arroz polido, a carne de porco, frango e carnes vermelhas com elevado teor de gordura. As fontes com baixo teor do elemento são os peixes, raízes e tubérculos, vegetais folhosos verdes e frutos [12].

O excesso deste mineral no organismo pode causar náusea, vômito, diarreia, febre e letargia, além de interferir no metabolismo de outros minerais. Por outro lado, a sua deficiência é atribuída à má cicatrização de ferimentos, retardo na maturação sexual e dos ossos, além de aumentar a incidência de doenças infecciosas relacionadas a defeitos no sistema imunológico [18]. A deficiência do zinco é mais comum em crianças uma vez que o desenvolvimento celular depende diretamente deste metal. Desta forma, este grupo de indivíduos merece especial atenção no que tange à quantidade ingerida diariamente [19].

De um modo geral, fitatos, oxalatos, fosfatos, taninos fibras e celulose apresentam efeito quelante. Assim, quando presentes em excesso, formam sais insolúveis dos nutrientes minerais promovendo a excreção elevada destes pelas fezes. As quantidades adequadas para ingestão diárias de minerais suficiente para a manutenção da saúde humana estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Ingestão diária recomendada (IDR) disponibilizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para alguns nutrientes minerais.

Grupo	IDR								
	Ca ^a (mg d ⁻¹)	Fe (mg d ⁻¹)	Mg (mg d ⁻¹)	Mn ^a (mg d ⁻¹)	Na ^a (g d ⁻¹)	P (mg d ⁻¹)	Se (µg d ⁻¹)	K ^a (g d ⁻¹)	Zn (mg d ⁻¹)
<i>Crianças</i>									
0 – 6 meses	210	0,27 ^a	30 ^a	0,003	0,12	100 ^a	15 ^a	0,4	2a
7 – 12 meses	270	11	75 ^a	0,6	0,37	275 ^a	20 ^a	0,7	3
<i>Crianças</i>									
1 – 3 anos	500	7	80	1,2	1,0	460	20	3,0	3
4 – 8 anos	800	10	130	1,5	1,2	500	30	3,8	5
<i>Homens</i>									
9 – 18 anos	1300	10	350	2,2	1,5	1250	47	4,6	9
19 – 70 anos	1000	8	410	2,3	1,4	700	55	4,7	11
> 70 anos	1200	8	420	2,3	1,2	700	55	4,7	11
<i>Mulheres</i>									
9 – 18 anos	1300	12	300	1,6	1,5	1250	47	4,6	9
19 – 70 anos	1000	16	310	1,8	1,4	700	55	4,7	8
> 70 anos	1200	8	320	1,8	1,2	700	55	4,7	8
<i>Gestantes</i>									
14 – 18 anos	1300	27	400	2,0	1,5	1250	60	4,7	12
19 – 50 anos	1000	27	355	2,0	1,5	700	60	4,7	11
<i>Lactantes</i>									
14 – 18 anos	1300	10	360	2,6	1,5	1250	70	5,1	13
19 – 50 anos	1000	9	315	2,6	1,5	700	70	5,1	12

^aIngestão adequada, para lactentes equivale à ingestão média. Fonte: Adaptado de *NationalAcademyofSciences*.

4. Análise multivariada

A obtenção de dados em grandes quantidades e com elevada complexidade do ponto de vista matemático e estatístico exige o uso de ferramentas computacionais que facilitem a sua interpretação. Como por exemplo, os resultados provenientes da determinação simultânea de uma grande quantidade de elementos químicos em amostras diversas, nos laboratórios de química analítica [20]. A exemplo de técnicas que fornecem dados complexos, têm-se para determinações simultâneas a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e para determinações sequenciais rápidas de um grande número de elementos a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A partir dos avanços ocorridos na área da informática, “hardware” e “software”, o tratamento destes dados tornou-se possível. Assim, a necessidade de se conhecer e explorar melhor a grande quantidade de dados obtidos nas análises aliada ao uso das ferramentas computacionais deu origem à subárea da química denominada quimiometria [21].

A quimiometria é um ramo da química que se baseia na aplicação de artifícios matemáticos e de informática para explorar e interpretar dados de natureza multivariada. Assim, tem como objetivo obter o máximo de informações a partir da análise destes dados [22]. Outra vantagem do uso da quimiometria é a minimização da quantidade de experimentos realizados durante o desenvolvimento de métodos analíticos, ao empregar métodos de otimização multivariada. Como ferramenta de trabalho também fornece informações sobre possíveis interações entre as variáveis estudadas, isto é, a influência que uma variável exerce sobre a outra, informações estas não fornecidas em métodos univariados de análise.

A análise de componentes principais (PCA – *do inglês Principal Component Analysis*) é um método estatístico utilizado para analisar dados multivariados projetando dados n-dimensionais em espaços de duas ou três dimensões. Sendo assim, considera apenas os dados mais representativos (as

componentes principais), a partir de combinações lineares dos dados originais – o que reduz a quantidades dos dados [23, 24].

A PCA é considerada um método exploratório que permite a elaboração de hipóteses gerais a partir de dados obtidos e/ou coletados, confrontando-os com estudos direcionados nos quais as hipóteses são previamente testadas. Esta ferramenta é capaz de separar as informações importantes das informações nas quais não se tem interesse, as redundantes e aleatórias. O agrupamento das amostras em uma PCA define a estrutura dos dados através de gráficos de escores e pesos, cujos eixos são as componentes principais (CPs) nos quais os dados são projetados. Neste caso, os escores fornecem a composição das CPs em relação às amostras, enquanto os pesos fornecem essa mesma composição em relação às variáveis.

Os eixos das CPs geradas são ortogonais permitindo a investigação das relações existentes entre amostras e variáveis através da análise dos gráficos de escores e pesos. Sendo possível avaliar a influência de cada variável em cada amostra a partir do conjunto de escores e pesos. A significância dos pesos das variáveis depende do módulo dos valores encontrados após o processamento dos dados, em que, quanto maior for o peso de uma variável maior será a sua significância. As variáveis podem se relacionar positiva ou negativamente a depender da distribuição espacial das mesmas. Assim, fatores de mesmo sinal são considerados correlacionados e fatores com sinais opostos são classificados como anti-correlacionados [24, 25].

A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA – *do inglês* Hierarchical clustering analysis) é um método de análise no qual as distâncias métricas entre as amostras são calculadas. Neste processo hierárquico, cada amostra é considerada inicialmente de forma “isolada”, como um grupamento separado, e a cada cálculo de distância realizado a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, unindo-se pares semelhantes até a obtenção de um único grupo, no qual todos os pontos são agrupados [26].

A HCA tem por objetivo exibir os dados em um espaço bidimensional enfatizando os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras e variáveis) fornece o grau de similaridade entre as propriedades avaliadas, assim, quanto mais próximos estiverem estes pontos no

espaço amostral, mais similares são as propriedades. Os resultados obtidos a partir das HCA são apresentados na forma de dendrogramas, que agrupam as amostras (ou variáveis) de acordo com suas similaridades. As metodologias mais utilizadas para o cálculo da similaridade são a distância euclidiana e a técnica de conexão baseada na distância do vizinho mais próximo [27].

5. Objetivo

5.1. Objetivo geral

Determinar e avaliar a composição mineral de fórmulas infantis à base de cereais empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ICP OES.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações de macro e microelementos nas amostras e comparar com os valores informados pelos fabricantes;
- Avaliar, com o auxílio da análise multivariada (PCA e HCA), a distribuição média destes elementos nas amostras, o grau de similaridade entre elas e correlaciona-las com o teor de minerais;
- Avaliar a biodisponibilidade dos minerais contidos nas amostras por meio do percentual de extração de macro e microelementos com solução de suco gástrico simulado;
- Avaliar a eficiência extrativa de uma solução gástrica comparando-a à mineralização total da matriz da amostra, no que tange ao teor dos minerais avaliados;
- Determinar quais das amostras apresentam maior e menor valor nutricional.

6. Parte experimental

6.1. Equipamentos/ acessórios

No desenvolvimento do trabalho utilizou-se agitador mecânico, marca Ética modelo 109 2; banho de aquecimento VWR modelo 75D; centrífuga Janetzki modelo T32c, e espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) com configuração axial: VISTA PRO (VARIAN, Mulgrave, Victoria, Austrália). Os parâmetros operacionais do ICP OES estão apresentados na Tabela 2. Na Tabela 3, encontram-se os elementos determinados e as respectivas linhas de emissão utilizadas.

Tabela 2. Parâmetros operacionais do ICP OES.

Parâmetros	Condições
Rádio-freqüência do gerador (MHz)	40
Potência (kW)	1,2
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás do auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,8
Vazão de bombeamento da amostra (mL min ⁻¹)	0,7
Câmara de nebulização	<i>Sturman-Masters</i>
Nebulizador	V-Groove

Tabela 3. Analitos determinados e as respectivas linhas de emissão utilizadas.

Elemento	Linha de Emissão (nm)
Cálcio (Ca)	422,673
Ferro (Fe)	238,204
Fósforo (P)	213,618
Manganês (Mn)	257,610
Magnésio (Mg)	279,553
Potássio (K)	766,491
Selênio (Se)	196,026
Sódio (Na)	589,592
Zinco (Zn)	213,857

6.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções de amostras foram preparadas com reagentes de grau analítico. Ácido nítrico concentrado, 70 % (m/m) (Merck); Ácido clorídrico 37 % (m/m); Cloreto de sódio (Merck); Pepsina (Sigma-Aldrich); Peróxido de hidrogênio 30 % (v/v) (Merck). Solução estoque de Ca, Mg, Na, K, Zn, P, Mn e Se em HNO₃ (5 %) 1000 mg L⁻¹ SpecSol; Solução estoque de Fe em HNO₃ (5 %) 1000 mg L⁻¹ Fluka. No preparo das soluções e em todos os procedimentos usou-se água ultrapura, obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) com resistividade específica de 18 MΩ cm⁻¹. As soluções de trabalho foram preparadas a partir dos reagentes relacionados acima em HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ para o estudo da mineralização total das amostras e em pH 2,0 para a solução gástrica composta por HCl, NaCl e Pepsina.

As vidrarias e demais frascos foram lavados com detergente neutro em água corrente e enxaguados com água desionizada. Permaneceram submersos em banho de HNO₃ 10 % por 24 horas para descontaminação e após este período enxaguados com água ultrapura.

6.3. Amostras

O trabalho foi realizado utilizando amostras de fórmulas infantis à base de cereais compradas em diferentes supermercados da Cidade de Salvador – BA. Sendo as amostras compostas por diferentes cereais: arroz, milho, aveia, e amido de amido Todas as amostras comercializadas sob a forma de farinha.

6.4. Procedimento experimental

6.4.1. Mineralização ácida a quente

Para a mineralização a quente realizou-se uma digestão por via úmida em bloco digestor, usando dedo frio. Nesta etapa foram pesados aproximadamente 0,5 g de amostras diretamente no tubo digestor, em seguida foram adicionados 5 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂. As amostras ficaram em repouso durante 30 minutos para pré-digestão, e após este período foram submetidas a uma temperatura de 140 °C durante cinco horas. Os experimentos foram realizados em triplicata, os brancos analíticos compostos por 5 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂ e submetidos às mesmas condições experimentais das amostras. Após a total mineralização da matriz, e resfriamento, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno de 15 mL e o volume foi completado com água ultrapura até um volume de 14 mL.

Os macrossubstâncias Ca, Mg, Na, K e P e os microelementos Mn, Fe, Se e Zn foram quantificados por ICP OES nas amostras mineralizadas. A faixa linear de trabalho para os macro elementos variou de 1 – 100 mg L⁻¹ e para os micro elementos de 0,5 – 10 mg L⁻¹ em HNO₃ 3,0 mol L⁻¹.

6.4.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram determinados realizando-se a quantificação de dez brancos analíticos preparados segundo o método de digestão por via úmida empregado nas amostras. Os valores de LD

Tabela 4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para o método.

Elemento	LD* (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Ca	4,98	1,66
K	4,61	1,54
Mg	2,31	0,77
Na	4,35	1,45
P	1,67	0,56
Fe	0,41	0,14
Mn	0,19	0,06
Se	0,68	0,23
Zn	0,20	0,07

* Os valores encontrados estão apresentados em potência de 10⁻¹

6.4.3. Extração com solução de suco gástrico simulado

De modo a simular a extração dos minerais pelo organismo, fez-se o uso de uma solução gástrica com pH 2,0 preparada durante a realização do trabalho. Nesta etapa foram preparados 250 mL de uma solução HCl – pepsina, pesando-se 0,8 g de pepsina, isolada do intestino de suínos, 0,150 g de NaCl e adicionado 1,75 mL de HCl 37%, o volume da solução foi completado utilizando água desmineralizada. O procedimento utilizado foi adaptado do trabalho de extração de minerais em folhas de chá realizado por PEREIRA 2010 [28].

Assim, com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade dos nutrientes minerais empregou-se um procedimento de simulação da digestão. Inicialmente, foi realizado uma avaliação do volume de solução HCl – Pepsina. Em três erlenmeyers de 50 mL, foram pesados, diretamente, 0,5 g de amostra e a cada frasco foram adicionados 5mL de água morna (em torno de 50 °C). A determinação da condição inicial das amostras se deu por proporção a partir das recomendações de preparo do alimento pelo fabricante, substituindo-se o leite por água desmineralizada. A mistura passou por um período de repouso equivalente a 10 minutos, tempo necessário para que toda a massa pesada se tornasse uma espécie de mingau. Após este tempo adicionou-se, a cada erlenmeyer, os volumes 10, 20 e 30 mL da solução de HCl – Pepsina, solução extratora. O teste foi realizado em triplicata. As amostras foram submetidas a

agitação mecânica por aproximadamente uma hora sob uma temperatura de aproximadamente 37,5 °C alcançada com o auxílio de um banho de aquecimento, Figura 1. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3500 rpm. Após o procedimento as amostras foram armazenadas sob resfriamento.

Os macromelementos Ca, Mg, Na, K e P e os microelementos Mn, Fe, Se e Zn foram quantificados por ICP OES nas amostras mineralizadas. A faixa linear de trabalho para os macro elementos variou de 1 – 50 mg L⁻¹ e para os micro elementos de 0,5 – 10 mg L⁻¹ em pH 2,0.

Figura 1. Agitação sob aquecimento das amostras durante a extração com a solução gástrica.



7. Resultados e discussão

7.1. Composição mineral

Ao confrontar os resultados dos elementos encontrados nas amostras com as informações contidas nos rótulos dos alimentos avaliados, Tabela 5, foi possível observar que a presença de alguns elementos quantificados não é informada. A exemplo, tem-se o potássio, o magnésio e o selênio. Contudo, o teor encontrado destes elementos estão dentro dos limites de ingestão diária recomendados pela OMS e ANVISA descartando a possibilidade da intoxicação por estes elementos a partir da ingestão das fórmulas infantis à base de cereais.

Tabela 5. Quantidade de minerais (mg g⁻¹) contida em determinadas massas de amostra, informadas nas embalagens.

Mineral (mg)	Arroz	Milho	Arroz e aveia	Multicereais
Ferro	0,06 – 0,31	0,11 – 0,31	0,08 – 0,31	0,20 – 0,31
Cálcio	2,10 – 2,48	2,20 – 2,76	1,98 – 3,76	2,52 – 2,57
Sódio	0,75 – 1,95	0,35 – 2,33	0,25 – 2,71	1,62*
Zinco	0,07 – 0,14	0,14 – 0,17	0,14 – 0,17	0,14 – 0,17
Fósforo	1,20 – 1,50	0,90 – 2,05	1,38 – 3,43	1,10 – 1,86
Manganês**	0,02	0,02	0,02	0,02

* Mesmo valor para as amostras. ** Presente em uma única marca de amostra.

Os valores de concentração para os minerais nas amostras analisadas encontram-se dentro dos valores recomendados para ingestão diária. Sendo o suficiente enquanto complemento do aleitamento materno de crianças a partir de seis meses de vida. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios das concentrações de macro e microelementos em amostras de fórmulas infantis determinados por ICP OES representado pelo valor médio \pm intervalo de confiança, com confiabilidade de 95% (teste-t).

Amostra	Concentração (mg g ⁻¹)								
	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Se	Zn
Arz 1	3,80 \pm 0,29	1,09 \pm 0,25	0,332 \pm 0,059	1,81 \pm 0,26	2,88 \pm 0,59	0,184 \pm 0,007	0,0298 \pm 0,0018	0,0145 \pm 0,0133	0,091 \pm 0,015
Arz 2	3,93 \pm 0,22	1,52 \pm 0,42	0,598 \pm 0,189	3,42 \pm 0,09	3,99 \pm 0,95	0,338 \pm 0,060	0,0591 \pm 0,0133	0,0137 \pm 0,0046	0,223 \pm 0,051
Arz 3	4,36 \pm 0,87	1,23 \pm 0,28	0,391 \pm 0,087	2,76 \pm 0,42	2,57 \pm 0,64	0,517 \pm 0,133	0,0330 \pm 0,0050	0,0168 \pm 0,0010	0,249 \pm 0,231
Arz 4	3,28 \pm 0,61	0,74 \pm 0,36	0,209 \pm 0,101	3,71 \pm 0,59	2,59 \pm 0,40	0,295 \pm 0,079	0,0320 \pm 0,0062	0,0164 \pm 0,0103	0,026 \pm 0,007
Milho 1	2,88 \pm 0,38	2,95 \pm 0,47	0,623 \pm 0,065	0,26 \pm 0,07	1,65 \pm 0,23	0,285 \pm 0,028	0,0211 \pm 0,0006	0,0146 \pm 0,0061	0,185 \pm 0,028
Milho 2	3,45 \pm 0,19	3,08 \pm 0,30	0,648 \pm 0,204	0,10 \pm 0,05	1,73 \pm 0,47	0,195 \pm 0,020	0,0210 \pm 0,0011	0,0154 \pm 0,0030	0,085 \pm 0,024
Milho 3	4,29 \pm 0,39	2,45 \pm 0,16	0,590 \pm 0,197	3,35 \pm 0,88	3,65 \pm 0,31	0,374 \pm 0,082	0,0459 \pm 0,0112	0,0147 \pm 0,0051	0,163 \pm 0,054
Milho 4	4,68 \pm 0,40	1,44 \pm 0,35	0,250 \pm 0,053	3,91 \pm 0,75	2,85 \pm 0,25	0,536 \pm 0,074	0,0221 \pm 0,0009	0,0135 \pm 0,0056	0,218 \pm 0,038
AvArz 1	5,62 \pm 0,13	1,64 \pm 0,37	0,680 \pm 0,116	4,71 \pm 0,98	4,96 \pm 0,07	0,410 \pm 0,057	0,0629 \pm 0,0160	0,0163 \pm 0,0041	0,229 \pm 0,045
AvArz 2	5,21 \pm 0,13	1,95 \pm 0,46	0,727 \pm 0,149	4,09 \pm 0,90	4,24 \pm 0,08	0,487 \pm 0,090	0,0402 \pm 0,0047	0,0147 \pm 0,0035	0,193 \pm 0,056
AvArz 3	3,10 \pm 0,56	3,43 \pm 0,39	0,858 \pm 0,229	0,12 \pm 0,07	2,93 \pm 0,23	0,193 \pm 0,009	0,0486 \pm 0,0058	0,0148 \pm 0,0057	0,083 \pm 0,012
MC 1	3,82 \pm 0,56	1,48 \pm 0,18	0,338 \pm 0,147	2,51 \pm 0,35	2,47 \pm 0,31	0,529 \pm 0,180	0,0284 \pm 0,0043	0,0131 \pm 0,0102	0,163 \pm 0,061
MC 2	5,50 \pm 0,04	2,76 \pm 0,18	0,683 \pm 0,169	3,21 \pm 0,03	4,07 \pm 0,16	0,442 \pm 0,085	0,0663 \pm 0,0088	0,0142 \pm 0,0039	0,238 \pm 0,068
Arrzn1	0,05 \pm 0,03	0,26 \pm 0,09	0,061 \pm 0,017	0,25 \pm 0,06	0,90 \pm 0,11	0,525 \pm 0,071	0,0206 \pm 0,0007	0,0157 \pm 0,0127	0,233 \pm 0,046
Arrzn2	< LQ	0,30 \pm 0,05	0,041 \pm 0,006	0,22 \pm 0,04	0,79 \pm 0,07	0,498 \pm 0,043	0,0206 \pm 0,0001	0,0130 \pm 0,0069	0,208 \pm 0,024
Av 1	5,04 \pm 0,58	4,36 \pm 0,28	1,515 \pm 0,510	0,84 \pm 0,05	6,63 \pm 0,54	0,348 \pm 0,085	0,0638 \pm 0,0162	0,0134 \pm 0,0105	0,047 \pm 0,011

Classificação das amostras: Arz = arroz, Milho = milho, AvArz = aveia e arroz, MC = multicereais, Arrzn = arroz e amido de milho e Av = aveia;

As determinações foram realizadas em replicatas, n = 3.

< LQ: Valores encontrados estão abaixo do Limite de quantificação (LQ) do método aplicado.

Ao analisar a tabela de resultados, observa-se que as amostras compostas de farinha de arroz e amido de milho possuem os menores teores de macro e micronutrientes frente as demais. Um comportamento oposto é observado para a amostra a base de aveia visto que esta apresenta os teores mais elevados de macro e microelementos quando comparado as demais. As faixas de concentrações, em mg g^{-1} , dos macro e microelementos encontradas nas amostras estudadas estão na Tabela 7.

Tabela 7. Faixas de concentração encontradas para os macro e microelementos estudados nas amostras de fórmulas infantis à base de cereais.

Elemento	Faixa de concentração (mg g^{-1})	
	Valor mínimo \pm IC	Valor mínimo \pm IC
Cálcio	0,050 \pm 0,030	5,62 \pm 0,13
Potássio	0,260 \pm 0,090	4,36 \pm 0,28
Magnésio	0,041 \pm 0,006	1,52 \pm 0,51
Sódio	0,100 \pm 0,050	4,71 \pm 0,10
Fósforo	0,790 \pm 0,070	6,63 \pm 0,54
Ferro	0,184 \pm 0,007	0,54 \pm 0,07
Manganês	0,021 \pm 0,001	0,07 \pm 0,01
Selênio	0,013 \pm 0,007	0,017 \pm 0,001
Zinco	0,026 \pm 0,007	0,25 \pm 0,23

*IC = intervalo de confiança

As amostras que possuem aveia na composição, as amostras de multocereais, apresentaram comportamento semelhante, donde infere-se que a presença deste cereal na amostra seja a responsável pelo elevado teor de nutrientes nas mesmas. Contudo, este comportamento não é observado para todos os elementos estudados. De um modo geral, as amostras apresentaram teores similares de minerais. Assim, o emprego das fórmulas infantis a base de cereais como alimento complementar na dieta de crianças após o período de aleitamento materno auxilia na manutenção do RDI no que tange aos nutrientes minerais analisados.

7.2. Análise multivariada dos dados

O programa escolhido para a realização do pré-processamento dos dados foi o STATISTICA versão 6.0. O pré-processamento dos dados empregado na PCA foi o auto-escalamento, visto que se utilizou uma matriz de dados de correlação baseada na diferença das ordens de grandeza das variáveis estudadas. Na HCA o auto-escalamento também foi aplicado como pré-processamento das amostras e o método de Wards foi utilizado com distância Euclidiana entre os dados.

7.2.1. Análise dos componentes principais - PCA

Visando facilitar a interpretação dos dados obtidos e classificar as amostras segundo o teor de nutrientes foi realizada a análise multivariada dos dados lançando mão da análise de componentes principais, a PCA. A matriz de dados utilizada na análise multivariada das amostras está discriminada na Tabela 8. A PCA foi utilizada com a finalidade de classificar as amostras segundo o seu teor nutricional, dado pela quantidade de macro e microelementos.

Tabela 8. Matriz fatorial utilizada na análise multivariada das amostras das fórmulas infantis.

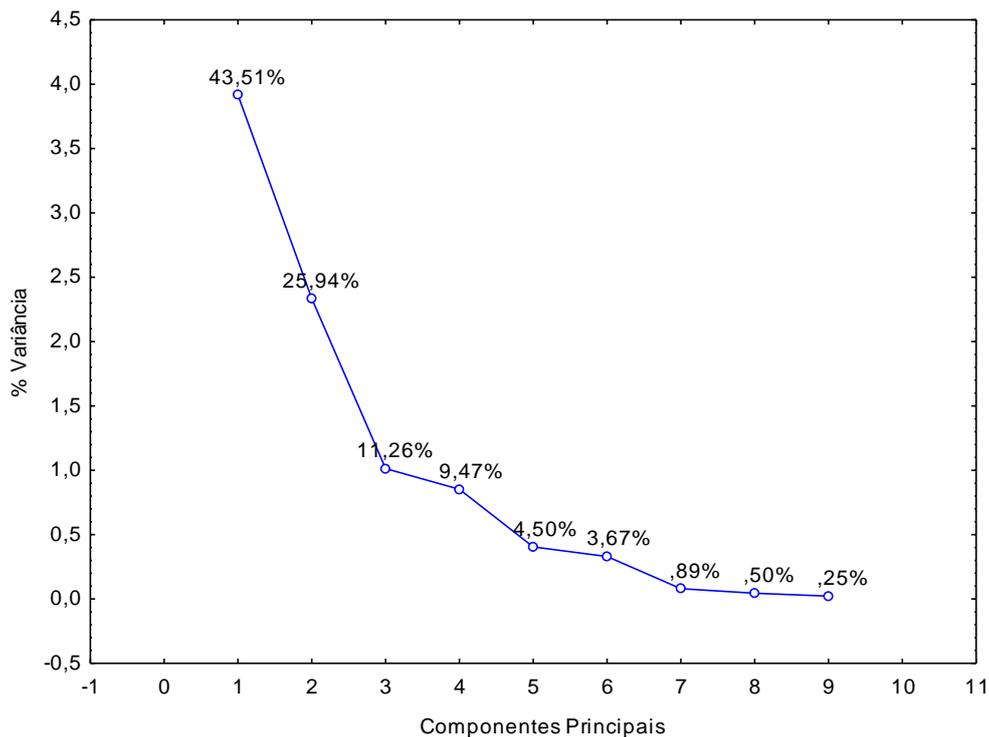
Amostra	Concentração (mg g ⁻¹)								
	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Se	Zn
Arz 11	3,923	1,197	0,354	1,897	3,079	0,186	0,031	0,009	0,097
Arz 12	3,805	0,999	0,307	1,689	2,617	0,181	0,029	0,020	0,085
Arz 13	3,687	1,084	0,333	1,830	2,929	0,186	0,030	0,015	0,091
Arz 21	3,845	1,395	0,537	3,390	3,698	0,319	0,059	0,013	0,209
Arz 22	4,020	1,460	0,573	3,459	3,852	0,330	0,054	0,016	0,213
Arz 23	3,932	1,718	0,683	3,425	4,421	0,365	0,065	0,012	0,247
Arz 31	4,360	1,338	0,391	2,764	2,444	0,555	0,035	0,021	0,352
Arz 32	4,010	1,226	0,356	2,594	2,408	0,456	0,031	0,013	0,171
Arz 33	4,711	1,114	0,426	2,934	2,870	0,539	0,033	0,016	0,223
Arz 41	3,524	0,730	0,204	3,478	2,745	0,290	0,032	0,019	0,026
Arz 42	3,030	0,609	0,171	3,714	2,425	0,266	0,030	0,012	0,024
Arz 43	3,277	0,895	0,251	3,949	2,585	0,329	0,035	0,019	0,029
Mlho 51	2,912	3,102	0,626	0,253	1,681	0,291	0,021	0,014	0,189
Mlho 52	2,717	2,737	0,596	0,234	1,548	0,272	0,021	0,013	0,171
Mlho 53	3,020	3,008	0,648	0,292	1,725	0,291	0,021	0,017	0,193

Tabela 8. Continuação

Amostra	Concentração (mg g ⁻¹)								
	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Se	Zn
MIho 61	3,455	3,082	0,557	0,079	1,527	0,188	0,021	0,014	0,074
MIho 62	3,379	2,961	0,667	0,112	1,750	0,192	0,021	0,016	0,087
MIho 63	3,530	3,203	0,718	0,119	1,900	0,204	0,022	0,016	0,094
MIho 71	4,138	2,388	0,610	3,435	3,529	0,384	0,042	0,017	0,173
MIho 72	4,294	2,452	0,502	2,958	3,653	0,337	0,045	0,013	0,138
MIho 73	4,450	2,517	0,657	3,647	3,777	0,401	0,051	0,015	0,177
MIho 81	4,515	1,301	0,232	3,645	2,744	0,512	0,022	0,012	0,205
MIho 82	4,839	1,438	0,244	3,845	2,948	0,527	0,022	0,013	0,216
MIho 83	4,677	1,584	0,274	4,242	2,846	0,569	0,022	0,016	0,235
AvArz 91	5,674	1,733	0,699	4,962	4,991	0,419	0,068	0,016	0,243
AvArz 92	5,624	1,467	0,627	4,256	4,963	0,383	0,056	0,018	0,208
AvArz 93	5,573	1,711	0,714	4,918	4,935	0,427	0,065	0,015	0,234
AvArz 101	5,267	1,890	0,688	3,922	4,208	0,461	0,039	0,013	0,174
AvArz 102	5,161	1,794	0,698	3,843	4,271	0,471	0,039	0,015	0,186
AvArz 103	5,214	2,153	0,797	4,508	4,239	0,529	0,042	0,016	0,218
AvArz 111	3,320	3,580	0,964	0,148	3,029	0,196	0,051	0,017	0,087
AvArz 112	3,121	3,433	0,818	0,092	2,841	0,194	0,049	0,013	0,084
AvArz 113	2,867	3,264	0,793	0,115	2,935	0,189	0,046	0,014	0,078
MC 131	3,592	1,412	0,284	2,373	2,346	0,451	0,027	0,015	0,141
MC 132	4,041	1,557	0,328	2,655	2,593	0,541	0,028	0,008	0,158
MC 133	3,816	1,484	0,401	2,514	2,470	0,595	0,030	0,016	0,189
MC 141	5,498	2,758	0,610	3,207	4,068	0,402	0,063	0,015	0,207
MC 142	5,515	2,820	0,744	3,194	4,134	0,464	0,066	0,012	0,258
MC 143	5,481	2,697	0,695	3,219	4,003	0,458	0,070	0,015	0,250
Arrzn 121	0,498	0,217	0,053	0,245	0,853	0,495	0,021	0,014	0,214
Arrzn 122	0,498	0,277	0,063	0,270	0,915	0,527	0,020	0,012	0,232
Arrzn 123	0,498	0,286	0,066	0,221	0,939	0,552	0,021	0,021	0,252
Arrzn 161	0,498	0,281	0,039	0,237	0,759	0,484	0,021	0,015	0,198
Arrzn 162	0,498	0,284	0,040	0,203	0,783	0,493	0,021	0,010	0,208
Arrzn 163	0,498	0,320	0,044	0,229	0,817	0,517	0,021	0,014	0,217
Av 151	5,040	4,364	1,280	0,838	6,625	0,310	0,057	0,016	0,042
Av 152	5,275	4,477	1,665	0,857	6,845	0,376	0,069	0,016	0,051
Av 153	4,805	4,251	1,599	0,818	6,406	0,356	0,065	0,009	0,048

Os nove analitos avaliados nas amostras estudadas geraram uma matriz de dados 48 x 9. As três primeiras componentes principais (CPs) da PCA descreveram 80,71 % da variância dos dados, sendo 43,51% da variância descrita pela CP1, 25,94% pela CP2 e 11,26 % pela CP3, resultados apresentados na Figura 2, juntamente com as demais informações de porcentagem das variâncias (CP 4 a CP 9).

Figura 2. Curva das variâncias apresentadas em cada componente principal (CP).

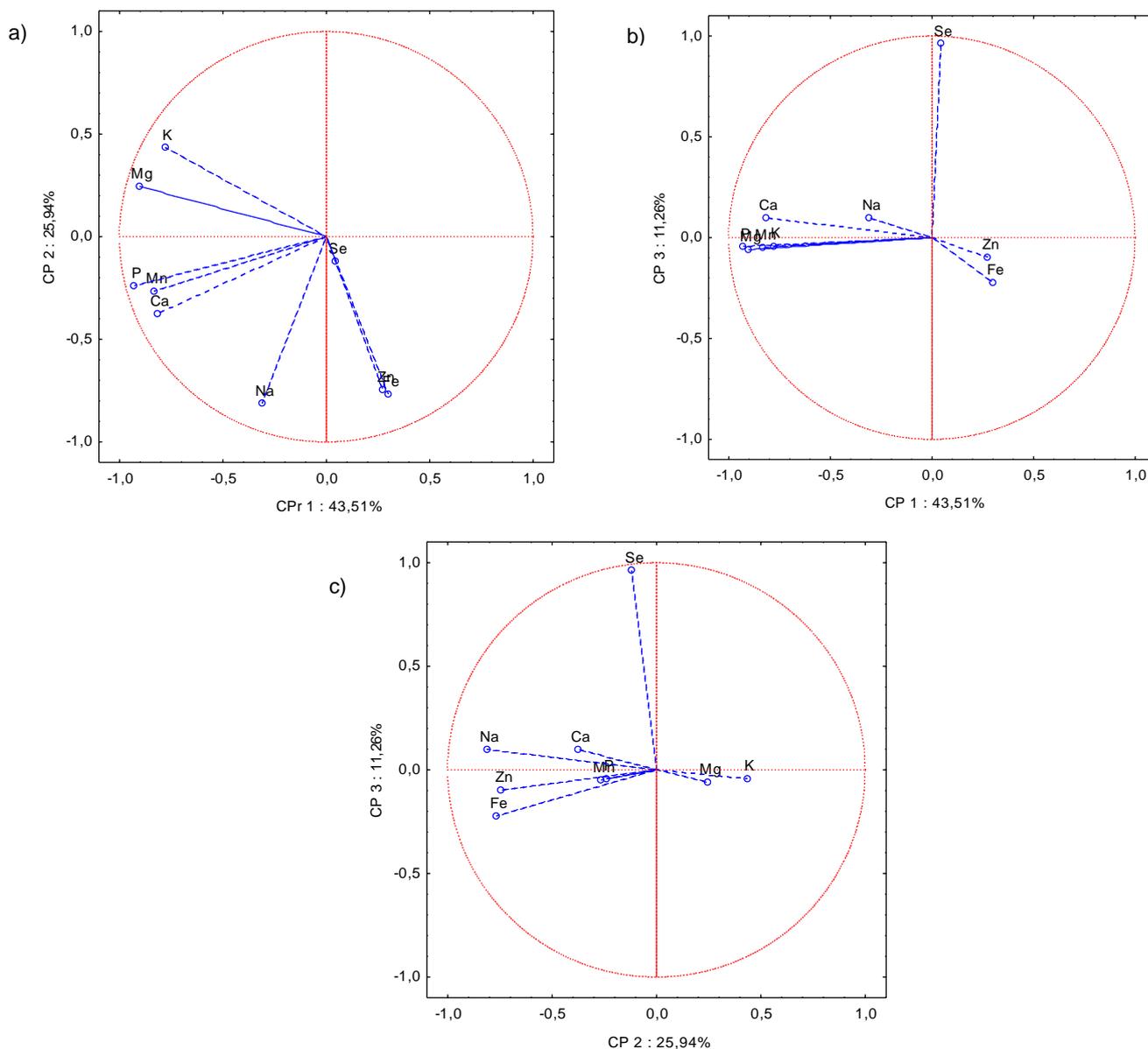


Os valores de peso das variáveis encontrados para as componentes principais obtidas estão plotados na Tabela 9. De acordo com os valores, em todas as CPs avaliadas, as variáveis de maior peso estão correlacionadas. Sendo as variáveis de maior peso da CP1: P, Mg, Mn, Ca e K, da CP2: Na, Fe e Zn e da CP3 o Se. Na Figura 3 está apresentada a distribuição espacial destes dados.

Tabela 9. Pesos das variáveis das três primeiras componentes principais.

Variáveis	CP 1	CP 2	CP 3
Ca	-0,817430	-0,375741	0,098597
K	-0,779232	0,435008	-0,040876
Mg	-0,905832	0,244654	-0,057102
Na	-0,309371	-0,812625	0,100078
P	-0,928645	-0,238375	-0,041515
Fe	0,300240	-0,767275	-0,221789
Mn	-0,833268	-0,264910	-0,049127
Se	0,042852	-0,118271	0,962368
Zn	0,274837	-0,744543	-0,095175

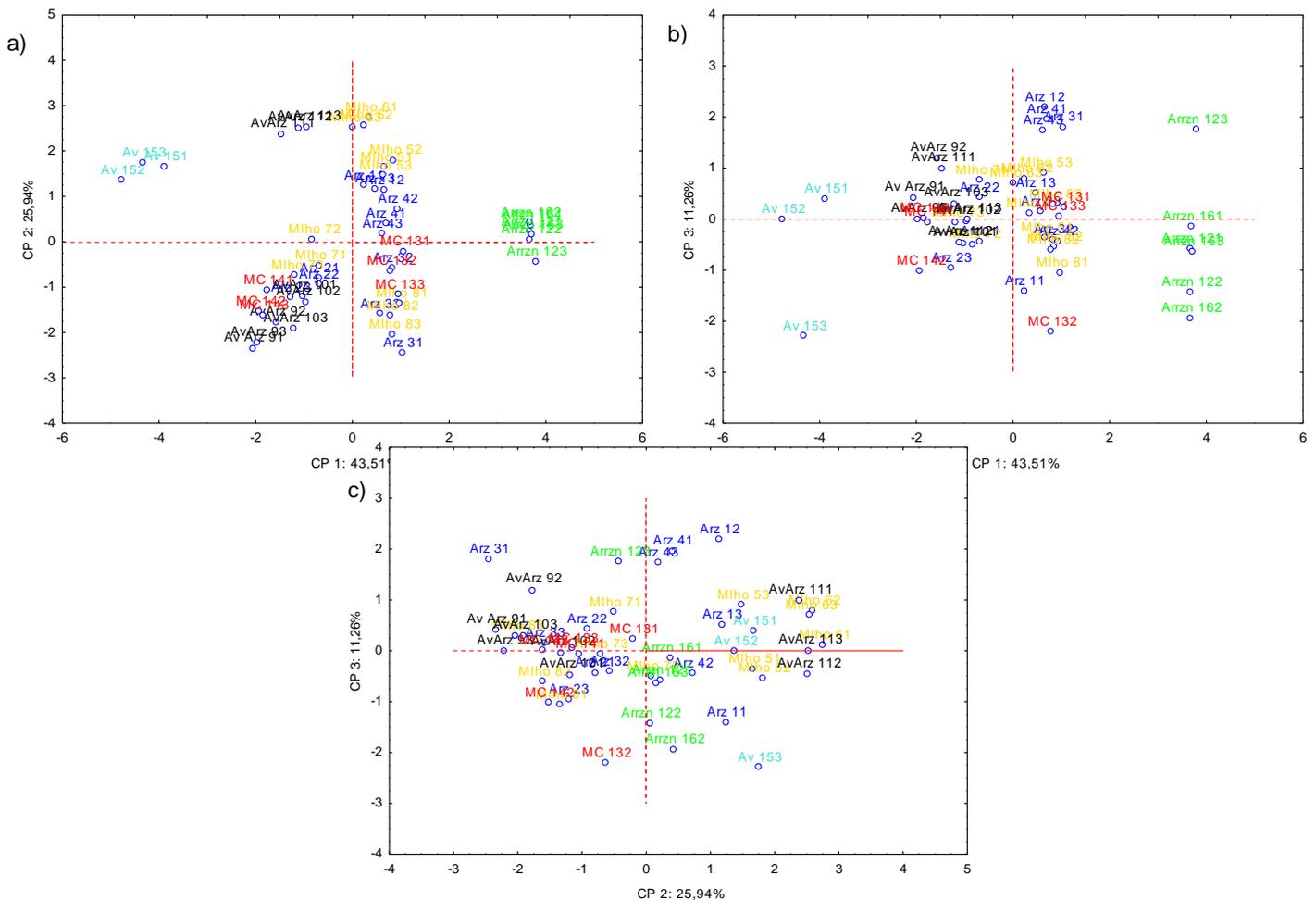
Figura 3. Gráfico de peso das variáveis estudadas nas fórmulas infantis, (a) CP 1 x CP2; (b) CP1 x CP 3 e (c) CP 2 x CP 3.



De acordo com os gráficos de escores, Figura 4, a única componente principal que sugere uma certa tendência à separação das amostras é a CP1. Nas Figuras 4a e 4b, pode-se observar que a amostra Av 1 localiza-se à esquerda de ambos os gráficos indicando que a mesma apresenta um maior teor de P, Mg, Mn, Ca e P, possuindo maior peso para a CP1 conforme citado anteriormente. Observa-se também um maior distanciamento das amostras Arrzn, compostas por amido de milho e farinha de arroz, das demais, estando estas localizadas mais à direita dos gráficos, indicando que elas contêm um menor teor desses elementos. As outras amostras, não apresentaram separação

aparente segundo a primeira componente principal. Ao analisar o gráfico e CP2 x CP3 não se observa separação das amostras, não sendo possível a classificação destas segundo o seu teor nutricional.

Figura 4. Gráfico de escores das matrizes das fórmulas infantis estudadas, (a) CP 1 x CP 2; (b) CP1 x CP 3 e (c) CP 2 x CP 3.

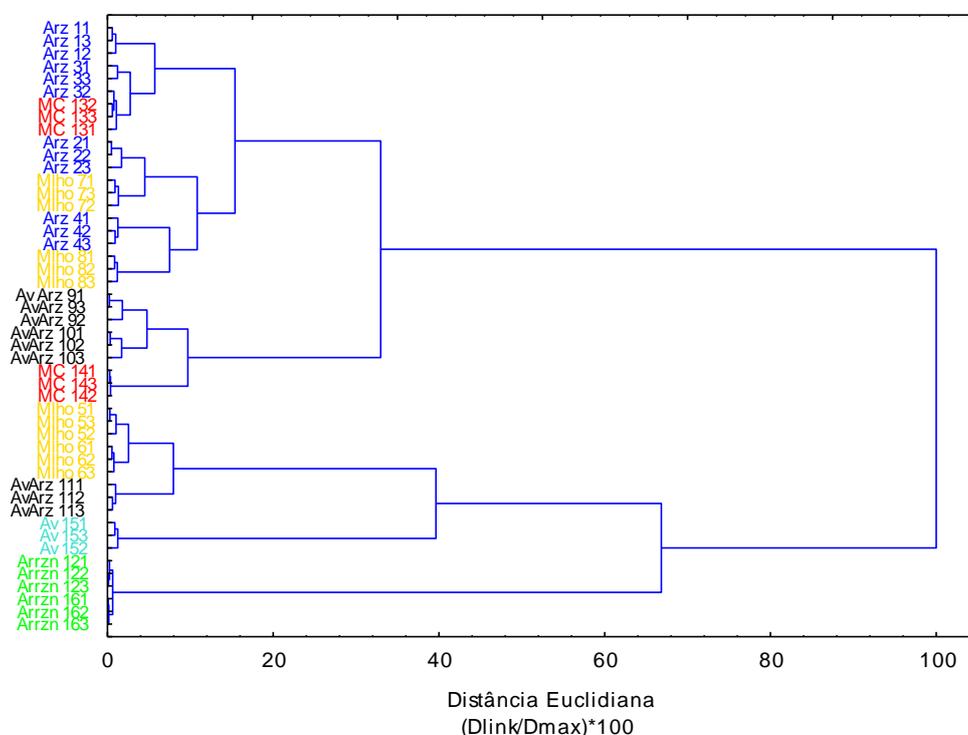


7.2.2. Análise de agrupamento hierárquico - HCA

A HCA permite a visualização da similaridade e das diferenças de composição mineral entre as amostras. O dendrograma obtido pelo método de Ward e distância euclidiana mostra a formação de dois grandes grupos, cada um formado por três subgrupos, ligados entre si. De acordo com o dendrograma as

amostras apresentam uma similaridade de 35 % no primeiro grupo e de 64 % apresentando um similaridade média de 49,5%.

Figura 5. Dendrograma da quantidade de minerais presentes nas amostras de fórmulas infantis.



No primeiro grupo pode-se observar que a amostra composta de farinhas de vários cereais MC 13 apresenta uma matriz nutricional similar à das amostras de farinha de arroz Arz 1 e Arz 3, onde infere-se a presença majoritária deste cereal na composição da referida amostra. No segundo subgrupo esta similaridade é observada para as amostras de farinha de milho Mlho 7 e Mlho 8 e farinha de arroz Arz 2 e Arz 4. O terceiro subgrupo mostra a existência de proximidade das matrizes das amostras compostas por farinha de arroz e aveia AvArz 9 e AvArz 10 e a amostra MC 14. As amostras contidas no segundo grupo foram separadas conforme o tipo de cereal não havendo proximidade de matriz mineral entre elas.

Assim como na PCA, as amostras foram agrupadas de acordo com o teor de minerais que contém, independentemente do tipo de cereal da qual são preparadas. Apenas as amostras à base de aveia e à base de farinha de arroz e amido de milho foram agrupadas em separado, comportamento relatado nas observações anteriores.

7.3. Extração com suco gástrico simulado

De posse dos resultados da mineralização completa das amostras a partir da digestão por via úmida, os percentuais de extração dos minerais com solução de HCl – pepsina foram calculados. Primeiro, a capacidade extrativa da solução HCl – pepsina foi avaliada com relação à amostra composta por aveia, uma vez que apresentou um maior potencial nutricional. Os resultados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10. Otimização univariada do volume de solução de suco gástrico simulado a ser empregado na extração de macro e microelementos em fórmulas infantis.

Amostra	% Extração					
	Ca	K	Mg	P	Fe	Zn
10 mL	55,43	66,43	68,86	18,52	1,69	14,21
20 mL	67,83	81,73	80,08	26,90	2,28	19,15
30 mL	72,22	86,68	81,27	29,74	2,44	20,50

De acordo com os resultados o uso de 30 mL de solução extratora proporcionou o melhor desempenho na extração dos minerais presentes na amostra. O uso de volumes maiores foi descartado uma vez que provocariam a diluição demasiada das amostras podendo dificultar a quantificação de alguns analito. Após a avaliação do volume a ser usado, realizou-se a extração dos minerais nas outras amostras. A consequência do estudo está contida na Tabela 11.

Tabela 11. Percentual de extração de macro e microelementos em fórmulas infantis com solução de suco gástrico simulado comparado à mineralização total da matriz.

Amostra	% Extração					
	Ca	K	Mg	P	Fe	Zn
Arz 1	43,72	54,96	36,82	46,35	2,58	43,91
Arz 2	44,10	48,50	39,39	37,77	3,77	49,22
Mlho 1	47,46	53,69	52,55	46,57	10,34	56,90
Mlho 2	39,64	48,44	49,16	45,02	6,99	43,62
AvArz 1	47,50	51,51	44,22	43,01	7,45	49,04
AvArz 2	46,85	46,84	37,55	37,09	33,65	51,91
MC 1	39,67	46,12	20,64	26,77	35,91	41,63
MC 2	37,48	39,20	32,70	29,18	9,69	41,79
Av 1	72,22	86,68	81,27	29,74	2,44	20,50

Observando os resultados percebe-se que o percentual de extração, e portanto, a biodisponibilidades dos minerais não varia sistematicamente de acordo com a matriz e o elemento analisado, sendo os menores percentuais de extração obtidos para o Fe, exceto para as amostras AvArz 2 e MC1. A amostra composta por aveia apresentou os maiores percentuais de extração para os minerais Ca, Mg e K quando comparada às restantes. Assim, infere-se que esta classe de alimento não representa uma fonte adequada de ferro para a complementação nutricional de crianças após a fase de amamentação, 0 a 6 meses de vida. Deste modo, é recomendada a incorporação de alimentos que possam complementar o IDR de ferro à dieta desses indivíduos.

8. Conclusão parcial

Os resultados da mineralização total das matrizes permitem inferir que as amostras avaliadas não diferem significativamente com relação à composição no que tange ao teor de minerais. Ao comparar os minerais encontrados com as informações nutricionais contidas nas embalagens, pôde-se observar que a presença de alguns minerais encontrados, magnésio, potássio e selênio, não é informada pelos fabricantes. Contudo, por estar de acordo com o nível de ingestão diária recomendado pelas agências reguladoras, OMS e ANVISA, e não oferecem riscos à saúde dos consumidores alvo.

Considerando a composição das amostras, a partir da análise de componentes principais, conclui-se que o cereal contendo aveia possui um maior teor dos nutrientes minerais fósforo, magnésio, manganês, cálcio e potássio, quando comparada às demais. O oposto pode ser observado para as amostras composta pela mistura de amido de milho e farinha de arroz. Assim, infere-se que a presença de aveia na composição das amostras de multicereais e composta pela mistura de aveia e arroz contribui para um aumento da quantidade de minerais nas mesmas.

O estudo da biodisponibilidade dos minerais ratifica a presença do maior teor de minerais na amostra à base de aveia, uma vez que a amostra avaliada apresentou maiores percentuais de extração, no que tange à presença dos minerais cálcio, potássio e magnésio, quando comparada ao conjunto de amostras estudado. Além disso, conclui-se também que o ferro, dentre os minerais avaliados, apresenta menor biodisponibilidade frente às matrizes analisadas.

Neste caso, deduz-se que as amostras compostas por mais de um tipo de cereal apresentam valores balanceados de nutrientes minerais sendo estas as mais indicadas para a complementação alimentar de crianças a partir do sexto mês de vida. No entanto, outros alimentos devem ser acrescentados de modo a servir como complementação de ferro, uma vez que o estudo de biodisponibilidade apontou que dentre os minerais avaliados este demonstrou baixo percentual de extração frente à solução gástrica de HCl – pepsina aplicada.

Parte II – Desenvolvimento de método analítico para determinação de Cr em farinhas de cereais empregando amostragem direta de sólido e HR-CS ET AAS

9. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

9.1. Aspectos gerais

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica muito bem consolidada atualmente, sendo empregada na determinação de metais, metalóides e, de forma indireta, de ametais nos mais diversos tipos de matrizes: biológicas, ambientais, alimentícias e geológicas [29].

A AAS fundamenta-se na medida da redução da radiação eletromagnética emitida por uma fonte primária devido à absorção desta por átomos livres em estado gasoso, gerados em um atomizador. Em AAS os atomizadores mais comumente utilizados são a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS – do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é empregada na determinação de espécies com concentração em nível de mg L^{-1} . A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS – do inglês *Eletrothermal Atomic Absorption Spectrometry*) é aplicada na análise elementar a níveis traço, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ [30].

A AAS se divide em dois tipos fundamentais: a espectrometria atômica convencional, com fonte de linha (LS AAS), e espectrometria atômica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS AAS). Na LS AAS a fonte de radiação utilizada emite apenas o comprimento de onda (λ) específico do elemento de interesse. Sendo o λ emitido estreito o suficiente (da ordem de picômetros) de modo a não emitir radiação de fundo e/ ou linhas de outros elementos. Assim, a LS AAS dispensa monocromadores de elevada resolução [31]. A correção de

fundo é feita geralmente com uma das três formas: uso lâmpada de deutério como fonte secundária de radiação; uso do pulso da fonte de radiação em corrente elevada; e aplicação de um campo magnético para fazer o desdobramento das linhas atômicas, o chamado efeito Zeeman. Contudo, apesar do bom desempenho do sistema de correção empregando o efeito Zeeman, nenhum dos três sistemas de correção de fundo conduz a resultados considerados ideais [32].

Na HR-CS AAS utiliza-se uma lâmpada de arco curto de xenônio como fonte contínua de radiação, sendo esta constituída de dois eletrodos de tungstênio com distância de 1mm entre si e operada em potência elevada, 300 W. Além disso, dispõe de monocromador duplo de alta resolução e de um arranjo linear de dispositivos de cargas acopladas (CCD) como detector. A correção de fundo é feita segundo um sistema de correção automática. A configuração deste equipamento permite a determinação das espécies químicas metálicas com limites de detecção até cinco vezes menor do que na LS AAS. Também fornece informações acerca do ambiente espectral da linha analítica e permite determinações multielementares de forma sequencial rápida [32].

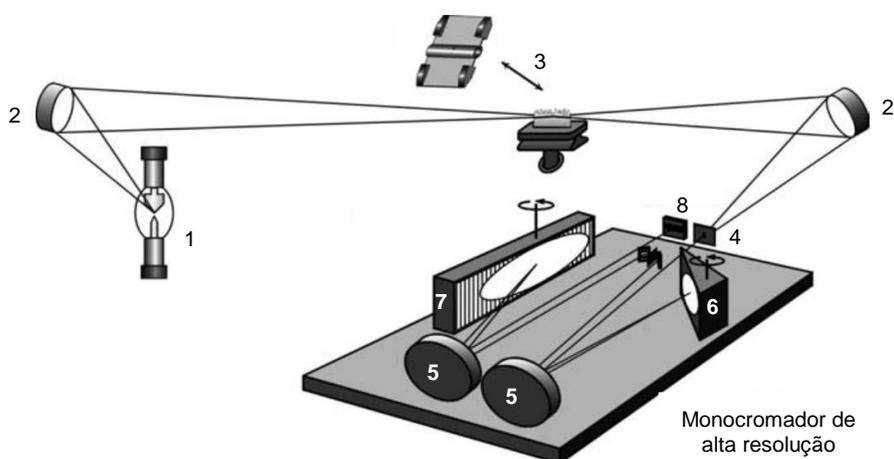
9.2. *Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS)*

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) representa uma nova geração da espectrometria de absorção atômica e proporciona algumas vantagens quando comparada à LS AAS. A lâmpada de arco curto de Xe utilizada no equipamento opera em modo hot spot e emite radiação contínua numa faixa entre 190 e 850 nm. Devido à elevada potência na qual é operada, a intensidade de emissão excede de uma a três ordens de magnitude a intensidade de lâmpadas de cátodo oco utilizadas em equipamentos de AAS convencionais. E uma vez que o ruído de absorvância é inversamente proporcional à raiz quadrada da intensidade, espera-se

melhoras na relação sinal/ruído (S/N), no limite de detecção (LD) por um fator de três a dez vezes e menores valores de desvio padrão relativo (RSD) para equipamentos de HR-CS AAS quando comparados aos equipamentos de AAS convencionais.

A radiação emitida, após passar pelo caminho óptico, local de concentração da nuvem atômica, é direcionada ao monocromador duplo de alta resolução chamado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), composto por um prisma e por uma rede de difração do tipo *echelle*. Após a seleção do comprimento de interesse, a radiação é direcionada ao detector, constituído por um arranjo linear de CCD composto de 512 *pixels*, dos quais 200 servem a analíticos, sendo estes iluminados e “lidos” simultaneamente e podem ser considerados como detectores independentes [32]. A Figura 6 consiste numa representação esquemática da configuração atual dos equipamentos de HR-CS AAS.

Figura 6. Representação esquemática da configuração atual de um equipamento de HR-CS AAS. Em que: 1) lâmpada de arco curto de Xe; 2) espelhos elipsoidais focalizadores; 3) atomizadores (chama e forno de grafite); 4) fenda de entrada do monocromador; 5) espelhos parabólicos; 6) prisma; 7) rede *echelle* e 8) detector CCD. Fonte: Adaptação de Welz, 2005.



A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS) é uma técnica empregada na análise elementar, para determinações em níveis traço, visto que tem elevada sensibilidade e seletividade. Tais características estão associadas ao tempo de permanência (um segundo ou mais) e o elevado volume de analito

no caminho óptico durante a etapa de atomização. O forno de grafite é o atomizador mais comumente utilizado para esta técnica requerendo pequenos volumes de amostra. Os limites de detecção obtidos nas análises atendem concentrações da ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, para a maioria dos elementos [33,30]. Dadas as suas vantagens, a HR-CS ET AAS tem o uso amplamente difundido.

9.3. Amostragem direta de sólidos

9.3.1. Fundamentos

A amostragem direta de sólidos pode ser realizada tanto por meio de suspensões (SIS) quanto por meio de uma amostra sólida pulverizada (SS), sendo as determinações elementares realizadas com o mínimo de manipulação do operador, visto que dispensa procedimentos morosos de preparo de amostra [34].

Algumas características apresentadas pela GF AAS apontam esta técnica como uma das mais adequadas para o emprego da SS. Podendo-se citar: o programa aquecimento do forno de grafite que permite a realização de um pré-tratamento térmico da amostra, podendo ser considerado como uma digestão *in situ*, auxiliando assim na remoção de componentes da matriz da amostra que por ventura possam causar interferências no sinal de absorvância; uso de pequenas quantidades de amostra que podem ser pesadas com o auxílio de uma microbalança; alta seletividade e sensibilidade; ausência de problemas relacionados à eficiência de transporte das amostras onde as suspensões são amostradas de forma discreta (dispensando o uso de nebulizadores) e as alíquotas sólidas são pesadas diretamente na plataforma de grafite pirolítico e depois introduzidas no atomizador eletrotérmico; possibilidade de calibração do instrumento empregando soluções aquosas pois o uso de modificadores químicos aliado à otimização do programa de aquecimento torna essa possibilidade viável [34, 35].

Contudo, algumas dificuldades inerentes à aplicação da SS limitam a plena aplicação da técnica: i) dificuldade de introduzir pequenas alíquotas de uma amostra sólida no atomizador – os primeiros acessórios de SS utilizados para a pesagem e introdução das amostras no atomizador eram de uso relativamente complexo, contudo, acessórios automatizados compostos por dispositivos de pesagem e inserção automáticas das plataformas de grafite contendo as amostras sólidas no interior do atomizador estão disponíveis no comércio; ii) a baixa precisão, em geral expressa sob a forma de desvio padrão relativo (RSD), comparado à análise de soluções – valores de RSD de até 20 % para SS contra 1 % para amostras líquidas, sendo esta dificuldade relacionada ao uso da amostra *in natura*. Entretanto, neste caso não há propagação de erros sistemáticos e, pode ainda, fornecer informações acerca da heterogeneidade das amostras; iii) possível complexidade do procedimento de calibração – em geral, requer o uso de um material de referência certificado (CRM do inglês *Certified Reference Material*) com matriz similar à da amostra analisada. Neste caso, a calibração pode ser feita de duas maneiras: pesando a mesma massa de alguns CRMs que contenham teores diferentes do analito ou diferentes massas de um mesmo CRM contendo o analito. Entretanto, a otimização das condições STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) permite calibrar o instrumento analítico utilizando soluções aquosas, por meio do controle das interferências não-espectrais [36,37].

Apesar das dificuldades inerentes à SS, colocadas como empecilho de sua utilização, este método possui vantagens que superam as possíveis dificuldades e tornam a técnica adequada à determinação elementar em níveis de traços [36]. Dentre as quais são consideradas: i) a não utilização de métodos morosos de preparo de amostras – quando necessário, requer apenas a secagem e a moagem do material a ser analisado; ii) a simplicidade dos métodos de determinação – a análise resume-se, em geral, na pesagem e inserção da amostra no atomizador, o que não implica em menor habilidade e conhecimento analítico durante a realização do procedimento; iii) a redução do tempo de análise – visto que dispensa a etapa de preparo das amostras, o tempo gasto no procedimento é determinado pelo programa de aquecimento utilizado; iv) a redução do risco de contaminação e perdas do analito – amostras usadas *in*

natura e pesadas diretamente na plataforma de grafite pirolítico, diminuindo o contato com materiais de apoio e vidrarias; v) o aumento da sensibilidade do método – não há diluição da amostra havendo a possibilidade de trabalhar com massas diminutas; vi) a dispensa do uso de reagentes tóxicos e corrosivos – requeridos durante o pré-tratamento das amostras; vii) a minimização da geração de resíduos [34, 36,37].

Pode-se afirmar que a introdução de alíquotas da amostra sólida, de forma direta, no instrumento de medida se configura numa poderosa estratégia analítica para a determinação elementar. Além disso, apresenta benefícios ambientais e econômicos. Na Tabela 12 estão apresentadas algumas aplicações da amostragem direta de sólido com seus respectivos parâmetros e observações em matrizes diversas.

Tabela 12. Aplicações da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólidos.

Amostra	Elementos	Comentários	Referência
Farinha de trigo	Cd	Massa de amostra: 3 – 5 mg; modificador químico: 10 µg Pd + 3 µg Mg; calibração com padrão aquoso; LD: 0,4 ng g ⁻¹	35
Frutos do mar	Hg, Cd, Mn, Pb e Sn	LD (ng): 0,04; 0,0013; 0,012; 0,008 e 0,07 para Hg, Cd, Mn, Pb e Sn, respectivamente. Calibração com padrão aquoso e com material de referência certificado	38
Catalisadores a base de alumina	Cd, Cu e Pb	Massa de amostra: 0,05 – 17 mg ; massa característica 1,4, 9 e 20 pg para Cd, Cu e Pb e LD: 0,2; 22, e 1.2 ng g ⁻¹ para Cd, Cu e Pb, respectivamente	39
Material particulado atmosférico	Hg	Volume amostrado: 1440 m ³ de ar em 24 horas, massa característica 22 pg Hg; LD 40 ng g ⁻¹ equivalente a 0,12 ng m ⁻³ de Hg	40
Cinzas de carvão	Bi, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb, Sn e Zn	LD (µg g ⁻¹): 0,057; 0,21; 1,1; 1,4; 4,0; 0,13; 0,33 e 16 para Bi, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb, Sn e Zn, respectivamente.	41
Petróleo bruto	As e Cd	Modificador químico: 0,1% Pd+ 0,06% Mg+ 0,06% Triton X-100; LD: 5,1 µg kg ⁻¹ para As e 0,2 µg kg ⁻¹ para Cd	42
Urina	Mo e Ti	Determinação simultânea de Mo e Ti com LDs de 1,5 µg L ⁻¹ e 6.5 µg L ⁻¹ , respectivamente	43
Solo e sedimento	Ag	SS-HR-CS ET AAS; massa de amostra: 0,1 – 2,0 mg; tamanho de partícula ≤ 77µm; LD: 2 ng g ⁻¹	44

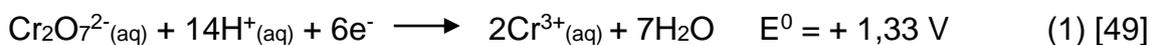
em que LD = limite de detecção.

10. Cromo

Descoberto pelo químico francês Nicolau-Louis Vauquelin em 1797 e isolado como metal em 1798, o cromo é um metal de transição do bloco 'd', família VI B da tabela de classificação periódica, cujo símbolo químico é Cr, de número atômico 24 e massa atômica 51,9961 u. Sólido em temperatura ambiente, suas temperaturas de fusão e ebulição são elevadas (2180 e 2944 K, respectivamente) e apresenta elevado grau de dureza e resistência à corrosão [45].

Espécie pouco abundante, cerca de 0,0102 % em crosta terrestre e $3,0 \times 10^{-8}$ % em água do mar [46], o cromo não é encontrado na natureza em sua forma metálica. Naturalmente é encontrado em rochas e gases vulcânicos sob a forma de cromatos, a exemplo da cromita FeCr_2O_4 [47]. Nos diversos compostos dos quais faz parte, pode estar sob estados de oxidação desde -2 a +6, sendo os mais comuns o Cr (forma elementar), Cr(III) e Cr (VI). Os dois últimos são os mais estudados devido à sua importância biológica [48].

Em seu estado fundamental o cromo não é considerado nocivo à saúde humana. Os efeitos nocivos deste metal no organismo ocorrem quando este encontra-se na forma química Cr(VI). A sua atividade biológica está associada ao seu potencial oxidativo, uma vez que é espontaneamente reduzido a Cr(III) no organismo humano. A equação 1 mostra a semi-reação de interconversão do Cr(VI) a Cr(III) em água a 25 °C.



Devido à facilidade com a qual é reduzido a Cr(III), a espécie química Cr(VI) é um gerador em potencial de radicais livres e, portanto, classificada como carcinogênica. Outras doenças podem acometer o trato respiratório, causando ulceração e perfuração do septo nasal e possíveis efeitos renais e hepáticos, gastrointestinais, hematológicos e cardiovasculares podem ser observados em

indivíduos que sofrem e/ou sofreram exposição ocupacional a elevadas concentrações desta espécie [48, 50].

Khelifiet et al [51] realizaram um estudo para avaliar o teor dos metais As, Cd, Cr e Ni em tecidos tumorais e não tumorais em pacientes com câncer de cabeça e pescoço da Tunísia empregando ET AAS. O estudo revelou que o teor desses metais foi maior nos tecidos tumorais, quando comparados aos tecidos saudáveis, por fatores de 3,4; 2,5; 1,3 e 1,5 para As, Cd, Cr e Ni, respectivamente. Ao comparar trabalhadores e não trabalhadores, constatou-se que pintores, agricultores e pedreiros apresentaram teores de Cd e Cr mais elevados que os níveis encontrados em não trabalhadores.

A avaliação ambiental, biológica e médica de 17 trabalhadores de 9 indústrias galvânicas diferentes do estado de São Paulo, sendo cinco de cromo decorativo e quatro de cromo duro, foi realizada por *Silva et al.* [52] empregando GF AAS. Neste estudo foram coletadas amostras do ar de cada ambiente e amostras de urina dos funcionários no início e no final do período de trabalho. Filtros de membrana de PVC com 5 µm de diâmetro foram utilizados para a amostragem do ar. O Cr(VI) foi extraído com tampão ácido acético/acetato de sódio e sua complexado por APDC. Realizou-se a extração do complexo com metilisobutilcetona (MIK) e obteve-se LD de 1,1 µg L⁻¹. A determinação de Cr na urina foi realizada de forma direta e foram obtidos LD's de 0,50 µg L⁻¹ para as determinações com modificador químico de matriz e 0,14 µg L⁻¹ sem o uso de modificador. As concentrações de Cr (VI) no ar nas indústrias galvânicas de cromo decorativo variaram de 0,3 a 64,6 µg m⁻³ e nas de cromo duro de 4,1 a 72,8 µg m⁻³. Foi encontrada uma correlação de 0,5 entre cromo urinário final e cromo no ar.

Sob a forma de Cr(III) este metal é tóxico ao organismo humano, desde que esteja em baixos níveis de concentração. A descoberta da atividade biológica essencial desta espécie data de 1959 [53]. A sua atuação no organismo relaciona-se diretamente ao metabolismo de carboidratos e em menor grau ao metabolismo protéico e lipídico. Contudo, o Cr(III) não atua como co-fator enzimático, semelhante à maioria dos minerais presentes no organismo. Encontra-se no organismo compondo um complexo orgânico de baixo peso molecular denominado “fator de tolerância à glicose” (GTF), formado por Cr(III),

ácido nicotínico, glicina, cisteína e ácido glutâmico. Juntamente com a insulina, o GTF facilita a entrada da glicose nas células regulando o nível glicêmico no sangue [54,53]. A deficiência de cromo no organismo pode ser observada através dos seguintes fenômenos: i) diminuição da tolerância à glicose administrada por via oral e/ou intravenosa; ii) diminuição da concentração tecidual, em especial nos pelos; iii) aumento do nível de triglicerídeos e colesterol sérico [53,54]. Baixos níveis de cromo podem ser observados em gestantes, idosos, crianças diabéticas, alteração no metabolismo de proteínas e/ou depleção de reservas por consumo metabólico excessivo e em indivíduos que consomem elevadas quantidades de carboidratos refinados [54].

Tendo em vista a determinação direta de Cd, Cr e Pb em amostras de mel do estado do Paraná, *C.K. de Andrade et al.* [55] desenvolveram um método de amostragem por suspensão empregando ET AAS. As suspensões foram preparadas em soluções aquosas contendo peróxido de hidrogênio e ácido nítrico. A calibração instrumental foi realizada com soluções aquosas para Cr e Pb e com adição de padrão para Cd, pois apresentou efeito de matriz. O uso de modificador químico foi dispensado para Cr e Pb, já na determinação do Cd foi utilizada a mistura Pd-Mg como modificador químico. Os limites de quantificação encontrados para Cd, Pb e Cr foram de 2,0; 5,4 e 9,4 ng g⁻¹, respectivamente. A precisão do método foi determinada a partir da repetibilidade e precisão intermediária com recuperações satisfatórias (94 – 101 %) para os três elementos. E, as concentrações encontradas de Cd, Cr e Pb variaram de 2,0 – 8 ng g⁻¹, 83 – 94 ng g⁻¹ e 141 – 228 ng g⁻¹, respectivamente.

R.C. Bolzan et al. [56] desenvolveram um método de amostragem direta de sólidos empregando espectrometria de absorção com atomização eletrotérmica (DSS-ET AAS) para a determinação de Cr em produtos farmacêuticos de sulfato de bário. Neste estudo avaliou-se, além das condições operacionais, o uso de ácido cítrico, fosfato de amônio, nitrato de paládio e magnésio como modificadores químicos. As temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 1500 °C e 2400 °C, respectivamente e o uso de modificadores de matriz não evidenciou melhorias com relação ao resultado. Houve uma elevada taxa de degradação da plataforma, mas sem perdas significativas na sensibilidade do método. As amostras foram pesadas (0,3 – 1

mg) e introduzidas no equipamento utilizando um sistema de amostragem de sólidos com introdução manual. Encontrou-se uma faixa linear da curva de calibração de 100 – 1800 pg ($R^2 = 0,995$), a massa característica de 7,7 pg e o limite de detecção de 2,4 pg. A concentração de Cr encontrada nas amostras comerciais variou de 0,45 – 1,06 $\mu\text{g g}^{-1}$ e a confirmação do resultado foi obtida por meio do método de adição de padrão. Os resultados obtidos usando ICP OES e ET AAS após mineralização das amostras com HNO_3 foram 20 % menores que os resultados alcançados pelo método proposto. As vantagens da DSS-ET AAS se sobressaíram aos métodos propostos em farmacopéias.

A. Virgilio et al. [57] desenvolveram um método de amostragem direta de sólidos empregando HR-CS ET AAS para determinação de Cr em plantas medicinais. O estudo realizado revelou que o uso de modificadores químicos era dispensável e as temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 1500 °C e 2400 °C, respectivamente. A faixa linear encontrada para a curva analítica de calibração foi de 50 – 750 pg Cr ($R^2 > 0,999$) e as curvas usando padrão aquoso e padrão sólido coincidiram em 96 % sendo viável a calibração aquosa para a amostragem direta de sólidos em plantas medicinais e a exatidão do método verificada pela análise de quatro materiais de referência certificados. Os valores encontrados equiparam-se com os valores certificados com confiabilidade de 95 %. Foram analisadas dez amostras de plantas medicinais e a faixa de Cr encontrada variou de 1,3 a 17,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ e o limite de detecção encontrado foi de 3,3 ng g^{-1} .

Visando o aumento da massa muscular e a redução da gordura corpórea, a suplementação de cromo tem sido comum entre os esportistas. Entretanto, alguns alimentos destacam-se como fontes naturais deste mineral: as oleaginosas, os cereais integrais, a levedura de cerveja, as carnes e os frutos do mar. Considerando-se tolerável a ingestão de até 200 $\mu\text{g dia}^{-1}$ uma vez que não há um valor de ingestão diária recomendada (IDR) [54]. Por isso a importância de determinar o cromo em alimentos e produtos de ingestão diária torna-se evidente.

11. Objetivos

11.1. Objetivo geral

Desenvolver um método rápido, confiável e simples baseado na amostragem direta de sólido para determinação de cromo em fórmulas infantis a base de cereais empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS ET AAS).

11.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de amostragem direta de sólidos para fórmulas infantis a base de cereais;
- Desenvolver um método de determinação de cromo empregando HR-CS ET AAS;
- Avaliar qual o modificador químico adequado para a determinação do analito na amostra;
- Comparar o comportamento das curvas de pirólise e atomização com e sem modificador químico;
- Avaliar o uso de padrão aquoso para calibração do método e comparar com o uso do CRM.

12. Parte experimental

12.1. Equipamentos/ acessórios

Durante o desenvolvimento do trabalho foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS) Modelo ContrAA700, marca AnalytikJena (Jena, Alemanha). O espectrômetro possui uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão que opera em modo *hot spot* sob uma potência de 300 W e emite de forma contínua a radiação numa faixa entre 190 e 850 nm. O atomizador apresenta aquecimento transversal. A linha principal de absorção do cromo foi utilizada (357, 8687nm) e sistema de correção de fundo IBC. Uma plataforma, tipo canoa, de grafite pirolítico foi utilizada para conter a amostra. Um amostrador automático para introdução de sólidos Modelo SSA 600 (AnalytikJena) foi utilizado para a introdução direta das amostras.

12.2. Reagentes, soluções e amostras

Sistema de desionização de água por osmose reversa Gehaka modelo OS20 LX e sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) com resistividade específica de 18 M Ω cm⁻¹.

Todas as soluções de amostras foram preparadas com reagentes de grau analítico. Ácido nítrico concentrado, 70 % (m/m) (JTBecker); Peróxido de hidrogênio 30 % (v/v) (Merck); Etanol 96% (v/v) (Merck); Triton-X 100 (JTBecker); Solução estoque de Mg e Cr em HNO₃ (5 %) 1000 mg L⁻¹ (Qhemis); Solução estoque de Pd em HNO₃ (5 %) 10000 mg L⁻¹ (Qhemis).

Todas as vidrarias passaram por lavagem com água corrente e detergente neutro, re-enxague com água desionizada. Permaneceram submersas em banho de HNO₃ 10 % por 24 horas para descontaminação e após este período enxaguadas com água ultrapura.

A solução de padrão rastreado de magnésio 1000 mg L^{-1} que equivale a uma solução 0,1 % de Mg foi empregada diretamente como modificador químico. Um segundo modificador químico utilizado, o paládio/magnésio foi preparado segundo a proporção solução padrão de paládio 0,1 %: solução padrão de magnésio 0,05 %. Ambas as soluções foram preparadas em meio ácido, HNO_3 0,5 %.

A solução de cromo ($20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizada, foi preparada a partir da diluição de uma solução de padrão rastreado com concentração de 1000 mg L^{-1} .

A amostra de fórmula infantil a base de farinha de arroz e amido de milho sobre a qual desenvolveu-se o método foi adquirida em um supermercado da cidade de Salvador-BA. CRM de folha de tomate NIST1573a foi empregado para comparação das curvas analíticas e para validação do procedimento proposto.

12.3. Procedimento para determinação direta de cromo em amostras de fórmula infantil a base de cereal

No presente trabalho, visando reduzir o tempo de análise e preparo da amostra, foi empregado um sistema de introdução direta de amostra. Dispensando-se a etapa de preparo de amostra, quase sempre mineralização empregando ácidos inorgânicos à quente [58].

Desta forma, pesou-se na plataforma de grafite pirolítico aproximadamente 2,0 mg da amostra de fórmula infantil. Após a pesagem foram adicionados 10 μL de solução de surfactante e 5 μL de solução de modificador químico usando pipetadores automáticos com as respectivas capacidades volumétricas. Em seguida, o amostrador automático transferiu a plataforma de grafite para dentro do atomizador eletrotérmico.

O programa de aquecimento, do forno de grafite, utilizado para o desenvolvimento do método apresenta seis etapas sendo duas de secagem, uma de pirólise, uma de atomização, uma de limpeza e por fim a de resfriamento do atomizador, Tabela 13.

Tabela 13. Programa de aquecimento do forno de grafite empregado na determinação de Cr em farinha de arroz e amido de milho.

Etapa	Temp. (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo	Vazão Ar* (L s ⁻¹)
Secagem	120	3	25	2,0
Secagem	150	5	15	2,0
Pirólise	1600	20	20	2,0
Atomização	2400	2500	8	0
Limpeza	2550	500	4	2,0

*Ar = Argônio.

12.3.1. Teste de modificador químico

Para o teste com os modificadores químicos foi selecionado o programa de aquecimento do forno de grafite recomendado pelo fabricante do equipamento. Para tal, foram pesados aproximadamente 2,00 mg da amostra, na qual se adicionou 10 µL da solução de surfactante e agentes oxidantes.

Em seguida procedeu-se o teste com os modificadores químicos: solução de nitrato de magnésio (Mg(NO₃)₂) e a solução combinada de paládio e nitrato de magnésio (Pd/Mg(NO₃)₂). Primeiro empregou-se como modificador químico uma solução de Mg 0,1 % e em seguida uma solução de Pd 0,1 %/Mg 0,05 %. Uma mistura de 10 µL da solução de surfactante e agentes oxidantes e 5 µL da solução de modificador químico foi tomada como branco analítico para esta etapa.

12.3.2. Curvas de pirólise e atomização

A determinação das curvas de pirólise e atomização foi realizada de forma univariada, empregando o procedimento descrito no item 12.3. Para a determinação da temperatura de pirólise fixou-se a temperatura de atomização em 2300 °C. E, para a determinação da temperatura de atomização a temperatura de pirólise foi fixada em 1300 °C.

13. Resultados e discussão

13.1. Teste com modificador químico

No desenvolvimento do método optou-se por utilizar uma amostra composta por farinha de arroz com amido de milho pois, apresenta-se sob a forma de um pó fino, dispensando etapas de pré-tratamento, no caso maceração. Ao adicionar o modificador químico à amostra observou-se a formação de uma tensão superficial ao redor da gota impedindo o espalhamento uniforme da mesma sobre a amostra. Verificou-se também a formação de resíduos de carbono sobre a plataforma ao final de cada medida, o qual foi devido a incompleta destruição da matriz orgânica. Assim, antes de realizar o teste com os modificadores foram testadas soluções de surfactantes contendo agentes oxidantes, no sentido de promover um melhor contato entre amostra e modificador, além de eliminar a matriz orgânica de forma mais eficiente. Primeiro testou-se uma solução de triton-X 0,05 % (m/v) com peróxido de hidrogênio 1 % (v/v) e ácido nítrico 0,5 % (v/v). Para esta solução evidenciou-se o aumento da quantidade de resíduos remanescentes na plataforma.

Logo depois testou-se uma solução contendo etanol e peróxido de hidrogênio em ácido nítrico 1 %. Para esta segunda solução foi observado não somente o efeito surfactante eficiente como também uma melhor atuação decompositora da matriz orgânica. Usando este procedimento, a formação de fuligem na plataforma após a análise foi observada apenas para massas de amostra maiores que 2 mg. Portanto, durante o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas massas de até 2,0 mg de amostra. O volume da solução contendo etanol e agentes oxidantes foi avaliado e após os testes realizados observou-se que um volume de 10 µL desta solução foi suficiente para auxiliar na redução da quantidade de fuligem gerada na plataforma após cada ciclo.

Um terceiro modificador químico também foi testado, o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Porém ao ser empregado foi gerada uma grande quantidade de resíduos na plataforma de grafite. Neste caso, não foi obtido um sinal analítico satisfatório.

Os valores de absorvância normalizada foram utilizados para comparar os resultados obtidos, de modo a avaliar a intensidade do sinal analítico do cromo por um miligrama de amostra. Os resultados do teste de modificadores químicos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos no teste de modificadores químicos para determinação de Cr em fórmulas infantis.

Modificador	Absorvância normalizada	RSD%
Sem modificador	0,07066 ± 0,04260	24,3
Mg	0,06660 ± 0,01928	11,7
Pd + Mg	0,07060 ± 0,01838	10,5

De acordo com os resultados obtidos para as determinações com e sem modificadores químicos os valores encontrados não apresentaram diferenças estatísticas significativas, com confiabilidade de 95 % (teste-t). No entanto, a solução de Pd/Mg, enquanto modificador químico, provocou demasiado desgaste da plataforma de grafite pirolítico. Assim, o Mg 0,1 % foi escolhido como modificador químico para o método pois não provocou desgaste da plataforma e conferiu melhor estabilidade térmica para o analito permitindo assim o uso de elevadas temperaturas de pirólise.

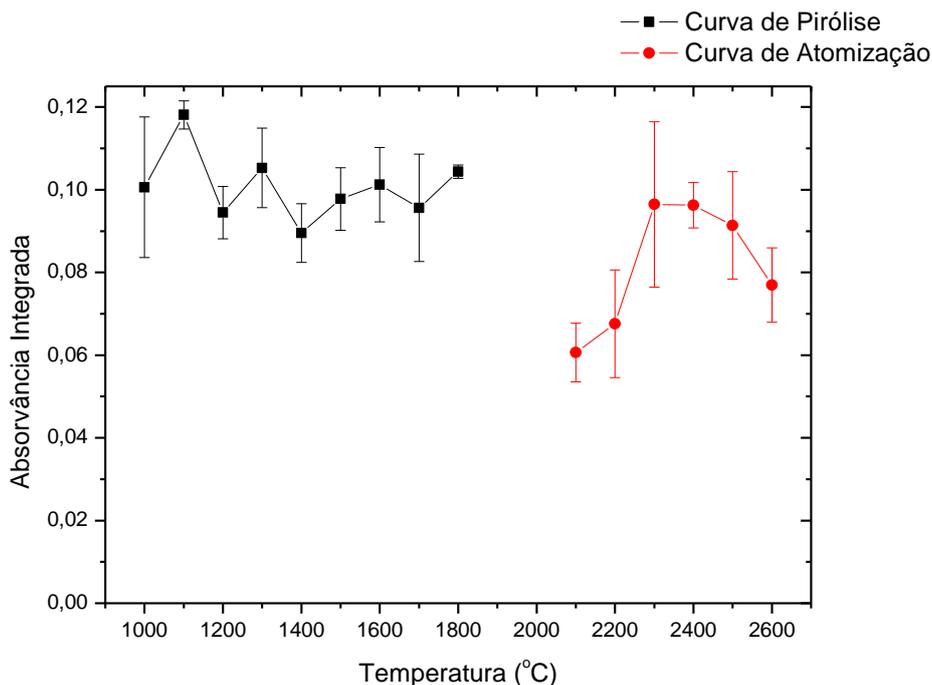
13.2. Curvas de pirólise e atomização

Visando otimizar as condições instrumentais de modo a se obter uma boa relação sinal/ruído, foram traçadas as curvas de pirólise e de atomização. Nesta etapa, escolheu-se a condição que resultou na máxima degradação da matriz, uma vez que a amostra foi analisada de forma direta, e na qual foi gerado o sinal mais intenso de absorvância integrada.

Uma vez selecionado o modificador químico, foi efetuado um estudo acerca das temperaturas de pirólise e atomização a serem aplicadas na determinação do analito nas amostras. Para a determinação da temperatura de pirólise observou-se uma faixa de temperatura de 1000 a 1800 °C. A temperatura de atomização foi fixada em 2300 °C e a temperatura de pirólise estudada em

intervalos de 100 °C. Para a avaliação da temperatura de atomização, fixou-se a temperatura de pirólise em 1300 °C, visando um menor desgaste do material. A faixa de temperatura de atomização examinada foi de 2100 a 2600 °C, a variação também foi feita a cada 100 °C. As curvas obtidas na determinação das referidas temperaturas estão identificadas na Figura 7.

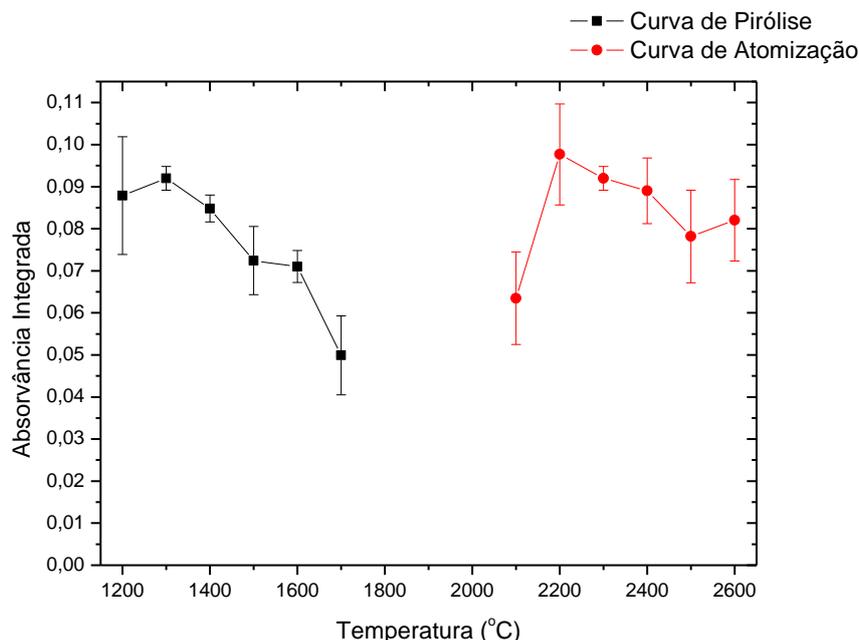
Figura 7. Curva de pirólise (■) e curva de atomização (●) para determinação de Cr em fórmulas infantis empregando Mg como modificador químico.



Diante dos resultados obtidos, a temperatura de pirólise empregada das determinações posteriores foi de 1600 °C e para a atomização 2400 °C. Em ambos os casos, optou-se por escolher o valor que apresentasse maior robustez, no que tange ao sinal analítico, frente a pequenas variações de temperatura.

Visando assegurar a necessidade do uso de uma solução de modificador químico foram realizados os mesmos procedimentos de determinação das temperaturas de pirólise e atomização na amostra sem uso desta solução. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 8.

Figura 8. Curva de pirólise (■) e curva de atomização (●) para determinação de Cr em fórmulas infantis sem uso de modificador químico.



Segundo os resultados alcançados, para a pirólise pode-se observar valores constantemente decrescentes de absorvância integrada sendo o melhor sinal analítico obtido para uma temperatura de 1300 °C. Na atomização o melhor sinal é obtido a uma temperatura abaixo da temperatura de atomização do cromo, 2200 °C, e em seguida há um decaimento do sinal. Em ambos os casos o decréscimo do sinal é atribuído à perda do analito. Desta forma, os resultados corroboram com a necessidade da utilização de um modificador químico na determinação do cromo em amostras de farinha de cereais.

13.3. Curvas de calibração

De posse das temperaturas de pirólise e atomização cujos sinais analíticos apresentaram melhor perfil para a determinação de Cr foram obtidas as curvas de calibração analítica: uma empregando solução aquosa e uma em matriz sólida utilizando o CRM de folha de tomate NIST 1573a. A aplicabilidade do padrão aquoso na calibração do método foi avaliada comparando-se as inclinações das curvas.

Na determinação da curva de calibração do cromo em meio aquoso foi utilizada uma solução padrão contendo $20 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo o branco analítico $5 \mu\text{L}$ da solução de modificador químico. A massa de cromo variou numa faixa de $80 - 400 \text{ pg}$ de cromo e a faixa linear de $80 - 320 \text{ pg}$ do elemento.

Devido à dificuldade em encontrar uma solução padrão sólida de cromo, obteve-se uma curva de calibração de sólido utilizando um material de referência certificado contendo o elemento. Neste trabalho foi utilizado o CRM de folha de tomate NIST 1573a. Na determinação da curva de calibração a massa do CRM variou aleatoriamente de $0,03$ a $0,167 \text{ mg}$. Visto que, o CRM utilizado apresenta uma concentração de Cr de $1,99 \text{ ng mg}^{-1}$, a massa de analito utilizada variou de $59,7 - 332,3 \text{ pg}$ de cromo, equivalente à faixa linear de trabalho. O procedimento utilizado nesta etapa foi o mesmo empregado anteriormente no estudo dos modificadores. O branco analítico utilizado constituiu-se de $5 \mu\text{L}$ de modificador químico e $10 \mu\text{L}$ da solução de surfactante e oxidantes. As curvas de calibração estão apresentadas na Figura 9 e as equações das curvas com os respectivos coeficientes de regressão na Tabela 15.

Figura 9. Curvas de calibração para determinação de Cr em fórmulas infantis a base de cereais.

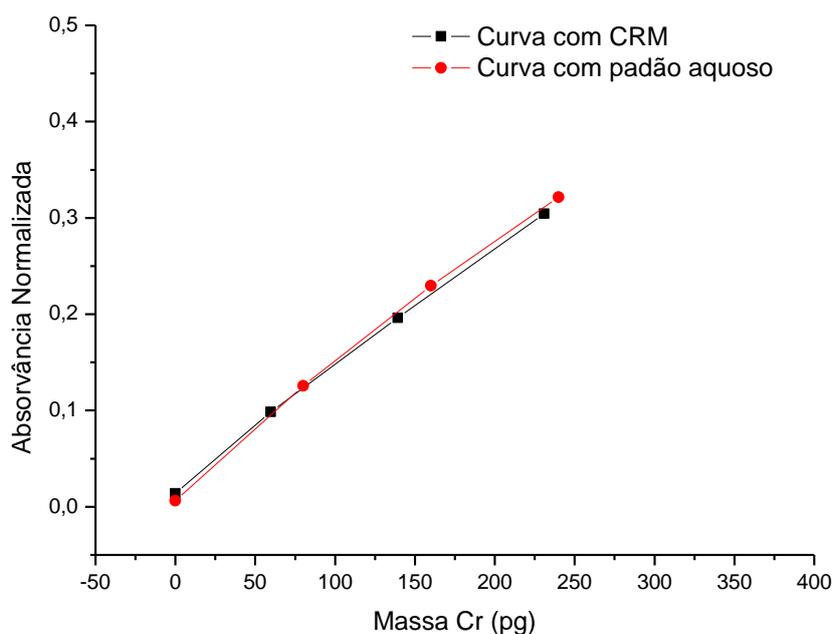


Tabela 15. Equações das curvas de calibração obtidas com padrão aquoso e com CRM.

Coeficiente	Curva aquosa	Curva com CRM
α	0,0013 \pm 0,0001	0,0012 \pm 0,0001
b	0,0116 \pm 0,0226	0,0212 \pm 0,0143
R²	0,9976	0,9977

Em que: α equivale ao coeficiente angular, b ao coeficiente linear e R² ao coeficiente de correlação das curvas de calibração obtidas para o padrão aquoso e para o CRM utilizado.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que as curvas de calibração não diferem estatisticamente, com confiabilidade de 95 % (teste-t). Assim, verifica-se a possibilidade de realizar a calibração do método com padrões aquosos para a determinação direta de cromo em amostras de fórmulas infantis a base de cereais. De acordo com o observado, pode-se inferir que as determinações realizadas segundo o método desenvolvido não apresentou interferência da matriz.

13.4. Figuras de mérito

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi realizada a quantificação do branco analítico que se deu pela leitura de 15 μ L da solução oxidante (C₂H₆O 20 %, H₂O₂ 6% e HNO₃ 1%) e 5 μ L de Mg 0,1 % (modificador químico utilizado no método). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de LD e LQ obtidos para o método proposto considerando as curvas de calibração aquosa e com CRM.

	Curva aquosa	Curva CRM
Limite de detecção (ng g⁻¹)	3,45	3,74
Limite de quantificação (ng g⁻¹)	11,50	12,46

O limite de detecção foi calculado segundo a equação $LD = (3. s) / \alpha$ e o limite de quantificação calculado segundo a equação $LQ = (10. s) / \alpha$ [59]. Em ambas as equações s equivale ao desvio padrão de dez medidas de brancos analíticos e α à inclinação da curva analítica de calibração.

A precisão do método foi determinada em termos do desvio padrão relativo (RSD %) resultante da leitura de diferentes massas da amostra ($n = 7$), considerando-se os valores de absorvância normalizada obtidos. O teste de precisão mostrou que o método desenvolvido possui uma boa repetibilidade frente a matriz trabalhada. O valor do RSD % encontrado é considerado aceitável tendo em vista as particularidades da amostragem direta de sólidos, que considera satisfatórios valores de até 20 % [37]. A massa característica encontrada para o método corrobora a viabilidade do uso deste na determinação de Cr em fórmulas infantis a base de cereais uma vez que o valor encontrado é equivalente ao valor descrito para o elemento pelo fabricante do equipamento. Os resultados de precisão e a massa característica estão na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de RSD % e massa característica para o método proposto.

RSD %	10,76
Massa característica (pg)	1,2

A exatidão do método foi avaliada aplicando-o na determinação de Cr no CRM de folha de tomate NIST 1573a ($n = 6$). O valor de concentração encontrado não difere estatisticamente do valor informado na carta certificada deste material de referência, com confiabilidade de 95 % (teste-t). Os valores encontrado e certificado encontram-se Tabela 18.

Tabela 18. Concentração de Cr no CRM de folha de tomate expressa em ng g^{-1} , valor encontrado e valor certificado.

	Concentração (ng g^{-1})
Valor encontrado	$1,90 \pm 0,08$
Valor certificado	$1,99 \pm 0,06$

14. Aplicação nas amostras

O método proposto foi aplicado em cinco amostras de fórmulas infantis constituídas por diferentes tipos de cereais. As concentrações de cromo encontrados nas amostras variou 33,9 – 58,1 ng g⁻¹, com valores de RSD % entre 4,0 e 17,9 %, como mostrado na Tabela 19.

Tabela 19. Concentração média de Cr (\pm IC) em amostras de fórmulas infantis à base de cereais com confiabilidade de 95 % (teste-t).

Amostra	Concentração ng g ⁻¹	RSD (%)
Mlho	33,9 \pm 13,0	15,4
Av	47,4 \pm 19,5	16,6
AvArz	58,1 \pm 20,1	14,0
Arrzn	55,1 \pm 5,4	4,0
Arz	52,9 \pm 22,9	17,4

IC = intervalo de confiança.

Classificação das amostras: Arz = arroz, Mlho = milho, Av = aveia

AvArz = aveia e arroz, MC = multicereais e Arrzn = arroz e amido de milho;

Os valores de RSD % obtidos foram satisfatórios, considerando-se a análise direta sólido, uma vez que para este método de amostragem valores de RSD de até 20 % são aceitáveis. As concentrações de cromo encontradas nas amostras de fórmulas infantis foram menores do que o limite máximo autorizado de Cr em alimentos estipulado pela legislação brasileira, que é de 0,10 ppm.

15. Conclusão parcial

Os resultados mostraram que o método desenvolvido para determinação de Cr em farinha de cereais apresentou bons limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão satisfatórias. Combinado à amostragem direta de sólidos, o uso da HR-CS ET AAS permitiu o desenvolvimento de um método simples e com baixo custo para a quantificação do metal. Por sua vez, a minimização dos resíduos gerados classifica o método como sendo um “método limpo”. Também, verificou-se a possibilidade de realizar a calibração instrumental aplicando um padrão de calibração aquoso.

A avaliação da presença de cromo nesta classe de alimentos denota extrema importância considerando-se o seu potencial metabólico e o elevado consumo destes alimentos, principalmente, por crianças e idosos. O teor de cromo encontrado nas amostras, 33,9 – 58,1 ng g⁻¹, denota que estas não representam riscos à saúde do público alvo. Uma vez que a legislação vigente estabelece o limite máximo de ingestão deste mineral apenas para gelatinas e derivados, e de 0,10 mg g⁻¹ para alimentos em geral, a determinação do teor de Cr em cereais pode vir a contribuir para a complementação desta legislação [60].

16. Conclusão geral

O estudo da composição mineral das amostras permitiu concluir que as fórmulas infantis avaliadas apresentam teores de nutrientes minerais de acordo com o RDI estabelecido por agências de regulação da saúde, ANVISA e OMS. Com o auxílio da PCA e da HCA foi viável concluir que a composição mineral das amostras independe do cereal a partir do qual é preparada. Sendo assim, não foi estabelecido um modelo de classificação das amostras segundo a sua composição.

O estudo da biodisponibilidade revelou que, apesar da presença de ferro nas amostras, esta classe de alimentos não deve ser considerada uma fonte rica deste mineral, uma vez que, dentre os elementos avaliados, este apresentou menor percentual de extração quando comparado aos demais. Todavia, as fórmulas infantis à base de cereais podem ser empregadas como fonte complementar de alguns dos nutrientes minerais necessários à manutenção da saúde de indivíduos após o período de amamentação recomendado pelas agências reguladoras da saúde, um mínimo de seis meses contados a partir do nascimento do indivíduo.

O método de amostragem direta de sólidos desenvolvido para a determinação de cromo nas amostras avaliadas apresentou precisão e exatidão satisfatórias. Por conseguinte, os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação são considerados apropriados. O uso da HR-CS ET AAS aliado à amostragem direta de sólidos permitiu o desenvolvimento de um método simples, de baixo custo e com diminuta geração de resíduos. A possibilidade do uso de padrão aquoso para calibração do método analítico aumenta a viabilidade da sua aplicação considerando a dificuldade de se obter padrões sólidos para realização da calibração.

17. Referências bibliográficas

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Consulta Pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004. D.O.U de 17/12/2004. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> > - Acessado em: 31.10.2013 às 17:50;
2. Pinto, N.A.V.D.; Vilas Boas, B.M.; Carvalho, V.D. *Caracterização mineral das folhas de taioba (Xanthosomasagittifolium Schott)*. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 23 (1999) 57 – 61;
3. Fraga, C.G. *Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health*. Molecular Aspects of Medicine, 26 (2005) 235–244;
4. Oliveira, M. A. A.; Osório, M. M. Consumo de leite de vaca e anemia ferropriva na infância. *Jornal de Pediatria*, 81 (2005) 361 – 367;
5. Dong-Sun, K.; Tae-Wha, K.; Ju-Seop, K. *Chromium picolinate supplementation improves insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats*. J. Trace Elem. Med. Biol., 17 (2004) 243 – 247;
6. Marques, R. F. S. V.; Lopez, F. A.; Braga, J. A. P. *O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida*. *Jornal de Pediatria*, 80 (2004) 99 – 105;
7. Ljung, K.; Palm, B.; Grandner, M.; Vahter, M. *High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods – A matter of concern*. *Food Chemistry*, 127 (2011) 943 – 951;
8. Bosscher, D.; Van Caillie-Bertrand, M.; Deelstra, H. *Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas*. *Nutrition*, 17 (2001) 614 – 618;
9. Saracoglu, S.; Saygi, K. O.; Uluozlu, O. D.; Tuzen, M.; Soylak, M. *Determination of trace element contents of baby foods from Turkey*. *Food Chemistry*, 105 (2007) 280 – 285;
10. Ikem, A.; Nwankwoala, A.; Oduyungbo, S.; Nyavor, K.; Egiebor, N. *Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP–OES*. *Food Chemistry* 77 (2002) 439–447;
11. World Health Organization. *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Second Edition, 2004;
12. Moura, J. G. P. *Nutrientes e terapêutica*. 2ª edição, Ed. Abril, 2009;
13. *Metabolismo do grupo heme*. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/res-trito/pdf/heme_luciele.pdf> - Acessado em: 05.11.2013 às 23:30;
14. Machado, A. A.; Izumi, C.; de Freitas, O. *Molecular basis of iron absorption*. *Revis. Alim. Nutr.*, 16 (2005) 293 – 298;
15. Viaro, R. S.; Viaro, M. S.; Fleck, J. *The biochemical importance of selenium to the human organism*. *Disciplinarum Scientia, Série: Ciên. Biol. e da Saúde*, Santa Maria, 2 (2001) 17 – 21;

-
16. Ferreira, K. S.; Gomes, J. C. Bellato, C. R.; Jordão, C. P. *Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil*. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health, 11(2002) 172 – 177;
17. Ovca, A.; van Elteren, J. T.; Falnoga, I.; Selih, V. S. *Speciation of zinc in pumpkin seeds (Cucurbitapepo) and degradation of its species in the human digestive tract*. Food Chemistry 128 (2011) 839 – 846;
18. Hess, S. Y.; Bado, L.; Aaron, G. J. ; Ouedraogo, J. B.; Zeilani, M.; Brown, K. H. *Acceptability of zinc-fortified, lipid-based nutrient supplements (LNS) prepared for young children in Burkina Faso*. Maternal and Child Nutrition 7 (2011) 357 – 367;
19. Salgueiro, M. J.; Zubillaga, M.; Lysionek, A.; Sarabia, M. I.; Care, R.; De Paoli, T.; Hager, A.; Weill, R.; Boccio, J. *Zinc as an essential micro nutrient: a review*. Nutrition Research, 20 (2000) 737 – 755;
20. Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G. *Quimiometria*. Química Nova,8 (1985) 84 – 99;
21. Marangoni, A. C.; Mello, C.; Ribeiro, D.; Ricci, E. C.; Coelho, L. M. F. R. *Aplicação do método de análise dos componentes principais com espectrometria raman em sistemas de etanol-metanol*. Disponível em: <<http://legacy.unifacel.com.br/novo/publicacoes/IIforum/Textos%20EP/Antonio%20Carlos,%20Cesar,%20Diorginis,%20Emiliane%20e%20Lucinda.pdf>>, acessado em: 12. 12. 2013 às 15:00;
22. Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P, L. O. *Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial*. Química Nova, 22 (1999) 724-731;
23. Lima, D. C. *Aplicação de técnicas de análise multivariada na caracterização de parâmetros avaliados durante o desenvolvimento de material de referência – certificação de amostra de farinha de trigo para análise inorgânica*. Dissertação de mestrado, UFBA, 2009;
24. Vasconcelos, S. *Análise de Componentes Principais (PCA)*. Disponível em: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/PCA-ACP.pdf>> - Acessado em 30.10.2011 às 16:30;
25. Sena M. M.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T. S.; Valarini, P. J. *Avaliação douso de métodos quimiométricos em análise de solos*. Química Nova, 23 (2000) 547 – 556;
26. Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C. *Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos*. Quim. Nova, 30 (2007) 481 – 487;
27. Johnson, G. W.; Ehrlich, R. *State of the art report on multivariate chemometric methods in environmental forensics*. Environmental Forensics, 3 (2002) 59 – 79;
28. Pereira, R. M. *Determinação de constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais 2010;
29. Krug, F; Nóbrega, J. A.; de Oliveira, P. V. *Espectrometria de absorção atômica. Parte 1. Fundamentos e absorção com chama*. 2004;

-
30. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002;
31. Welz B, Becker-Ross H, Florek S, Heitmann U. *High Resolution Continuum Source AAS – The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005;
32. Borges, D. L. G.; Curtius, A. J.; Welz, B; Heitmann, U. *Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua*. Revista Analytica, 18 (2005) 58 – 67;
33. Ribeiro, A. S.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S. *Espectrometria De Absorção Atômica Com Atomização Eletrotérmica Em Filamento De Tungstênio. Uma RE-VISÃO crítica*. Quim. Nova, 25 (2002) 396-405;
34. Nomura, C. S.; da Silva, C. S.; Oliveira, P V. *Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: Uma Revisão*. Quim. Nova, 31 (2008) 104-113;
35. Araujo, R. G. O.; Oleszczuk, N.; Rampazzo, R. T.; Costa, P. A.; Silva, M. M.; Maria Goreti R. Vale, M. G. R.; Welz, B; Ferreira, S. L. C. *Comparison of direct solid sampling and slurry sampling for the determination of cadmium in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry*. Talanta 77 (2008) 400–406;
36. Borges, D. L. G. *Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e investigação de compostos organometálicos por análise direta em tempo real com espectrometria de massa*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina 2009;
37. Welz, B; Vale, M. G. R.; Borges, D. L. G.; Heitmann. U. *Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*. Anal Bioanal Chem 389 (2007) 2085–2095;
38. Detcheva, A.; Grobecker, K.H. *Determination of Hg, Cd, Mn, Pb and Sn in seafood by solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 454 – 459;
39. Rodrigues, L. F.; de Mattos, J. C. P.; Dressler, V. L.; Pozebon, D.; Flores, E. M. *Determination of cadmium, copper and lead in alumina based catalysts by direct solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B 62 (2007) 933–938
40. Araujo, R. G. O.; Vignola, F.; Castilho, I. N. B.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Vale, M. G. R.; Smichowski, P.; Ferreira, S. L. C; Becker-Ross, H. *Determination of mercury in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*. Spectrochimica Acta Part B 66 (2011) 378–382;
41. Török, P.; Žemberyová, M. *Direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of toxic and potentially toxic elements in certified reference materials of brown coal fly ash*. Spectrochimica Acta Part B 71-72 (2012) 80–85;
42. De Jesus, A.; Zmozinski, A. V.; Damin, I. C. F.; Silva, M. M.; Vale, M. G. R. *Determination of arsenic and cadmium in crude oil by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B 71-72 (2012) 86–91;

-
43. Rello, L.; Lapeña, A. C.; Aramendía, M.; Belarra, M. A.; Resano, M. *A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B* 81 (2013) 11–19;
44. Dittert, I. M.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Curtius, A. J.; Helmut Becker-Ross, H. *Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*. *Microchim Acta* 167 (2009) 21–26;
45. Laboratório virtual de Química – UNESP Disponível em: http://www2.fc.unesp.br/lvq/LVQ_tabela/024_cromo.html, acessado em 07.01.2014 às 17:30;
46. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th Edition 14th section. p. 14-14;
47. Da Silva, E; França, L. P.; Nascimento, M. M. G. S.; Zopelaro, R. M.; Neto, O. C.; Soares, R. A. R.; Genestra, M. *Proposta à prevenção de riscos ambientais relacionados ao tratamento de superfícies com cromatos*. Pós-Graduação. Cadernos UniFOA, ed. Especial (2008);
48. Da Silva, C. S.; Pedrozo, M. F. M. *Ecotoxicologia do cromo e seus compostos*. Série Cadernos de Referência Ambiental, 5 (2001);
49. Brown, T. L.; Junior, H. E. L.; Bursten, B. E.; Burdge, J. R. *Química, a ciência central*. 9ª Edição, São Paulo, Pearson Prentice Hall 2005;
50. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for chromium*. U.S. Department of health and human services, 2012;
51. Khelifi, R.; Olmedo, P.; Gil, F.; Hammami, B.; Chakroun, A.; Rebai, A.; Hamza-Chaffai, A. *Arsenic, cadmium, chromium and nickel in cancerous and healthy tissues from patients with head and neck cancer*. *Science of the Total Environment* 452–453 (2013) 58–67;
52. Silva, C. S. *Determinação de cromo hexavalente no ambiente de trabalho de galvanoplastias e em fluído biológico de trabalhadores*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo 1991;
53. Organización Mundial de la Salud. *Los oligoelementos em la nutrición humana*. Serie de informes técnicos, Ginebra 1973;
54. Gomes, M. R.; Rogero, M. M.; Tirapegui, J. *Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico*. *Rev Bras Med Esporte* 11 (2005) 262 – 266;
55. De Andrade, C. K.; dos Anjos, V. E.; Felsner, M. L.; Torres, Y. R.; Quináia, S. P. *Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*. *Food Chemistry* 146 (2014) 166–173;
56. Bolzan, R. C.; Rodrigues, L. F.; b, de Mattos, J. C. P.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M. *Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction*. *Talanta* 74 (2007) 119 – 124;

57. Virgilio, A.; Nóbrega, J. A.; Rêgo, J. F.; Neto, J. A. G. *Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants*. *Spectrochimica Acta Part B* 78 (2012) 58–61;

58. Da Silva, D. G.; Junior, M. M. S.; Silva, L. O. B.; Portugal, L. A.; Matos, G. D.; Ferreira, S. L. C. *Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier*. *Analytical Methods*, 3(2011) 1 – 7;

59. Brandão, G. C.; de Jesus, R. M.; da Silva, E. G. P.; Ferreira, S. L. C. *Use of slurry sampling for the direct determination of zinc in yogurt by high resolution-continuum source flame atomic absorption spectrometry*. *Talanta*, 81 (2010) 1357-1359;

60. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Consulta Pública nº 55 de 18 de novembro de 2011. D.O.U de 19/11/2011*. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> - Acessado em: 07.01.2014 às 18:30.