

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO

CAMILA KULEK DE ANDRADE

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS E BIOACESSÍVEIS DE ÍONS  
METÁLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES EMPREGANDO  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

GUARAPUAVA

2018

CAMILA KULEK DE ANDRADE

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS E BIOACESSÍVEIS DE ÍONS  
METÁLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES EMPREGANDO  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutorado. Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Pércio Quináia (UNICENTRO)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Egéa dos Anjos (UEPG)

GUARAPUAVA

2018

Catálogo na Fonte  
Biblioteca da UNICENTRO

ANDRADE, Camila Kulek de.

A553d Determinação das concentrações totais e bioacessíveis de íons metálicos em matrizes alimentares empregando espectrometria de absorção atômica / Camila Kulek de Andrade – Guarapuava, PR : [s.n], 2018.  
174f.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sueli Pércio Quináia

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Egéa dos Anjos

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração em: Química Analítica. Universidade Estadual de Londrina. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Química analítica – tese. 2. Iogurte – chá mate. 3. Amostragem em suspensão. 4. Bioacessibilidade I. Quináia, Sueli Pércio. II. Anjos, Vanessa Egéa dos. III. UEL. IV. UEPG. V. UNICENTRO. VI. Título

CDD 543

**CAMILA KULEK DE ANDRADE**

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS E BIOACESSÍVEIS DE  
ÍONS METÁLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES EMPREGANDO  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutora.

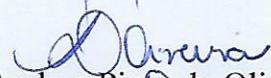
Aprovado em 19 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Gilberto Abate (UFPR)



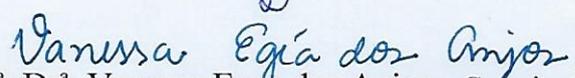
Prof.ª Dr.ª Yohandra Reyes Torres – Unicentro



Prof.ª Dr.ª Andrea Pinto de Oliveira (UFPR)



Prof.ª Dr.ª Maria Lurdes Felsner - Unicentro



Prof.ª Dr.ª Vanessa Egea dos Anjos - Co-orientadora



Prof.ª Dr.ª Sueli Pércio Quináia - Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2018

Dedico esta Tese à minha família, meus pais Juarez e Maria, e minha irmã Jucimara, e também aos meus amigos, que sempre estiveram me apoiando.

## AGRADECIMENTO

À Deus, pela dádiva da vida;

À minha família, meus pais Juarez e Maria, minha irmã Jucimara, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos, e por me ajudarem a enfrentar todos os obstáculos e não desistir;

À minha irmã Jucimara um agradecimento especial, pois além do apoio familiar, me ajudou incontáveis vezes durante os procedimentos experimentais, compartilhando as dificuldades e as alegrias no laboratório e na vida;

Às minhas orientadoras, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Pércio Quináia e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Egéa dos Anjos, pela amizade, conselhos, ensinamentos e especialmente pela dedicação em todos os momentos do trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lurdes Felsner e ao Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves pelas grandes contribuições feitas durante o exame de qualificação deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Pinto de Oliveira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yohandra Reyes Torres, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lurdes Felsner e ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelas importantes contribuições e sugestões feitas durante a defesa da tese;

Aos meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado, principalmente durante esses últimos anos, me apoiando e dando força nos momentos mais difíceis, especialmente: Daniele Seremeta, Elenice Caetano, Fernando Ratuchne, Francielli Monteiro, Irineo Kelte Filho, Mariane Butik, Osmar Junior e Renata Martins;

Às amigadas que conquistei durante este período e com quem aprendi muito. Aproveito aqui para deixar um agradecimento especial aos amigos do MUR Guarapuava, e as pessoas queridas do GOU Seu amor é D+. A acolhida, a companhia e o abraço de vocês fizeram muita diferença e tornaram este último ano mais leve;

Aos amigos (alunos e professores) do LABGATI pelo apoio e pela amizade em todos esses anos. Um agradecimento especial as alunas Jessika Almeida e Patrícia Klack por me ajudarem muito na etapa inicial deste trabalho;

Aos alunos e professores do L27 e L29 da UEPG, em especial ao grupo LEQQA, pela acolhida, ajuda e apoio que me concederam no período em que estive em Ponta Grossa;

Aos colegas e amigos da turma de doutorado de 2014, pelo companheirismo e pelas risadas compartilhadas;

Ao C-LABMU pela infraestrutura disponibilizada para a realização das análises;

À Capes pela bolsa concedida;

À UNICENTRO e a UEPG pelo suporte fornecido;

À coordenação e secretaria do programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO, pelo auxílio sempre quando necessário;

Enfim, a todos que de algum modo fizeram parte desta caminhada, meu mais sincero agradecimento.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

**Isaac Newton**

## RESUMO

Os alimentos e bebidas, a exemplo do iogurte e do chá-mate, são algumas das principais rotas de ingestão de íons metálicos que, dependendo da concentração e especiação na matriz alimentar, possuem importantes funções biológicas no organismo. No entanto, a quantidade de ingestão destes elementos deve ser controlada, uma vez que a falta ou excesso dos mesmos podem ocasionar efeitos adversos para os seres vivos. Normalmente, utiliza-se a concentração total de elementos em matrizes alimentares no controle de qualidade e segurança alimentar. Contudo, a bioacessibilidade de elementos metálicos em alimentos e bebidas deve ser avaliada, uma vez que esse parâmetro estima a quantidade a ser absorvida dos mesmos ou a sua possível função nutritiva ou tóxica na rota de ingestão-digestão-absorção humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi, primeiramente, determinar a concentração total de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em amostras de iogurte, propondo uma metodologia rápida e direta, através da amostragem em suspensão aliada a Espectrometria de Absorção Atômica - AAS (FAAS e GF AAS). Para isso, soluções de HNO<sub>3</sub> e HCl foram usadas como meio dispersor de iogurte para preparo das suspensões. Além da otimização do programa de aquecimento do forno de grafite, realizado para cada metal traço na matriz, o método proposto foi validado, sendo possível obter sensibilidade adequada, com precisão e exatidão. Os ensaios *in vitro* de digestão gastrointestinal foram realizados com base no método PBET (Physiologically Based Extraction) com a simulação dos processos de digestão humana usando suco gástrico (pepsina extraída de mucosa gástrica de suínos e HCl) e suco intestinal (pancreatina extraída de pâncreas de suínos, sais de biles e NaHCO<sub>3</sub>). O processo de incubação foi realizado para as etapas de digestão gástrica e intestinal por 2 horas, à 37 °C e agitação (150 rpm) simulando as condições humanas de temperatura e movimentos peristálticos. As frações bioacessíveis foram obtidas após centrifugação (10000 rpm, 4 °C, e 20 min) e as concentrações dos íons metálicos foram quantificadas por curva analítica com padronização externa empregando AAS. Foram analisadas 25 amostras de iogurte de 6 marcas diferentes, com consistência e sabores variados. Com relação à concentração total, Zn e Cu foram quantificados em todas as amostras, com concentrações médias de  $7,2 \pm 7,5 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $103,4 \pm 151,5 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. Essas concentrações estão concordantes com a literatura, e são comparáveis aquelas disponibilizadas na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) – 200 ng de Cu em 1g de iogurte, e 3 a 5  $\mu\text{g}$  de Zn por grama de iogurte. Cr, Pb e Cd foram quantificados em menos de 36% das amostras, sendo que as concentrações médias ( $\text{ng g}^{-1}$ ) para esses metais foram de  $2,4 \pm 1,4$  (Cd) a  $37,4 \pm 11,9$  (Pb). Com relação as frações bioacessíveis, para elementos considerados essenciais, observou-se a ordem Cr > Cu > Zn. Cr e Cu apresentaram as maiores frações bioacessíveis a partir do iogurte, com médias de  $102 \pm 12\%$  e  $87 \pm 18\%$ , respectivamente. Considerando as funções biológicas desempenhadas por metais como Cr(III) e Cu, uma bioacessibilidade elevada destes metais é desejável. Apesar de Zn ser um elemento essencial, baixos valores para frações bioacessíveis ( $24 \pm 7\%$ ) foram observadas para o metal a partir do iogurte. Para Pb e Cd, as frações bioacessíveis foram de  $33 \pm 5\%$  e  $1,6 \pm 2,4\%$ , respectivamente. Menores frações bioacessíveis para esses metais são desejáveis, considerando sua toxicidade. Através dos cálculos de ingestão dos metais presentes no iogurte, considerando a bioacessibilidade dos mesmos, os valores médios em relação a ingestão diária recomendada (IDR) ou limite tolerável para ingestão de metais variaram de 0,003% (Cd) a 2,5% (Zn). Neste caso, percebe-se que a ingestão de iogurte é segura com relação a elementos tóxicos como Pb e Cd. No entanto, também não pode ser considerada uma fonte de elementos essenciais como Cr, Cu e Zn. Para chá-mate, as concentrações totais de Al, Zn, Cu, Cr, Cd e Pb foram

determinadas em decocções preparadas com o aquecimento do produto comercial com água ultrapura, empregando AAS. A bioacessibilidade *in vitro*, foi realizada do mesmo modo que para iogurte, utilizando sucos gástrico e intestinal. Os estudos foram conduzidos com 20 amostras de chá-mate (3 marcas), com diferentes sabores e/ou lotes, adquiridas no comércio local. As concentrações médias de íons metálicos determinadas nas decocções de chá-mate variaram de  $50 \pm 24 \text{ ng g}^{-1}$  (Cd) a  $60 \pm 18 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  (Al). A variabilidade entre as concentrações de metais e as amostras pode estar relacionada com o local de cultivo da erva-mate ou até mesmo com o processo industrial envolvido na produção do chá. Os dados obtidos foram analisados através da Análise de Componentes Principais (PCA) e foi observada uma separação das amostras (com maior destaque para as marcas 1 e 2) em função da marca do produto e da concentração dos metais avaliados. Com relação a bioacessibilidade, a liberação dos metais considerados nutrientes da bebida seguiu a ordem de  $\text{Cr} \geq \text{Cu} > \text{Zn}$ , representando de 41 a 85% da concentração total dos elementos. Já para os metais que não possuem atividade biológica conhecida, a ordem de bioacessibilidade foi  $\text{Al} \gg \text{Cd} > \text{Pb}$ . Apesar do Cd apresentar os menores teores na decocção, a sua fração bioacessível foi cerca de 52% da concentração total. Para Al e Pb, as frações bioacessíveis foram de 100% e 19%, respectivamente. Portanto, o Al é um elemento presente no chá-mate em concentrações elevadas e na forma totalmente bioacessível. A partir dos valores de bioacessibilidade, foi realizado o cálculo de ingestão diária dos metais, sendo que os resultados indicaram que o consumo de decocção do chá-mate fornece pequenas quantidades de metais para o organismo, representando cerca de 0,008% (Pb) a 0,6% (Al) das concentrações aceitáveis para a ingestão desses elementos. Portanto, a decocção de chá-mate para as amostras avaliadas apresenta segurança alimentar em relação às espécies metálicas estudadas, não apresentando risco de toxicidade em relação aos metais não-essenciais (Al, Cd e Pb), e nem potencial nutritivo em relação aos metais essenciais (Zn, Cu e Cr).

**Palavras-chave:** Chá-mate. Iogurte. Amostragem em suspensão. Metais traço. Bioacessibilidade. Absorção atômica.

## ABSTRACT

Food and beverages, such as yogurt and mate tea, are some of the main routes of ingestion of metal ions that, depending on concentration and speciation in the food matrix, have important biological functions in the organism. However, should be controlled the amount of ingestion of these elements, since the lack or excess of them can cause adverse effects for living beings. Normally, in quality control and food safety is used the total concentration of elements in food matrices. However, should be assessed the bioaccessibility of metal elements in food and beverages, since this parameter estimates the amount to be absorbed from them or their possible nutritional or toxic function in the route of human ingestion-digestion-absorption. Thus, the aim of this work was first to determine the total concentration of Zn, Cu, Cr, Cd and Pb in yogurt samples, proposing a fast and direct methodology, by slurry sampling allied to Atomic Absorption Spectrometry - AAS (FAAS and GF AAS). For this, as dispersion medium of yogurt to prepare the suspensions were used solutions of HNO<sub>3</sub> and HCl. In addition to the optimization of the heating program of the graphite furnace, performed for each metal trace in the matrix, it was validated the proposed method, being possible to obtain adequate sensitivity, with precision and accuracy. Based on the PBET (Physiologically Based Extraction) method with the simulation of human digestion processes using gastric juice (pepsin extracted from porcine gastric mucosa and HCl) and intestinal juice (pancreatin extracted from swine pancreas, bile salts and NaHCO<sub>3</sub>) were performed *in vitro* gastrointestinal digestion assays. The incubation process for the gastric and intestinal digestion stages was performed for 2 hours at 37 °C and agitation (150 rpm) simulating the human conditions of temperature and peristaltic movements. After centrifugation (10000 rpm, 4 °C, and 20 min) the bioaccessible fractions were obtained, and the metal ion concentrations were quantified by analytical curve with external standardization using AAS. Twenty-five samples of yogurt from 6 different brands were analyzed, with consistency and varied flavors. Zn and Cu were quantified in all samples, with mean concentrations of  $7.2 \pm 7.5 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $103.4 \pm 151.5 \text{ ng g}^{-1}$ , respectively. These concentrations are in agreement with the literature, and are comparable to those available in the Brazilian Table of Food Composition (in Portuguese Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO) - 200 ng of Cu in 1g yogurt, and 3 to 5  $\mu\text{g}$  of Zn per gram of yogurt. Cr, Pb and Cd were quantified in less than 36% of the samples, and the mean concentrations ( $\text{ng g}^{-1}$ ) for these metals were  $2.4 \pm 1.4$  (Cd) at  $37.4 \pm 11.9$  (Pb). Regarding the bioaccessible fractions, for the elements considered essential, it was observed the order  $\text{Cr} > \text{Cu} > \text{Zn}$ . Cr and Cu presented the highest bioaccessible fractions from yogurt, with averages of  $102 \pm 12\%$  and  $87 \pm 18\%$ , respectively. Considering the biological functions performed by metals such as Cr(III) and Cu, a high bioaccessibility of these metals is desirable. Although Zn is an essential element, the metal from the yogurt presents low values for bioaccessible fractions ( $24 \pm 7\%$ ). For Pb and Cd, the bioaccessible fractions were  $33 \pm 5\%$  and  $1.6 \pm 2.4\%$ , respectively. Lower bioaccessible fractions for these metals are desirable considering their toxicity. Based on the metal intake calculations, considering the bioaccessibility from the yogurt, the mean values in relation to the recommended daily intake (RDI) or tolerable limit for intake of metals varied from 0.003% (Cd) to 2.5% (Zn). In this case, yogurt intake is safe in relation to toxic elements such as Pb and Cd. However, it cannot be considered a source of essential elements such as Cr, Cu and Zn. For mate tea, total concentrations of Al, Zn, Cu, Cr, Cd and Pb were determined in decoctions prepared by heating the commercial product with ultrapure water using AAS. Of the same manner as for yogurt, using gastric and intestinal juices, it was performed the *in vitro* bioaccessibility. The studies with 20 samples of mate tea (3 brands), with different flavors

and/or lots, acquired in the local commerce were conducted. The mean concentrations of metal ions determined in mate tea decoctions ranged from  $50 \pm 24 \text{ ng g}^{-1}$  (Cd) to  $60 \pm 18 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  (Al). The variability between the concentrations of metals and the samples may be related to the place of cultivation of yerba mate or even to the industrial process involved in the production of tea. Through Principal Component Analysis (PCA) were analyzed the data obtained, and a separation of the samples was observed (with a greater emphasis on brands 1 and 2) according to the brand of the product and the concentration of the evaluated metals. Regarding bioaccessibility, the release of the metals considered nutrients of the beverage followed the order of  $\text{Cr} \geq \text{Cu} > \text{Zn}$ , representing 41 to 85% of the total concentration of the elements. For the elements that do not possess known biological activity, the order of bioaccessibility was  $\text{Al} \gg \text{Cd} > \text{Pb}$ . Although the Cd presented the lowest levels in the decoction, its bioaccessible fraction was about 52% of the total concentration. For Al and Pb, the bioaccessible fractions were 100% and 19%, respectively. Therefore, Al is an element present in mate tea in high concentrations and in fully bioaccessible form. From the bioaccessibility values, the daily intake of the metals was calculated, and the results indicated that the consumption of mate tea decoction gives small amounts of metals to the organism, representing about 0.008% (Pb) to 0,6% (Al) of the acceptable concentrations for the ingestion of these elements. Therefore, the mate tea decoction for the evaluated samples presents food safety in relation to the metallic species studied, presenting no risk of toxicity in relation to non-essential metals (Al, Cd and Pb), nor nutritive potential in relation to essential metals (Zn, Cu and Cr).

**Keywords:** Mate tea. Yogurt. Slurry sampling. Trace metals. Bioaccessibility. Atomic Absorption.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Estrutura química de alguns compostos orgânicos (vitaminas, ácidos graxos e carboidratos) comumente encontrados em iogurte.....	27
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura química de alguns compostos fenólicos e metilxantinas encontrados em chá-mate.....	31
<b>Figura 2.3.</b> Proposta de estrutura química de melanoidinas.....	32
<b>Figura 3.1.</b> Tubo criogênico utilizado no procedimento DU-TC.....	51
<b>Figura 3.2.</b> Gráficos de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação de Zn e Cu em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança .....	66
<b>Figura 3.3.</b> Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação direta de Zn em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança.....	68
<b>Figura 3.4.</b> Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação direta de Cu em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança.....	69
<b>Figura 3.5.</b> Curvas de pirólise e atomização obtidas durante a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite para suspensões de iogurte ( <b>A, C, E e G</b> ) e padrões aquosos ( <b>B, D, F e H</b> ) de Pb ( <b>A e B</b> ), Cr ( <b>C e D</b> ), Cu ( <b>E e F</b> ) e Cd ( <b>G e H</b> ).....	73
<b>Figura 3.6.</b> Curvas analíticas para Zn, Cu, Cr, Pb e Cd realizadas por AAS.....	77
<b>Figura 3.7.</b> Recuperação de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em suspensão de iogurte.....	81
<b>Figura 3.8.</b> Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr em solução aquosa (n=3), quantificada por AAS.....	85
<b>Figura 3.9.</b> Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr do iogurte (n=3), quantificada por AAS.	86
<b>Figura 3.10.</b> Fração bioacessível de Cu e Zn do iogurte (n=3), quantificada por AAS.....	87
<b>Figura 3.11.</b> Fração bioacessível de Pb e Cd em solução aquosa (padrão metálico) (n=3), quantificada por GF AAS.....	89
<b>Figura 3.12.</b> Concentrações totais de Zn determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e FAAS.....	93
<b>Figura 3.13.</b> Concentrações totais de Cu determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS.....	94
<b>Figura 3.14.</b> Concentrações totais de Cr determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS.....	95

<b>Figura 3.15.</b> Concentrações totais de Cd determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS.....	96
<b>Figura 3.16.</b> Gráficos de pesos ( <b>A</b> ) e de escores ( <b>B</b> ) para as componentes principais 1 e 2 das concentrações totais de metais obtidos com a análise multivariada dos dados de iogurte.....	98
<b>Figura 3.17.</b> Gráficos de pesos ( <b>A</b> ) e de escores ( <b>B</b> ) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de iogurte.....	99
<b>Figura 3.18.</b> Concentração total e frações bioacessíveis de Zn em iogurte determinadas por FAAS.....	103
<b>Figura 3.19.</b> Concentração total e fracões bioacessíveis de Cu em iogurte determinadas por GF AAS.....	105
<b>Figura 3.20.</b> Concentração total de Cr ( <b>A</b> ) e suas respectivas frações bioacessíveis ( <b>B</b> ) em iogurte determinadas por GF AAS.....	107
<b>Figura 3.21.</b> Concentração total de Cd ( <b>A</b> ) e suas respectivas frações bioacessíveis ( <b>B</b> ) em iogurte.....	108
<b>Figura 3.22.</b> Gráficos de pesos ( <b>A</b> ) e de escores ( <b>B</b> ) para as componentes principais 1 e 2 obtidas para as frações bioacessíveis de metais com a análise multivariada dos dados de iogurte.....	109
<b>Figura 4.1.</b> Concentração média total de Al nas três marcas de chá-mate estudadas.....	124
<b>Figura 4.2.</b> Gráficos de pesos ( <b>A</b> ) e de escores ( <b>B</b> ) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados para decocção de chá-mate.	126
<b>Figura 4.3.</b> Aspecto físico das amostras de chá-mate pertencentes as Marcas 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita).....	127
<b>Figura 4.4.</b> Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr em decocções de chá-mate determinadas por AAS.....	132
<b>Figura 4.5.</b> Concentrações de Al determinadas em decocções de chá-mate empregando FAAS.....	136
<b>Figura 4.6.</b> Concentrações de Zn determinadas em decocções de chá-mate empregando FAAS.....	136
<b>Figura 4.7.</b> Concentrações de Cu determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS.....	137

<b>Figura 4.8.</b> Concentrações de Cr determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS.....	138
<b>Figura 4.9.</b> Concentrações de Cd determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS.....	138
<b>Figura 4.10.</b> Concentrações de Pb determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS.....	139
<b>Figura 4.11.</b> Gráficos de pesos <b>(A)</b> e de escores <b>(B)</b> para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de decocção de chá-mate.....	141
<b>Figura 4.12.</b> Concentração total e fração bioacessível de Al em decocção de chá-mate determinadas por FAAS.....	145
<b>Figura 4.13.</b> Concentração total e fração bioacessível de Zn em decocção de chá-mate determinadas por FAAS.....	146
<b>Figura 4.14.</b> Concentração total e fração bioacessível de Cu em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS.....	147
<b>Figura 4.15.</b> Concentração total e fração bioacessível de Cr em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS.....	149
<b>Figura 4.16.</b> Concentração total e fração bioacessível de Cd em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS.....	150
<b>Figura 4.17.</b> Concentração total e fração bioacessível de Pb em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS.....	151
<b>Figura 4.18.</b> Gráficos de pesos <b>(A)</b> e de escores <b>(B)</b> para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de concentração total e fração bioacessível de íons metálicos para decocção de chá-mate.....	152

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Diferentes procedimentos relatados na literatura para bioacessibilidade de metais a partir de alimentos.....	45
<b>Tabela 3.1.</b> Avaliação de diferentes métodos para preparo da amostra de iogurte (40,0 g L <sup>-1</sup> enriquecidas com Cu/Zn (50 µg g <sup>-1</sup> ))......	50
<b>Tabela 3.2.</b> Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para DU-TC.....	51
<b>Tabela 3.3.</b> Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para AS.....	51
<b>Tabela 3.4.</b> Condições de extração das frações bioacessíveis de íons metálicos de iogurte para os três procedimentos testados.....	57
<b>Tabela 3.5.</b> Avaliação de curvas analíticas preparadas em diferentes condições para a determinação das frações bioacessíveis de Zn, Cu e Cr em iogurte.....	57
<b>Tabela 3.6.</b> Informações das amostras de iogurte utilizadas na determinação total e bioacessível de metais por AAS (informações do rótulo da embalagem comercial).....	59
<b>Tabela 3.7.</b> Resultados da determinação dos íons metálicos (Zn e Cu) por FAAS em amostras de iogurte usando diferentes métodos de preparo de amostra e aplicação de teste <i>Tukey</i> de comparação múltipla de médias.....	61
<b>Tabela 3.8.</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com ponto central para preparo de amostra de iogurte utilizando DU-TC e resultados obtidos para concentração e taxa de recuperação de Cu e Zn por FAAS.....	64
<b>Tabela 3.9.</b> Efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados no planejamento 2 <sup>3</sup> para DU-TC.....	65
<b>Tabela 3.10.</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com ponto central para preparo de amostra de iogurte utilizando AS, e resultados obtidos para concentração e taxa de recuperação de Cu e Zn em iogurte por FAAS.....	67
<b>Tabela 3.11.</b> Efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados no planejamento 2 <sup>2</sup> para AS.....	67
<b>Tabela 3.12.</b> Programa de aquecimento do forno de grafite, otimizado para determinação direta de Cr, Pb, Cu e Cd em iogurte.....	76
<b>Tabela 3.13.</b> Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para Zn, Cu, Cr, Pb e Cd.....	78

<b>Tabela 3.14.</b> Dados para LOD, LOQ e testes de precisão para o método de determinação direta de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em iogurte.....	79
<b>Tabela 3.15.</b> Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em iogurte.....	83
<b>Tabela 3.16.</b> Valores de LOD e LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ ) obtidos para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em iogurte para P1 e P2.....	84
<b>Tabela 3.17.</b> Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Pb e Cd em iogurte por GF AAS.....	90
<b>Tabela 3.18.</b> Quantificação das concentrações totais de Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em iogurte ( $n=3$ ), empregando amostragem em suspensão por AAS.....	92
<b>Tabela 3.19.</b> Estimativa da ingestão humana de Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$ por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) e uma criança (20 kg) que consome iogurte (160 g por dia).....	101
<b>Tabela 3.20.</b> Estimativa da ingestão humana de Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$ por kg de peso corpóreo), com relação a bioacessibilidade, para um adulto (70 kg) e uma criança (20 kg) que consome iogurte (160 g por dia).....	110
<b>Tabela 3.21.</b> Porcentagem de ingestão de metais a partir do iogurte, com relação a bioacessibilidade, comparados ao valor recomendado ou permitido para cada metal estudado.....	111
<b>Tabela 4.1.</b> Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial $2^2$ com ponto central, para infusão de chá-mate.....	116
<b>Tabela 4.2.</b> Condições de atomização e faixa de trabalho para cada metal determinado em decocção de chá-mate.....	116
<b>Tabela 4.3.</b> Condições de extração das frações bioacessíveis de íons metálicos de decocção de chá-mate para os três procedimentos testados.....	118
<b>Tabela 4.4.</b> Avaliação de curvas analíticas preparadas em diferentes condições para determinação das frações bioacessíveis de Zn, Cu e Cr em decocção de chá-mate.....	118
<b>Tabela 4.5.</b> Matriz e resultados para planejamento fatorial $2^2$ com ponto central para determinação de Zn e Cr em chá-mate, e valores de efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados.....	120

<b>Tabela 4.6.</b> Valores médios de umidade e concentração para metais (n=3) determinados por AAS, em decocções de chá-mate de diferentes marcas e sabores.....	122
<b>Tabela 4.7.</b> Estimativa da ingestão de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr através do consumo frequente de chá-mate.....	128
<b>Tabela 4.8.</b> Estimativa da ingestão humana de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr ( $\mu\text{g}$ por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) que consome chá-mate frequentemente (1 sachê - 1,75 g por dia).....	128
<b>Tabela 4.9.</b> Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Cu e Cr em chá-mate.....	130
<b>Tabela 4.10.</b> Valores de LOD e LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ ) para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em decocção de chá-mate para P1 e P2.....	131
<b>Tabela 4.11.</b> Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Al, Pb e Cd em decocção de chá-mate.....	134
<b>Tabela 4.12.</b> Quantificação de Al, Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em decocção de chá-mate (n=3) empregando AAS.....	140
<b>Tabela 4.13.</b> Estimativa da ingestão humana de Al, Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$ por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) que consome chá-mate (1 sachê - 1,75 g por dia).....	143
<b>Tabela 4.14.</b> Estimativa da ingestão humana de Al, Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$ por kg de peso corpóreo), em relação à bioacessibilidade, para um adulto (70 kg) que consome chá-mate (1 sachê - 1,75 g por dia).....	154
<b>Tabela 4.15.</b> Porcentagem de ingestão de metais a partir da decocção de chá-mate, com relação a bioacessibilidade, comparados ao valor recomendado ou permitido para cada metal estudado.....	155

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês Atomic Absorption Spectrometry
AES	Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês Atomic Emission Spectrometry
ANOVA	Análise de variância
AS	Amostragem em suspensão
BG	Background
DS	Digestão por via seca
DU-B	Digestão por via úmida com refluxo em béquer
DU-TC	Digestão por via úmida em tubo criogênico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IDR	Ingestão diária recomendada
LOD	Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês Principal Components Analysis
r	Coefficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation
RSD <sub>H</sub>	Desvio padrão relativo predito
RSD <sub>PI</sub>	Desvio Padrão Relativo para precisão intermediária
RSD <sub>r</sub>	Desvio Padrão Relativo para repetitividade

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 OBJETIVOS.....	24
1.2.1 Objetivos Gerais.....	24
1.2.2 Objetivos Específicos.....	24
<b>CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	25
2.1 IOGURTE.....	26
2.2 CHÁ-MATE.....	29
2.3 PRESENÇA DE METAIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS.....	33
2.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ALIMENTOS.....	36
2.5 AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE ÍONS METÁLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES.....	41
<b>CAPÍTULO 3 - IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS E DAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS DE ÍONS METÁLICOS EM IOGURTE</b> .....	47
3.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	48
3.1.1 Procedimentos de Técnicas Limpas, Reagentes e Instrumentação para a Determinação de Íons Metálicos em Iogurte.....	48
3.1.2 Amostras de Iogurte.....	49
3.1.3 Procedimentos Analíticos.....	50
3.1.3.1 <i>Avaliação de diferentes procedimentos para preparo da amostra e determinação de Cu e Zn em iogurte</i> .....	50
3.1.3.2 <i>Planejamento fatorial para determinação de Cu e Zn em iogurte</i> .....	51
3.1.3.3 <i>Otimização de metodologias analíticas para determinação de Cr, Cu, Pb e Cd em suspensão de iogurte por GF AAS</i> .....	52
3.1.4 Validação <i>In-house</i> das Metodologias Analíticas Desenvolvidas para a Determinação de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Iogurte por AAS.....	52
3.1.5 Implantação de Métodos Analíticos para Avaliação da Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de Íons Metálicos em Iogurte.....	55

3.1.5.1 Reagentes e Instrumentação.....	55
3.1.5.2 Amostras.....	55
3.1.5.3 Avaliação de procedimentos analíticos para determinação da bioacessibilidade <i>in vitro</i> de Cu, Cr e Zn em iogurte.....	55
3.1.6 Implementação do Procedimento <i>In Vitro</i> para Determinação das Frações Bioacessíveis de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Iogurte.....	58
3.1.7 Determinação da Concentração Total e Bioacessível de Íons Metálicos em Iogurte.....	58
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.2.1 Avaliação de Procedimentos de Preparo de Amostra para a Determinação de Cu e Zn em Iogurte Empregando Espectrometria de Absorção Atômica.....	60
3.2.2 Uso de Planejamento Fatorial na Otimização das Condições de Tratamento de Amostra para a Determinação de Cu e Zn em Iogurte por FAAS.....	63
3.2.3 Determinação de Cr, Cd, Cu e Pb em Suspensão de Iogurte por GF AAS.....	70
3.2.4 Estudo de Validação para Determinação de Zn, Cr, Pb, Cu e Cd em Suspensão de Iogurte.....	76
3.2.5 Implementação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade <i>In vitro</i> de Íons Metálicos em Matrizes Alimentares.....	82
3.2.6 Determinação da Concentração Total de Metais Traço em Suspensão de Iogurte...	91
3.2.7 Análise Estatística das Concentrações Totais de Metais em Iogurte empregando Análise dos Componentes Principais (PCA).....	97
3.2.8 Grau de Ingestão Humana de Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em função do consumo de Iogurte.....	100
3.2.9 Determinação da Bioacessibilidade de Íons Metálicos em Iogurte.....	102
3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
<b>CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO TOTAL E BIOACESSÍVEL DE ÍONS METÁLICOS EM CHÁ-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSES</i>)..</b>	114
4.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	115
4.1.1 Amostras de Chá-mate.....	115
4.1.2 Determinação do Teor de Umidade (%) das Amostras de Chá-mate.....	115
4.1.3 Preparo da Amostra.....	115
4.1.4 Avaliação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade <i>In vitro</i> de Cu, Cr e Zn em Chá-mate.....	117

4.1.5 Implementação do Procedimento <i>In Vitro</i> para Determinação das Frações Bioacessíveis de Al, Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Chá-mate.....	119
4.1.6 Determinação da Concentração Total e Bioacessível de Íons Metálicos em Chá-mate.....	119
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
4.2.1 Grau de Ingestão Humana de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr em Função do Consumo de Chá-mate.....	128
4.2.2 Implementação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de Íons Metálicos em Chá-mate.....	129
4.2.3 Determinação da Concentração Total de Íons Metálicos em Decocção de Chá-mate.....	135
4.2.4 Determinação da Bioacessibilidade de Íons Metálicos em Decocção de Chá-mate.	145
4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	156
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>158</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>160</b>

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

Os alimentos e bebidas são as principais fontes de ingestão de metais para os seres vivos. Outras fontes podem ser por meio da ingestão direta (fins medicinais e como parte da dieta) ou sem intenção (através de vegetais e demais alimentos provenientes da agricultura sem a devida higienização) de partículas do solo que contém inúmeros elementos químicos (INTAWONGSE e DEAN, 2006). A presença de espécies metálicas nos alimentos pode ser natural, ou proveniente da contaminação ambiental e de processos de produção dos alimentos (industrialização) (VERSANTVOORT et al., 2005).

Os elementos são fundamentais durante vários estágios da vida do ser humano, atuando em diversas funções essenciais ao organismo (GUPTA e GUPTA, 2014). Elementos considerados minerais, como Ca, Na, K e Mg, são elementos majoritários essenciais. Micronutrientes ou elementos minoritários essenciais como Cu, Zn, Fe, Mn, Se, Cr (III), entre outros, também são encontrados em consumíveis (alimentos e bebidas), e no organismo humano podem desempenhar funções primordiais dependendo da sua forma e concentração. Nos alimentos podem ser encontrados ainda elementos como Pb, Cd, Hg e As que não desempenham nenhuma função no organismo humano.

Ao ingerir alimentos que possuem quantidades significativas de elementos químicos, o organismo fica sujeito à absorção e acumulação dos mesmos, o que a longo prazo, dependendo do metal ingerido, pode causar sérios danos aos seres vivos. Mas nem todo elemento presente em alimentos e bebidas está disponível para ser absorvido pelo organismo (VERSANTVOORT et al., 2005; BRANDON et al., 2006; DA SILVA et al., 2013). Isso se deve, principalmente, a forma como o metal está presente na matriz alimentar.

Ao estudar a influência dos metais no organismo dos seres vivos, principalmente aqueles com potencial tóxico, é necessário avaliar métodos para determinação da concentração total desses metais nas matrizes. Normalmente essa determinação das espécies metálicas é realizada por técnicas espectrométricas de análise baseadas em absorção (Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry* – AAS) ou emissão atômica (Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês *Atomic Emission Spectrometry* - AES) (POHL, 2009; KORN et al., 2008; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012). Nesse caso, a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (GF AAS) e a Espectrometria de Absorção Atômica

em Chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (FAAS), ganham destaque na quantificação de metais em matrizes complexas, pois apresentam baixo custo (em relação, por exemplo, a equipamentos de emissão com plasma – ICP OES (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e ICP-MS (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*)), adequada sensibilidade e seletividade, além de fornecerem resultados precisos e exatos (POHL et al., 2012a; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012).

Geralmente, quando se realizam determinações de espécies metálicas em alimentos utilizando AAS, é necessário que se realize um tratamento prévio da amostra, através de procedimentos de digestão por via seca e/ou por via úmida, que possam destruir a matriz orgânica e facilitar a determinação do analito em soluções mais simples (KORN et al., 2008). As vantagens destes procedimentos estão relacionadas principalmente com a completa solubilização das amostras, possibilitando a determinação dos elementos químicos com o mínimo de interferência. Porém, os procedimentos baseados em digestão por via úmida e por via seca têm desvantagens, como o maior tempo de preparo das amostras, e o uso de reagentes tóxicos e perigosos em quantidades significativas. Além disso, o maior tempo de preparo da amostra e as etapas de aquecimento envolvidas nos procedimentos, podem ter como consequência à perda do analito por volatilização ou mesmo a contaminação da amostra, o que influencia toda a análise (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010).

Nesse sentido, novas metodologias analíticas vêm sendo desenvolvidas, como a amostragem em suspensão, que é uma alternativa para a determinação direta (sem etapas de pré-tratamento de amostra) dos metais em diferentes matrizes alimentares e ambientais (DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012; DE ANDRADE et al., 2014). A amostragem em suspensão apresenta vantagens, pois reduz o tempo de preparo das amostras, minimiza problemas das radiações de fundo na análise direta de sólidos, possibilita o uso de padrões aquosos na calibração e minimiza problemas de contaminação ou perda do analito (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; KORN et al., 2008; DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012; KRAWCZYK, 2014). Apesar deste procedimento poder apresentar algumas desvantagens (problemas com a representatividade da amostragem – falta de homogeneidade na distribuição dos analitos na amostra; dificuldade em se obter tamanhos de partículas diminutos; dificuldade de encontrar materiais de referência para

calibração – quando necessário; entre outros) (NOMURA et al., 2016), ele vem ganhando destaque no preparo de diferentes amostras de interesse alimentar.

No entanto, a determinação da concentração total de íons metálicos em alimentos não é o suficiente para avaliar a potencialidade nutricional ou tóxica dos mesmos. Alguns metais têm baixa disponibilidade por estarem complexados em formas pouco solúveis, sendo facilmente excretados, e tendo assim uma baixa capacidade de absorção pelo organismo vivo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; VÁZQUEZ et al., 2015). Em termos gerais, é necessário conhecer a bioacessibilidade – fração de um composto, no caso metais, que após a ingestão, é liberado da matriz alimentar e é lançado no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para a absorção intestinal – e também a biodisponibilidade (toxicológica) – fração de íons metálicos que atinge a corrente sanguínea a partir do trato gastrointestinal, ou seja, aquela fração que realmente é absorvida pelo organismo – dos íons metálicos presentes no processo de ingestão-digestão de alimentos (OOMEN et al., 2002; INTAWONGSE e DEAN, 2006; BOSSO e ENZWEILER, 2008; HU et al., 2013; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; HENDERSON et al., 2014; ABOLLINO et al., 2018).

Apesar de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade terem aumentado nos últimos anos, na literatura brasileira os dados para estes testes são escassos. Sendo assim, muitos alimentos, como iogurte e chá-mate, todos de amplo consumo nacional e/ou mundial, merecem atenção especial, principalmente na divulgação da quantidade bioacessível de íons metálicos nessas matrizes.

Nesse sentido, esforços são necessários a fim de melhorar ou desenvolver novas metodologias analíticas que sejam fáceis e rápidas na determinação de íons metálicos em diferentes gêneros alimentícios (alimentos e bebidas) e também para a avaliação das frações bioacessíveis dos mesmos em diferentes amostras das matrizes alimentares, com o intuito de contribuir com informações reais e relevantes para a sociedade em geral, em relação à função biológica dos metais no organismo humano.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver, avaliar e validar diferentes metodologias analíticas para a determinação de metais traço (Zn, Al, Cu, Cr, Pb e Cd) em matrizes alimentares como iogurte e chá-mate, utilizando a espectrometria de absorção atômica e ferramentas estatísticas. Além disso, pretende-se verificar a bioacessibilidade destes metais no organismo, através de simulação, *in vitro*, do processo de digestão humana, a fim de verificar a contribuição nutricional e um possível potencial de toxicidade dos mesmos na rota de ingestão-digestão humana.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- i. Realizar estudos prévios, a fim de avaliar o uso da amostragem em suspensão frente aos métodos tradicionais de abertura de amostra (digestão por via seca e por via úmida) como uma metodologia rápida e eficiente na determinação de íons metálicos em iogurte por espectrometria de absorção atômica com o uso de ferramentas estatísticas;
- ii. Otimizar metodologias analíticas, com auxílio de análise uni e multivariada, para a determinação de metais (Cu, Zn, Pb, Cd e Cr) em iogurte, empregando técnicas baseadas em Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e em Forno de Grafite (GF AAS);
- iii. Validar as metodologias desenvolvidas através de parâmetros como limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão, e com o emprego de ferramentas estatísticas;
- iv. Aplicar as metodologias validadas em diferentes amostras comerciais de iogurte;
- v. Implementar metodologias analíticas para a determinação da bioacessibilidade *in vitro* de Cu, Zn, Pb, Cd e Cr em iogurte;
- vi. Determinar a concentração de Pb, Cd, Cr, Cu, Al e Zn em decocções de chás comerciais (*Ilex paraguarienses*) utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS) e em Chama (F AAS);
- vii. Avaliar os resultados obtidos em relação as concentrações de metais na bebida através de ferramentas estatísticas como a Análise de Componentes Principais (PCA);
- viii. Implementar metodologias analíticas para a determinação da bioacessibilidade *in vitro* de Al, Cu, Zn, Pb, Cd e Cr em chá-mate.

## CAPÍTULO 2

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os alimentos e bebidas são as principais fontes de ingestão de diversos nutrientes para os seres vivos. É através do consumo dessas matrizes que o ser vivo pode se manter nutrido e apto a realizar diversas atividades no seu dia a dia (RIBEIRO e COZZOLINO, 2007).

Além de serem responsáveis pela manutenção da vida, fornecendo energia e nutrientes necessários aos seres vivos, alguns alimentos podem apresentar componentes específicos que tem papel primordial no metabolismo, e por consequência, na saúde dos seres vivos. Esses alimentos são considerados funcionais, e por definição são alimentos ou componentes dietéticos que podem proporcionar um benefício para a saúde além da nutrição básica (MORAES e COLLA, 2006; WILDMAN e KELLEY, 2006; COSTA e ROSA, 2010). Em uma definição mais atual e específica, alimentos funcionais são alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos (conhecidos ou desconhecidos), que, em quantidades definidas, não tóxicas, fornecem uma solução clinicamente comprovada e benefícios documentados para a saúde, na prevenção, gestão ou tratamento de doenças crônicas (MARTIROSYAN e SINGH, 2015; JENZER et al., 2016; WILSON et al., 2017).

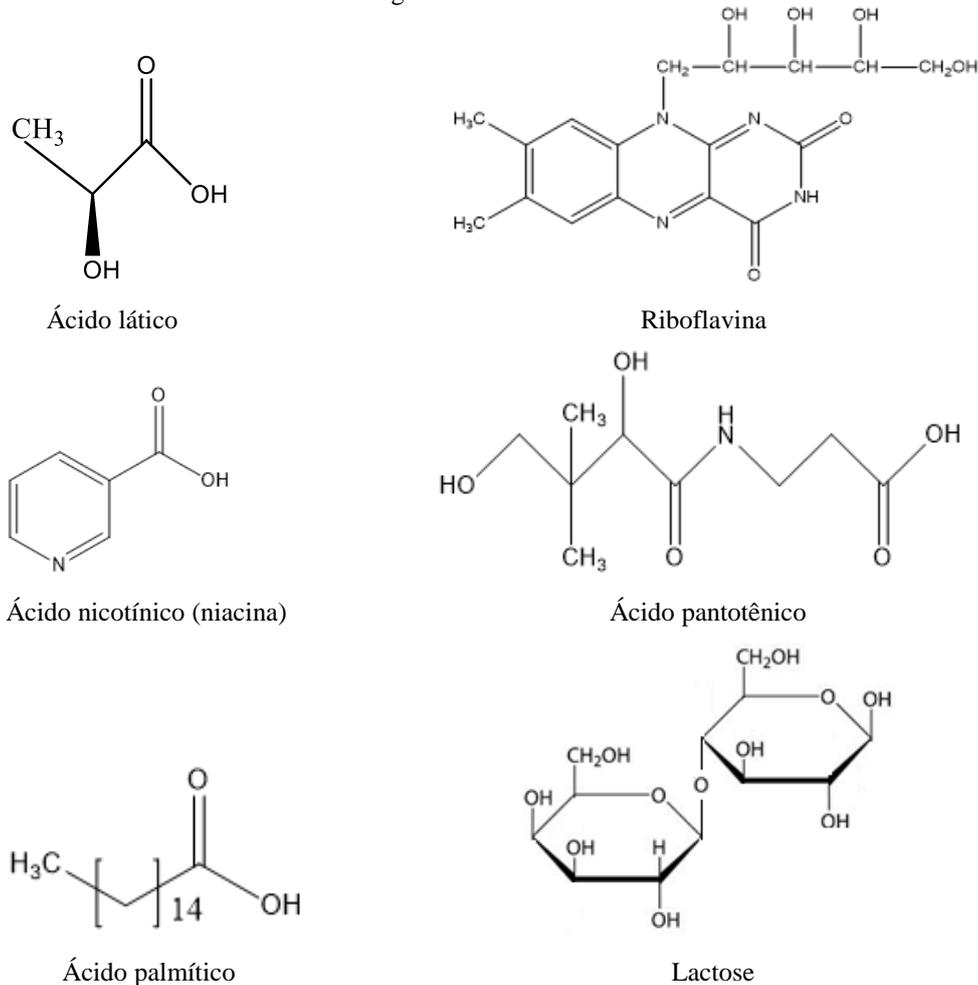
Para um alimento ser considerado funcional, os nutrientes presentes no mesmo devem apresentar papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo (ANVISA, 2017). Nesse caso, esses alimentos são constituídos por substâncias ou nutrientes que podem auxiliar, por exemplo, no controle de triglicerídeos, no funcionamento do intestino, na redução da absorção do colesterol, no equilíbrio da flora intestinal, entre outros, associados também a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (STRINGHETA, DE AQUINO e VILELA, 2010; JENZER et al., 2016; ANVISA, 2017). Geralmente os alimentos que possuem quantidades significativas de fibras, polifenóis, flavonóides, microrganismos probióticos e prebióticos, ômega 3, vitaminas, minerais, entre outros, são alimentos com alto poder funcional para o organismo dos seres vivos, e por isso eles vêm sendo amplamente estudados (JENZER et al., 2016; WILSON et al., 2017).

Dentro dessa classe de alimentos, estão presentes, verduras, legumes, frutas, diversos tipos de chá, grãos, leite e derivados, e muitos outros alimentos e bebidas amplamente consumidos pela população mundial.

## 2.1 IOGURTE

O iogurte é um produto lácteo, obtido da fermentação do leite através das bactérias do ácido láctico, usualmente *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) e *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), as quais convertem o açúcar do leite (lactose) em ácido láctico (VEDAMUTHU, 2006; BRANDÃO et al., 2010; LUIS et al., 2015). O iogurte possui uma composição similar a do leite, no entanto, com uma maior quantidade de compostos orgânicos, tais como proteínas (principalmente a caseína), vitaminas, lipídeos (ácidos graxos livres), além de minerais (BRANDÃO et al., 2010; WANG et al., 2013). Neste sentido, o iogurte pode ser considerado uma excelente fonte de vitaminas A (Retinol), B (tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9), cianocobalamina (B12)), e C; e de elementos como Ca, Mg, P e Zn (MARTIN, 2002; GAHRUIE et al., 2015). A composição do iogurte é variada entre produtos integrais e desnatados. Para cada 100 g de produto, a quantidade de gordura, por exemplo, pode variar de 3,0 a 0,2 g, respectivamente. Já as quantidades de carboidratos e proteínas são similares entre os diferentes produtos, sendo em média de 7,6 g e 5,2 g, respectivamente (CHRYSSANTHOPOULOS e MARIDAKI, 2010). A Figura 2.1 apresenta a estrutura química de alguns compostos comumente encontrados no iogurte.

**Figura 2.1.** Estrutura química de alguns compostos orgânicos (vitaminas, ácidos graxos e carboidratos) comumente encontrados em iogurte



**Fonte:** Adaptado de Fox et al. (2015).

O iogurte é um produto básico amplamente consumido pela população mundial, principalmente crianças e idosos (HEKMAT e MCMAHON, 1997; BRANDÃO et al., 2010; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012). A popularidade desse alimento como parte da dieta humana tem aumentado devido aos efeitos benéficos e contínuas modificações realizadas no produto, a fim de se obter ainda mais benefícios através do consumo do mesmo. Estudos relatam que o iogurte, como um alimento funcional e probiótico (devido à presença de microrganismos), fornece inúmeros benefícios aos seres humanos que o utilizam na dieta. Esses benefícios podem estar associados, por exemplo, a ação hipocolesterolêmica (possível redução na concentração de triglicerídeos (TG) e LDL - colesterol plasmáticos, bem como o aumento de HDL-colesterol sérico), diminuição do risco de câncer, auxílio na cura de infecções gastrointestinais, atuação no controle da hipertensão e da obesidade, entre outras (CHRYSSANTHOPOULOS e MARIDAKI, 2010; MODANÊSI, MERCER e BERNARDI, 2016). A população, em geral,

apresenta maior aceitação do iogurte em relação ao leite, inclusive entre pessoas com intolerância à lactose. Neste caso, o consumo de iogurte causa menos desconforto a estes indivíduos quando comparado ao consumo de leite (CHRYSSANTHOPOULOS e MARIDAKI, 2010).

Além disso, comercialmente existe uma variedade enorme de sabores, texturas, consistência e incrementos (pedaços de frutas, cereais, entre outros) (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012; LUIS et al., 2015), o que colabora na divulgação e aceitação do produto pelos consumidores. Em alguns casos, minerais e outros nutrientes são adicionados em alimentos como o iogurte para minimizar a deficiência dos mesmos, intensificando assim, sua ação no organismo humano (WATZKE, 1998; SARACOGLU et al., 2007).

Assim como acontece com diversos alimentos, o iogurte também pode apresentar metais em sua composição. Em relação aos macronutrientes, esse tipo de alimento é conhecido por apresentar quantidades significativas de Ca, Mg, K, etc. (BRANDÃO, MATOS e FERREIRA, 2011). Além disso, micronutrientes como Zn, Cu, Fe, Mn, entre outros também são encontrados neste alimento (BRANDÃO et al., 2010; KHAN et al., 2014). Elementos traço não essenciais como Pb e Cd, por exemplo, são menos comuns em iogurte, porém eles podem ocorrer, principalmente relacionados a contaminação ambiental ou industrial (KAYA, AKDENIZ e YAMAN, 2008; KHAN et al., 2014).

Além de iogurtes produzidos com leite bovino (iogurtes regulares) ainda podem ser encontrados, comercialmente, iogurtes produzidos com soja. Iogurtes de soja são produzidos com leite de soja, bactéria do iogurte e alguns adoçantes adicionais (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012). O uso do leite de soja pode reduzir a quantidade de gordura no iogurte, mas em sua composição ainda estão presentes proteínas de alta qualidade, fibras dietárias, vitaminas e vários elementos (JOOYANDEH, 2011). Assim, a determinação de metais neste produto também é de grande interesse devido ao crescimento comercial deste tipo de alimento.

Llorent-Martínez et al. (2012) avaliaram a presença de 20 micronutrientes e metais traço em iogurte regular e de soja provenientes da Espanha. As amostras de iogurte foram digeridas por radiação de micro-ondas e os metais determinados por ICP-MS. Neste estudo, os autores verificaram que os iogurtes de soja se destacaram em relação à concentração de Cu e Mn quando comparados com iogurte produzido com leite bovino. Para Cu, por exemplo, as concentrações em iogurte produzido com leite bovino variaram de 35 a 180 ng g<sup>-1</sup>, enquanto em iogurte de soja, as concentrações variaram de 300 a 1350 ng g<sup>-1</sup>. Por outro lado, foi observado que as concentrações de Zn foram similares entre os dois tipos de iogurte avaliados.

Er, Senkal e Yaman (2013) determinaram níveis de Pb e Ni em amostras de leite e iogurte da Turquia, por extração em fase sólida usando uma resina polimérica de aminotioazol. As amostras foram preparadas através de digestão via úmida utilizando HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e os metais foram determinados por FAAS. Apesar dos autores não conseguirem quantificar Ni nas amostras, foi possível determinar concentrações de Pb entre  $21 \pm 4$  a  $42 \pm 5$  ng g<sup>-1</sup> em amostras de iogurte.

Para iogurte brasileiro, Brandão, Matos e Ferreira (2011) avaliaram concentrações de Ca e Mg no alimento, sendo observado maiores concentrações de Ca do que de Mg nas amostras. Em outro estudo para iogurte brasileiro, Brandão et al. (2010) determinaram concentrações de Zn neste alimento, e os autores observaram que as concentrações desse metal nas amostras estão de acordo com as concentrações encontradas em iogurtes de outros países.

Ao verificar a presença de metais em um alimento amplamente consumido como o iogurte, torna-se importante avaliar as concentrações destes elementos no mesmo, principalmente buscando um controle de qualidade do produto e segurança alimentar para os consumidores.

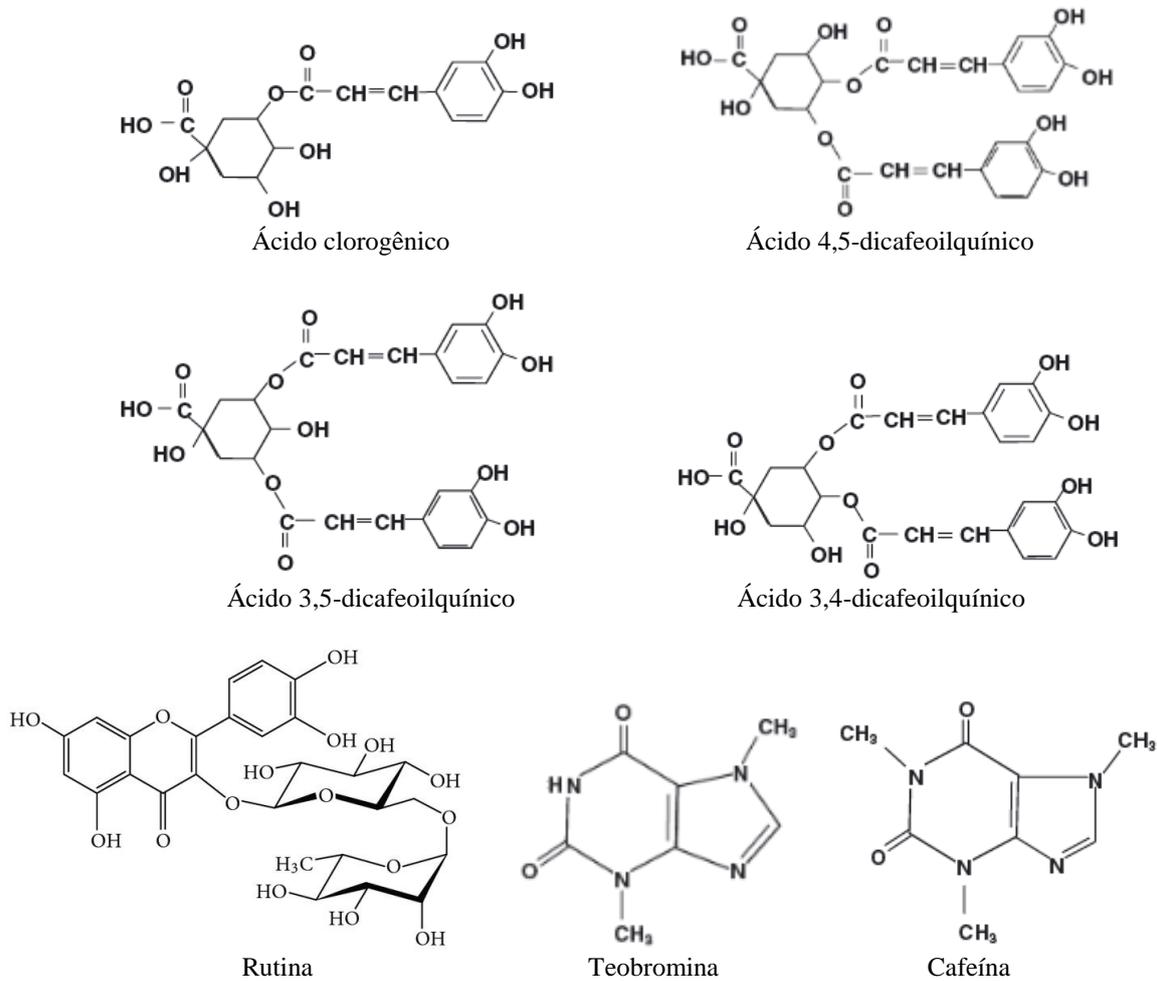
## 2.2 CHÁ-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), é uma espécie de grande importância – econômica, social e cultural – para algumas regiões do Brasil, Argentina e Paraguai (STURION e RESENDE, 2010; BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011; BORGES et al., 2017). No Brasil, a exploração econômica da erva-mate ocorre nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso, que concentram os maiores produtores e também, o maior consumo das bebidas originadas pela erva. Essa planta pertence ao gênero *Ilex*, da família das Aquifoliaceae, com mais de 600 espécies conhecidas, sendo que 68 destas ocorrem no Brasil (STURION e RESENDE, 2010; BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011). A espécie mais conhecida, e por isso amplamente utilizada é a *Ilex paraguariensis*, sendo que em infusão, a mesma apresenta propriedades estimulantes, diuréticas e digestivas, dentre as quais destacam-se a atividade antioxidante, propriedades vaso-dilatadoras, redutoras de lipídeos e de peso (HECK e DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2016; BORGES et al., 2017). A presença de cafeína solúvel pode atuar ainda em casos de depressões e fadiga cerebral, e facilitar o trabalho intelectual (STURION e RESENDE, 2010).

A erva-mate é amplamente utilizada no Brasil para o preparo de bebidas tradicionais como o chimarrão e o tererê (BRACESCO et al., 2011; DE CAMPOS et al., 2014; BORGES et al., 2017). No beneficiamento da erva para obtenção destes produtos, ela passa basicamente por três etapas: sapeco/branqueamento/pré-secagem (passagem rápida dos ramos com folhas pelo sapecador), secagem (para retirar toda a umidade da erva) e cancheamento (trituração da erva após a secagem) (MATSUMOTO, 2008; DE CAMPOS, 2013). A erva cancheada, além de ser usada para obtenção do chimarrão (após o processo de soque), pode ser usada como matéria-prima para a produção do chá (DE CAMPOS, 2013). Nesta etapa, ela é processada através da torrefação – sistema de forno com fogo direto – do mate verde (160 °C por aproximadamente 12 min), para obtenção do chá-mate tostado (DA COSTA et al., 2009). Essa bebida também é muito consumida no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país.

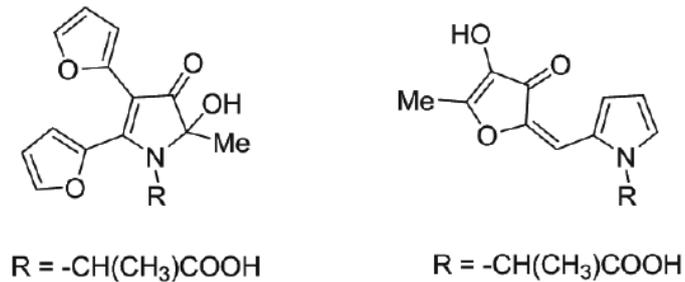
Este alto consumo, pode estar associado aos benefícios da erva-mate para a saúde dos seres vivos. Grande parte das características benéficas apresentadas pelos chás, em especial o chá-mate, se devem a sua composição. A presença de compostos fenólicos (em níveis maiores do que no chá verde e similares aos do vinho tinto), flavonóides, ácidos clorogênicos, alcaloides (metilxantinas – cafeína e teobromina), saponinas, vitaminas (A, complexo B, C e E), entre outros, contribuem para a inibição dos radicais livres no organismo, para os efeitos estimulantes do chá, propriedades coleréticas, anti-inflamatórias, etc. (DE MORAIS et al., 2009; BRACESCO et al. 2011; DE GODOY et al., 2013; LANZETTI et al., 2013). A Figura 2.2 apresenta as estruturas químicas de alguns componentes importantes do chá-mate.

**Figura 2.2.** Estrutura química de alguns compostos fenólicos e metilxantinas encontrados em chá-mate



**Fonte:** Adaptado de HECK e DE MEJIA (2007); YANG et al. (2012); DE CAMPOS, 2013.

Vale ressaltar que o processo de torrefação, pelo qual o chá-mate passa, pode causar modificações nos produtos devido à degradação térmica progressiva – perda de nutrientes e/ou possível diminuição do teor de compostos fenólicos. Contudo, existe uma minimização deste efeito causado pela formação de melanoidinas (produtos resultantes da reação de Maillard), as quais possuem uma elevada atividade antioxidante, atuando também como complexantes de espécies metálicas (favorecida pela presença de grupos carbonila de cetonas e hidroxilas dos álcoois) (MATSUMOTO, 2008; DE CAMPOS, 2013). A Figura 2.3 apresenta uma proposta de estrutura para as melanoidinas.

**Figura 2.3.** Proposta de estrutura química de melanoidinas

**Fonte:** DE CAMPOS, 2013.

Além disso, o chá-mate, assim como outros alimentos/bebidas, pode ser uma fonte importante de metais para o organismo dos seres vivos (HECK e DE MEJIA, 2007). Estes por sua vez, podem ser essenciais, a exemplo de Ca, Mg, K, entre outros (macronutrientes), além de micronutrientes essenciais, como Zn, Se, Fe e Cu. Como se sabe, esses íons metálicos apresentam benefícios aos seres vivos, sendo que a ingestão de altos níveis desses metais pode favorecer o surgimento de problemas graves no organismo. Os chás podem ainda apresentar teores de metais traço como Pb e Cd, que não desempenham nenhuma função vital no organismo dos seres vivos (KARAK e BHAGAT, 2010). A ocorrência de metais em chás de ervas ocorre, principalmente, devido à contaminação do solo por fertilizantes ou pela água de esgotos poluídos, pelo ar atmosférico (que pode estar contaminado devido à emissão de resíduos de indústrias), ou durante a etapa de processamento dos chás (VULCANO, SILVEIRA E ALVAREZ-LEITE, 2008). Essas diferentes características de cultivo das ervas causam também uma diferença nas concentrações de metais em chás provenientes da mesma espécie de plantas (HEVIA, ARANCIBIA e ROJAS-ROMO, 2015).

Grande parte dos estudos de perfil mineral de chás está relacionada com procedimentos de extração das espécies metálicas presentes em diferentes partes das plantas (VULCANO, SILVEIRA E ALVAREZ-LEITE, 2008). No entanto, estudos de quantificação de íons metálicos vêm sendo realizados em infusões dos chás de interesse, a fim de verificar o quanto realmente o organismo pode ingerir de espécies metálicas, principalmente as tóxicas como Pb e Cd, por exemplo (KARAK e BHAGAT, 2010; SCHULZKI, NÜBLEIN e SIEVERS, 2017).

Para chá-mate estudos na literatura são escassos, principalmente em relação a presença de espécies metálicas na bebida. Dentre os estudos relatados, a maioria investiga a presença de metais no chimarrão, umas das bebidas originadas pela erva-mate.

Bragança et al. (2011) avaliaram a presença de elementos traço em diferentes bebidas provenientes da erva-mate (chimarrão e tererê) por GF AAS, sendo que eles observaram

grandes diferenças nas concentrações dos metais devido aos vários fatores que envolvem a cultura da erva.

Da Costa et al. (2009) verificaram o fracionamento de Al em erva-mate verde e tostada (chá-mate) por FAAS. Foi possível observar que a lixiviação de Al é maior em infusão de mate verde do que no mate tostado, sendo que para o mate verde, amostras com maior concentração de compostos fenólicos facilitam a lixiviação do metal.

Outro estudo de labilidade de Al em infusões de erva-mate verde e tostada também foi realizado por Campos et al. (2014), utilizando, no entanto, voltametria adsorviva de redissolução catódica. Os autores observaram que os compostos polifenólicos contribuem na solubilização do Al presente na erva-mate, sendo que a maior parte do Al presente nas infusões da erva estaria complexado com as melanoidinas, compostos fenólicos e flavonoides, minimizando a sua biodisponibilidade.

Tendo-se a avaliação da concentração total dos metais em chá-mate, é necessário verificar a segurança alimentar dos mesmos, avaliando-se a contribuição nutricional e possíveis efeitos tóxicos dos metais presentes na bebida.

### 2.3 PRESENÇA DE METAIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS

Como se sabe, os alimentos e bebidas são as principais fontes de íons metálicos para os seres vivos, acompanhados de partículas do solo – ingestão direta ou sem intenção (INTAWONGSE e DEAN, 2006; GHARIBZAHEDI e JAFARI, 2017). A presença de espécies metálicas nos alimentos pode ser natural ou proveniente da contaminação ambiental e industrial (processo de produção dos alimentos) (VERSANTVOORT et al., 2005).

Os elementos são fundamentais durante vários estágios da vida do ser humano, atuando em diversas funções essenciais do organismo. Elementos como Ca, Na, K, Mg, ditos elementos majoritários essenciais, são encontrados em grandes quantidades nos alimentos e são fundamentais em vários processos biológicos dos organismos vivos. O Ca, por exemplo, está envolvido em processos de coagulação sanguínea, fotossíntese, divisão celular, contração muscular, e muitas outras funções essenciais a qualquer organismo vivo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Os alimentos são as principais fontes de Ca para a ingestão humana e sua quantidade de ingestão adequada está entre 1000-1300 mg/dia.

Micronutrientes ou elementos minoritários essenciais como Cu, Zn, Fe, Mn, Se, Cr, entre outros, também são encontrados em alimentos e bebidas, e no organismo humano desempenham funções primordiais.

O Zn, por exemplo, age na estrutura e na catálise de metaloenzimas, além de ser fundamental na regulação da expressão genética (SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006; GHARIBZAHEDI e JAFARI, 2017). Porém, seus benefícios são adquiridos com ingestão adequada, pois com ingestão excessiva, o Zn pode prejudicar a absorção de Fe e Cu pelo organismo dos seres vivos (SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). A ingestão diária recomendada (IDR) de Zn para adultos é de 8 e 11 mg dia<sup>-1</sup> para mulheres e homens, respectivamente (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004; BRASIL, 2005).

O Cr(III) pode ser considerado bioativo, pois sua presença na dieta de seres vivos está relacionada com o metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012). Contudo, a espécie Cr(VI) é considerada tóxica, causadora de graves problemas respiratórios e dermatites em geral, além de ser um agente carcinogênico (DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012). Um limite aceitável para ingestão diária de Cr é de 5 µg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (BAARS et al., 2001).

O Cu é um elemento traço essencial e pode ser considerado vital para várias enzimas (ELLINGSEN, HORN e AASETH, 2007). Além disso, o Cu pode ser associado ao metabolismo do esqueleto, sistema imunológico e na prevenção de doenças cardiovasculares (PEDROSA e COZZOLINO, 2007). No entanto, distúrbios no metabolismo de Cu podem causar graves problemas de saúde, a exemplo das doenças de Menkes – defeito na absorção intestinal de Cu, provocando deficiência funcional grave do metal – e de Wilson – defeito na excreção do metal pela bile, causando acúmulo nos tecidos (PEDROSA e COZZOLINO, 2007; ELLINGSEN, HORN e AASETH, 2007; BANDMANN, WEISS e KALER, 2015). O valor de IDR para adultos é de 900 µg de Cu por dia (IOM, 2001; BRASIL, 2005). No entanto, em relação a massa corpórea, um limite semanal aceitável é de 500 µg de Cu por kg de peso corpóreo (FAO/WHO, 2014).

Muitas vezes os alimentos são enriquecidos com esses elementos a fim de proporcionar às pessoas um consumo diário adequado dessas espécies, já que sua falta na dieta humana causa problemas de saúde (SARACOGLU et al., 2007). No entanto, a ingestão destes elementos deve ser controlada, visto que excessos podem levar a graves efeitos tóxicos no organismo

(SARACOGLU et al., 2007; DEMIREL et al., 2008). É preciso também, considerar a forma como esses elementos estão presentes na matriz de interesse (formas solúveis, íons livres e complexados – complexos solúveis e insolúveis) (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Nos alimentos podem ser encontrados ainda elementos como Pb, Cd, Hg, As, entre outros, que não desempenham nenhuma função no organismo humano (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ e NAVARRO-BLASCO, 2013; CHERFI, ABDOUN e GACI, 2014), e podem apresentar toxicidade dependendo da concentração e da sua forma – se o metal estiver solúvel, na sua forma livre (por exemplo,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , etc.) ou complexado por aminoácidos, ácidos ou sais orgânicos e por componentes da bile (BOSSO e ENZWEILER, 2008).

O Pb, por exemplo, além de problemas renais, hepáticos, neuromusculares, entre outros, é responsável por causar, principalmente em crianças, danos neurológicos que podem refletir na capacidade de aprendizagem das mesmas (SKERFVING e BERGDAHL, 2007; ER, SENKAL e YAMAN, 2013). Deve-se ressaltar que os efeitos tóxicos são referentes a forma livre ou complexada do Pb, ambas solúveis. Alguns complexos deste metal têm baixa solubilidade e assim, baixa toxicidade (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Atualmente, não existe uma dose de ingestão segura em relação a ingestão do metal. Já o Cd, considerando uma ingestão a longo prazo, pode causar danos nos rins, fígado, trato gastrointestinal, coração, vasos sanguíneos, além de enfraquecer a estrutura óssea dos seres vivos (WAALKES, 2003; MAIHARA e FÁVARO, 2007). Para Cd, considera-se tolerável um limite de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo (FAO/WHO, 2014).

O Al também não é considerado um elemento com função biológica conhecida, e estudos relatam uma alta ingestão deste metal através dos alimentos e bebidas (principalmente ervas e plantas) (EFSA, 2008). Altas doses de Al no organismo vêm sendo associados a problemas neurológicos e doenças neurodegenerativas, dentre os quais pode-se citar a doença de Alzheimer (MOLLOY et al., 2007; DA COSTA et al., 2009; BÁRCENA-PADILLA et al., 2011). O limite tolerável para este metal é de  $2 \text{mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo (FAO/WHO, 2014).

A determinação de espécies metálicas em alimentos e bebidas vem sendo bastante estudada nos últimos anos, principalmente com os crescentes casos de contaminação de alimentos, principalmente por metais tóxicos. Na literatura podem ser encontrados estudos de determinação de espécies metálicas tóxicas em alimentos e bebidas como mel, gelatina, açúcar, leite, vegetais, vinho, entre outros (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; GARCÍA et al., 2003; GARCÍA et al., 2005a; 2005b; AJTONY et al., 2007; AJTONY et al., 2008; DOBROWOLSKI

et al., 2012). Nesse sentido, novas metodologias analíticas estão sendo desenvolvidas visando facilitar a quantificação de íons metálicos em gêneros alimentícios.

#### 2.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ALIMENTOS

Como já comentado, a presença de espécies metálicas em alimentos e bebidas é muito comum, e uma forma de avaliar a qualidade dessas matrizes é verificar a quantidade de metais presentes nas mesmas.

Normalmente, a determinação de espécies metálicas presentes em baixas concentrações em alimentos é realizada por técnicas espectrométricas de análise baseadas em absorção ou emissão atômica (POHL, 2009; BATISTA et al., 2012; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012). Nesse caso, ganham destaque a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS) e a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) (POHL et al., 2012a). As técnicas espectrométricas apresentam baixo custo, por exemplo quando comparadas a equipamentos de emissão com plasma – ICP OES e ICP-MS, alta sensibilidade e seletividade, além de fornecerem resultados precisos e exatos (POHL, 2012a; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012).

Geralmente, quando se realizam determinações de espécies metálicas em alimentos, utilizando AAS é necessário que a amostra sofra um tratamento que possa extrair o analito para soluções aquosas mais simples, para que o mesmo possa ser determinado (MENDES et al., 2006; POHL, 2009). Isso é necessário devido à complexidade da matriz alimentar, que possui muitos compostos orgânicos e demais substâncias interferentes.

Nesse sentido, a aplicação de procedimentos com altas temperaturas e o uso de reagentes oxidantes são necessários a fim de destruir a matéria orgânica presente na matriz de interesse. Para isso, geralmente, são utilizados procedimentos baseados na digestão por via seca e/ou por via úmida das amostras avaliadas.

Na digestão por via úmida são empregados ácidos, geralmente nítrico e sulfúrico, que podem ser combinados com outros reagentes oxidantes como, por exemplo, peróxido de hidrogênio, com a finalidade de destruir a matriz orgânica da amostra e extrair a espécie metálica de interesse (MENDES et al., 2006; SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010; BARIN et al., 2016). Brevemente, para este procedimento, a amostra com adição desses reagentes é aquecida em temperaturas brandas até sua decomposição total. O uso de temperaturas não muito elevadas é necessário para evitar perdas da solução e do analito. Esse

procedimento, na maioria das vezes, é realizado em béquer aberto, ou com refluxo, através do uso de vidro-relógio (o que garante menor contaminação e/ou perdas de amostra e analitos no procedimento), como pode ser observado em relatos na literatura (BORGES et al., 2014). O uso de tubos de vidro aquecidos em bloco digestor também é amplamente empregado para digestão de vários tipos de amostras (KHAN et al., 2014; FILHO et al., 2018).

Uma das alternativas para diminuir ainda mais a contaminação da amostra ou perdas dos elementos de interesse, é fechar o sistema de digestão. Sistemas fechados, vem sendo empregados para mineralização da amostra há muitos anos. Eles demonstram eficácia na digestão de diferentes amostras, a exemplo do método de Carius (proposto em 1860 por Georg Ludwig Carius), uso de frascos de PTFE pressurizados, etc. (BARIN et al., 2016). Ainda é possível adaptar frascos fechados em condições brandas de digestão. Um exemplo disso, é o uso de tubos criogênicos ou tubos tipo falcon, sendo que esse método é baseado na mineralização da amostra de interesse com uso de pequenos volumes de reagentes oxidantes ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etc.) e aquecimento brando (FILHO et al., 2018). Esse procedimento é muito pouco utilizado em processos de abertura de amostra, porém pode apresentar vantagens tais como rápida homogeneização da amostra, redução no volume de reagentes (frente a métodos tradicionais de abertura de amostra como a digestão em béquer), e redução do risco de contaminação da amostra ou perda do analito de interesse.

Outra forma eficaz de digerir uma amostra é empregando um sistema fechado com radiação de micro-ondas para aquecimento da mesma. Esse sistema começou a ser empregado no ano de 1975, ocorrendo um aumento exponencial de seu uso na década de 90 (DE MORAES et al., 2016). Neste caso, a radiação eletromagnética é absorvida e convertida em energia térmica, o que conduz ao aquecimento do meio reacional. Suas vantagens estão relacionadas com o aumento da velocidade das reações devido às altas temperaturas e pressões empregadas; redução da contaminação da amostra e perda dos analitos; e minimização do volume de reagentes empregados, frente ao método tradicional de abertura de amostra por via úmida (SANTELLI et al., 2006; DE MORAES et al., 2016). Esse tipo de procedimento vem sendo muito empregado para abertura de diferentes amostras, sejam elas alimentares, ambientais ou biológicas (KAYA, AKDENIZ e YAMAN, 2008; KORN et al., 2008; DE PAULA et al., 2012)

Posteriormente, em todos os casos, a solução ou resíduo da digestão é transferida para frasco volumétrico, o qual é aferido com água (geralmente ultrapura) até o volume desejado. As vantagens desses procedimentos estão relacionadas com a facilidade de manipulação e com

a utilização de curvas analíticas com padrão externo, o que facilita as determinações dos metais de interesse (SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010).

Já as digestões por via seca (ou por combustão) são realizadas, mais comumente, por procedimentos de calcinação, onde a amostra pode ser colocada em forno mufla empregando rampas de aquecimento que variam entre 100 a 600 °C, dependendo do elemento a ser analisado. Neste procedimento, a fração orgânica da amostra é carbonizada, restando apenas o resíduo inorgânico na forma de cinzas (FLORES et al., 2016). A escolha da temperatura de calcinação adequada ao analito é muito importante para evitar a perda do mesmo por volatilização. Neste sentido, esse procedimento acaba sendo mais empregado para a determinação de espécies metálicas, visto que não-metais são facilmente volatilizados (FLORES et al., 2016). Posteriormente, as cinzas obtidas são diluídas em soluções ácidas, podendo conter um ácido ou uma mistura de ácidos (POHL, 2009; SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010).

Para iogurte, na literatura podem ser encontrados trabalhos que contemplam o uso de procedimentos de digestão para mineralização da amostra e posterior determinação de metais na matriz.

Khan et al. (2014), avaliaram a concentração de micronutrientes e elementos traço em leite e iogurte por ICP-MS. Para digestão, 1 a 2 g de amostra foram colocadas em tubos de vidro com 25 mL de HNO<sub>3</sub> 70% (m/m) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (m/v). As amostras foram digeridas em bloco digestor, com aumento gradual da temperatura (50 a 160 °C). O tempo de digestão completa foi de 10 a 12 horas considerando a obtenção de soluções límpidas sem resíduos da amostra. Por fim, às soluções digeridas foram adicionados 7 mL de HNO<sub>3</sub> e aferiu-se o volume final com água ultrapura. Neste estudo, os autores conseguiram empregar um procedimento de digestão das amostras com recuperações acima de 92% para os metais avaliados. Além disso, foi possível quantificar elementos minoritários e elementos traço em leite e iogurte, sendo que neste último, metais tóxicos como Pb e Cd puderam ser quantificados em ambas matrizes. As concentrações destes metais em iogurte variaram de  $1,36 \pm 0,022$  (Cd) a  $24,50 \pm 0,034$  ng g<sup>-1</sup> (Pb).

Luis et al. (2015) verificaram a ingestão de metais a partir de iogurte, empregando ICP OES). A digestão foi realizada por via seca, sendo que 20 g de cada amostra de iogurte foram colocadas em cápsulas de porcelana, e foram dessecadas em forno a vácuo termorregulado a 70 °C, por 72 horas. A amostra foi então calcinada em forno mufla, aumentando-se a temperatura gradualmente, até 450 °C, e mantendo-se nesta condição por 48 horas. As cinzas resultantes

foram solubilizadas em  $\text{HNO}_3$  1,5% (v/v), e a solução foi aferida com água ultrapura até volume final de 25 mL. Neste caso, a exatidão do método foi avaliada utilizando material de referência certificado, sendo que as recuperações dos metais estudados foram maiores que 94,5%. Os autores conseguiram quantificar a maioria dos elementos em amostras de iogurte (com e sem sabor), sendo que dentre os micronutrientes, Zn apresentou as maiores concentrações (até  $3,10 \pm 0,85 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

No entanto, os procedimentos baseados em digestão por via seca ou por via úmida podem apresentar algumas desvantagens, como por exemplo: maior tempo de preparo das amostras (a decomposição da amostra pode levar horas); uso de grandes volumes de reagentes, os quais, na maioria das vezes, são de alto grau de pureza, o que aumenta também o custo da análise; e emprego de reagentes tóxicos e perigosos. Como observado nos estudos citados para mineralização do iogurte, a quantidade elevada de reagentes e o longo tempo de digestão, deixam a análise dispendiosa e morosa. Além disso, o maior tempo de preparo da amostra e as etapas de aquecimento envolvidas nos procedimentos, podem ter como consequência a perda do analito por volatilização ou mesmo a contaminação da amostra, o que pode influenciar toda a análise (MAGALHÃES et al., 1998; POHL, 2009; SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010; DE ANDRADE et al., 2014).

Com o intuito de diminuir a manipulação e o tempo de preparo das amostras, novas metodologias analíticas vêm sendo desenvolvidas. Uma dessas alternativas é o uso da amostragem em suspensão para a determinação direta (sem etapas de pré-tratamento de amostra) dos metais em diferentes matrizes alimentares e ambientais (DOBROWOLSKI et al., 2012; DE ANDRADE et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2018). As suspensões diferem das soluções aquosas, pois o tamanho da partícula dissolvida é geralmente grande e por esse motivo este tipo de dispersão, sob efeito da luz, torna-se opaca, devido ao espalhamento da luz causado pelas partículas. A amostragem em suspensão apresenta vantagens, pois reduz o tempo de preparo das amostras, minimiza problemas das radiações de fundo (se comparada a análise direta de sólidos), possibilita o uso de padrões aquosos na calibração e minimiza problemas de contaminação ou perda do analito (MAGALHÃES et al., 1998; ALVES et al., 2001; DOBROWOLSKI et al., 2012; NOMURA et al., 2016).

Um dos cuidados que devem ser tomados ao se trabalhar com amostragem em suspensão, é garantir a representatividade da amostra, levando-se em consideração a estabilidade e homogeneidade da suspensão (LAJUNEN e PERÄMÄKI, 2004; DAMIN, 2009; NOMURA et al., 2016). Nesse sentido, são comumente empregados agitadores mecânicos,

agitação ultrassônica, misturadores por efeito vórtex, agentes estabilizantes (Triton X-100, glicerol, emulsão antifoam B, trietanolamina), entre outros, a fim de garantir a homogeneidade das partículas em solução (NOMURA et al., 2016).

Considerando a natureza e características das amostras, a extração de elementos assistida por ultrassom ganha destaque, principalmente porque o processo proporciona a extração parcial ou total de muitos analitos da fase sólida para a fase líquida (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; KORN et al., 2016). A sonicação envolve a extração das espécies químicas de interesse em diversos tipos de matrizes e amostras, uma vez que o processo de cavitação (geração de microbolhas de gás no interior de uma solução) gera altas temperaturas pela ação mecânica entre partículas sólidas e líquidas, facilitando processos como a dissociação, fusão e lixiviação (MENDES et al., 2006; PAES, 2007; BENDICHO et al., 2012). Neste caso, devido à ação de microjatos, pode ocorrer a desagregação do material; podendo ocorrer ainda a diminuição do gradiente de concentração nas proximidades do material sólido, ou fusão do sólido devido às altas temperaturas geradas pelo colapso das bolhas de cavitação, como mencionado anteriormente (KORN et al., 2016). Na suspensão, a presença do material sólido leva a deformação das bolhas de cavitação. No entanto, essa deformação faz com que, no momento do colapso, os microjatos sejam direcionados para o material sólido, facilitando a agitação da suspensão (KORN et al., 2016).

Na literatura, são apresentados alguns trabalhos de determinação direta de metais em matrizes alimentares. Diversas espécies metálicas foram determinadas diretamente em alimentos como mel, iogurte, alimentos para bebê, leite, açúcar, gelatina, entre outros (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; VIÑAS et al., 2000; GARCÍA et al., 2003; POHL et al., 2010; DE ANDRADE et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2018).

No Brasil, alguns trabalhos utilizam a análise direta para a determinação de metais por técnicas espectrométricas. Trabalhos foram desenvolvidos utilizando a amostragem em suspensão aliada a GF AAS para determinação de metais em gelatina e mel, por exemplo (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; DE ANDRADE et al., 2014).

Para iogurte, são poucos os trabalhos que relatam o uso da amostragem em suspensão para determinação de metais por AAS. Brandão et al. (2010) e Brandão, Matos e Ferreira (2011) avaliaram a determinação direta de Zn, Ca e Mg em iogurte utilizando FAAS com fonte contínua de alta resolução. Isso demonstra a necessidade em desenvolver novas metodologias baseadas em análise direta de metais em iogurte aliada à AAS.

Tendo-se a avaliação da concentração total dos metais em consumíveis, é necessário verificar a segurança alimentar dos mesmos, avaliando-se a contribuição nutricional e possíveis efeitos tóxicos dos metais presentes nos alimentos para os seres vivos. Na quantificação total não são levadas em consideração as formas em que são encontrados os elementos. Sabe-se que os metais podem ser encontrados em alimentos na forma livre (na forma de íon) – em diferentes estados de oxidação – ou complexados. A adição de agentes quelantes/complexantes em alimentos é muito comum, principalmente para retenção de metais, prevenindo ações indesejadas dos mesmos no organismo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Caso esses íons ou complexos metálicos sejam solúveis no trato gastrointestinal, a absorção intestinal torna-se possível, e dependendo do metal, podem causar efeitos tóxicos aos seres vivos. Casos os metais, principalmente os complexados, estejam fortemente ligados aos quelatos, ou esses sejam insolúveis, eles não podem ser absorvidos pelo organismo, sendo assim excretados (BOSSO e ENZWEILER, 2008; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Isso demonstra que nem sempre a quantidade de metais presentes nos alimentos está biodisponível no organismo, ou seja, nem toda a quantidade de metais ingerida na alimentação é realmente absorvida pelo organismo (VERSANTVOORT et al., 2005; BRANDON et al., 2006). Nesse sentido, faz-se necessário avaliar a bioacessibilidade dos íons metálicos no organismo dos seres vivos.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE ÍONS METÁLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES

Como se sabe, os alimentos e bebidas são umas das principais fontes de ingestão de metais para a dieta dos seres vivos. No entanto, a quantidade ingerida de metais não está relacionada com a quantidade realmente absorvida pelo organismo humano, visto que a interação destes com o alimento ou com as enzimas do processo de digestão podem modificar sua biodisponibilidade.

É importante definir de uma forma mais geral o termo biodisponibilidade como uma fração da concentração total de um elemento presente em algum compartimento ambiental ou alimento específico que pode estar ou pode ficar disponível para absorção ou ingestão pelos seres vivos (PEIJNENBURG e JAGER, 2003; BATLEY et al., 2004). Essa biodisponibilidade vai depender, entre outros fatores, da especiação (forma química que metal se encontra - íon livre ou complexado) e interação das espécies de interesse com a matriz.

Em termos de ingestão oral de espécies metálicas por seres vivos, bioacessibilidade é definida como a fração de um composto, no caso íons metálicos, que após a ingestão, deixa a matriz alimentar e é lançado no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para a absorção intestinal (INTAWONGSE e DEAN, 2006; MACHADO, CESIO E PISTÓN, 2017; ABOLLINO et al., 2018). Esta fração é considerada como um representativo da quantidade máxima de um composto ou substância disponível para absorção intestinal em seres vivos (PEIJNENBURG e JAGER, 2003). Já em relação a fração de íons metálicos que atinge a corrente sanguínea a partir do trato gastrointestinal, ou seja, aquela fração que realmente é absorvida pelo organismo, essa pode ser associada a fração biodisponível dos íons metálicos ingeridos (BOSSO e ENZWEILER, 2008). A bioacessibilidade e a biodisponibilidade de íons metálicos dependem de vários processos como digestão, absorção, transporte, utilização e eliminação dos elementos ingeridos (DOMÍNGUEZ-GONZÁLES et al., 2010).

A biodisponibilidade pode ser avaliada *in vivo* pela quantificação das espécies metálicas de interesse presentes no sangue, em tecidos, órgãos, pelos e ossos de cobaias (geralmente ratos, coelhos e porcos) (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Os testes *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade de elementos são considerados confiáveis, porém demandam por profissionais especializados e com infra-estrutura específica, muitas vezes indisponíveis para pesquisas. Além disso, possuem alto custo e demandam de um longo tempo de pesquisa (BOSSO e ENZWEILER, 2008; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; SOUZA et al., 2018). Esses aspectos estimularam a busca por métodos alternativos, baseados em metodologias simplificadas e eficazes, através de ensaios laboratoriais *in vitro*.

A bioacessibilidade pode ser avaliada por uma simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, onde são simuladas as etapas de digestão que ocorrem no estômago com suco gástrico e no intestino delgado com suco intestinal (KHOUZAM, POHL e LOBINSKI, 2011; MACHADO, CESIO E PISTÓN, 2017). O suco gástrico é constituído basicamente de ácido clorídrico que permite a dissolução de óxidos, sulfitos e carbonatos de metais lábeis, e enzimas que auxiliam na quebra de proteínas e na dissolução das amostras (INTAWONGSE e DEAN, 2006). Já o suco intestinal é constituído por enzimas, sais de bÍlis e bicarbonato, que produzem um efeito necessário para a quebra de polissacarÍdeos, proteínas e gorduras, fazendo com que estes (assim como as espécies metálicas) se tornem mais suscetÍveis a absorção (INTAWONGSE e DEAN, 2006). Por fim, a fração do elemento disponível para absorção pode ser quantificada (VERSANTVOORT et al., 2005; INTAWONGSE e DEAN, 2006; BOSSO e ENZWEILER, 2008; POHL et al.; 2012b). A bioacessibilidade *in vitro* pode ser considerada

uma alternativa rápida e de baixo custo em relação aos ensaios de biodisponibilidade *in vivo* (HENDERSON et al., 2014; SOUZA et al., 2018).

No entanto, durante o procedimento de bioacessibilidade, alguns aspectos devem ser levados em consideração a fim de manter a maior similaridade possível com o processo de digestão humana (INTAWONGSE e DEAN, 2006):

- i. A temperatura utilizada no procedimento deve ser de 37 °C, que é a temperatura normal do corpo humano.
- ii. É necessário utilizar alguma forma de agitação para simular a mistura gastrointestinal, a qual deve ser mantida por um período de 1 a 4 (ou 5) horas em cada etapa do processo de digestão.
- iii. Apesar da digestão de alimentos iniciar pela boca, muitos estudos não demonstram a importância em simular o procedimento a partir deste compartimento. Isso ocorre porque o pH da saliva é próximo ao neutro, o que acaba não influenciando na dissolução dos metais e outros componentes dos alimentos. Na maioria das vezes as extrações são realizadas apenas com a adição do suco gástrico e suco intestinal.
- iv. A principal enzima envolvida no processo gástrico é a pepsina (1,25 a 10 mg mL<sup>-1</sup>). Para os devidos fins, ela é preparada em solução de HCl (pH entre 1,1 a 4). Na etapa intestinal, a composição principal do suco é feita com pancreatina e sais biliares, sendo que o pH do meio é mantido entre 5 e 8.
- v. Antes da quantificação dos elementos de interesse, é necessário separar os metais lançados em cada etapa da digestão simulada. Para isso são utilizados os procedimentos de centrifugação, filtração e/ou diálise, sendo que cada um deve ser utilizado e abordado da maneira mais adequada para a proposta de trabalho.
- vi. Por fim, as frações solúveis dos metais são quantificadas por técnicas analíticas de absorção e emissão atômica.

Uma série de diferentes modelos *in vitro* levam em consideração as variáveis associadas à simulação do sistema digestivo humano, incluindo a boca e os compartimentos gástrico e intestinal. Cada abordagem é apropriada para o propósito específico do trabalho a ser desenvolvido: contaminantes avaliados, matriz, objetivo da triagem, entre outros. Alguns modelos relatados na literatura são: teste de extração baseado na fisiologia (PBET - physiologically-based extraction test) (RUBY et al., 1996); método gastrointestinal *in vitro* (IVG - *in vitro* gastrointestinal method); Instituto Nacional Holandês de Saúde Pública e Método de meio ambiente (RIVM - Dutch National Institute for Public Health and the Environment method); entre outros. Esses métodos são considerados simples, rápidos, de baixo

custo e fáceis de controlar (TOKALIOĞLU et al., 2014). Além disso, esses procedimentos levam em consideração as fases gástricas e intestinal do sistema digestivo. Alguns estudos ainda se utilizam do balanço de massa para obter um controle de qualidade do procedimento de bioacessibilidade e ter uma estimativa mais precisa da biodisponibilidade dos íons metálicos. Esses cálculos são feitos com base no conteúdo total do elemento e na soma das frações bioacessíveis e residuais para cada nutriente individual (HERRERA-AGUDELO, MIRÓ E ARRUDA, 2017).

Na literatura existem inúmeros procedimentos relatando a bioacessibilidade de íons metálicos a partir de diferentes matrizes alimentares. A Tabela 2.1 apresenta alguns destes procedimentos disponíveis na literatura.

**Tabela 2.1.** Diferentes procedimentos relatados na literatura para bioacessibilidade de metais a partir de alimentos

Analito	Matriz	Técnica analítica	Condições de extração	Resultados	Referência
Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	Mel	FAAS	2,5 g de mel + 10 mL de suco gástrico (3,2 g L <sup>-1</sup> de pepsina, 2,0 g L <sup>-1</sup> de NaCl e 0,08 mol L <sup>-1</sup> de HCl) (37 °C, 2 horas) + 10 mL de suco intestinal (10,0 g L <sup>-1</sup> de pancreatina, 12,5 g L <sup>-1</sup> de sais de biliar e 0,07 g L <sup>-1</sup> de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> em NaOH 0,02 mol L <sup>-1</sup> ) + (37 °C, 2 horas).	Bioacessibilidade de 80 a 100% de todos os metais determinados, o que indica que a biodisponibilidade dos mesmos pode ser alta também.	POHL et al., 2012b
Fe, Zn, Cu e Mn	Alimentos para bebês	ICP-MS	6 mL de saliva para 3 g de amostra (37 °C, 5 min) + 12 mL de suco gástrico (37 °C, 2 horas, 55 rpm) + 12 mL de suco duodenal + 6 mL de bile + 2 mL de NaHCO <sub>3</sub> (37 °C, 2 horas, 55 rpm).	Fração bioacessível de metais variou entre as amostras, sendo que nenhum metal apresentou bioacessibilidade total a partir dos alimentos.	DA SILVA et al., 2013
Cu, Fe, Mn e Zn	Sementes de Soja	ICP OES	Método BARGE - 300 mg de semente pulverizada + 4,5 mL de saliva + agitação manual por 10 s + 6,75 mL de suco gástrico + (37 °C, 1 hora, 7 g) + 13,5 mL de suco duodenal + 4,5 mL de fluidos biliares (37 °C, 4 horas, 7 g)	A fase gástrica apresentou maior bioacessibilidade de micronutrientes do que a fase intestinal, sendo que foram observadas diferenças entre sojas transgênicas e não-transgênicas.	HERRERA-AGUDELO, MIRÓ E ARRUDA, 2017
As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn	Alcachofra	FAAS e ET AAS	0,5 g de amostra + 5 mL da solução gástrica (3 g L <sup>-1</sup> de pepsina e HCl 0,12 mol L <sup>-1</sup> ) e agitada em vortex por 2 min (banho-maria a 37 °C, 2 horas) + 5 mL de suco intestinal (2 g L <sup>-1</sup> de sais biliares, 5 g L <sup>-1</sup> de pancreatina e 0,016 mol L <sup>-1</sup> de NaOH) e agitada em vortex por 2 min (banho-maria a 37 °C, 2 horas)	Alta bioacessibilidade de Cu a partir do vegetal, demonstrando que a contribuição nutricional do alimento é muito significativa com relação a ingestão diária recomendada (IDR) do metal.	MACHADO, CESIO E PISTÓN, 2017

Apesar de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade terem aumentado nos últimos anos, na literatura brasileira os dados para estes testes são escassos. No Brasil, podem ser encontrados estudos de bioacessibilidade que ainda estão sendo realizados em matrizes como vegetais; sementes de linhaça, gergelim, soja, leite; chás; alimentos infantis; entre outros. (FIOROTO, et al., 2013; JÚNIOR e DANTAS, 2013; DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2015; SOUZA, 2015; DOS SANTOS, 2016; HERRERA-AGUDELO, MIRÓ E ARRUDA, 2017).

Devido à grande diversidade de alimentos e bebidas existentes no país torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que contemplem a avaliação da concentração total e principalmente da bioacessibilidade de íons metálicos a fim de prover mais informações sobre a atuação dos mesmos no organismo dos seres vivos.

Portanto, neste trabalho buscou-se verificar a presença de metais em diferentes amostras de iogurte, empregando amostragem em suspensão, e na bebida proveniente do chá-mate, ambos comercializados no estado do Paraná, bem como avaliar a porcentagem de ingestão destes metais após digestão enzimática das matrizes de interesse. Vale ressaltar que estudos em relação a concentração total (utilizando a amostragem em suspensão para preparo de amostra e avaliação do chá na forma de bebida para consumo) e a fração bioacessível de metais nestes alimentos e bebidas são escassos. Isso pode auxiliar na obtenção de maiores informações destes produtos, relacionados principalmente, com a qualidade e segurança alimentar dos mesmos.

Como as matrizes avaliadas neste estudo são distintas e apresentam complexidades diferentes em relação ao preparo de amostra e quantificação de metais, a parte experimental e resultados e discussão para iogurte e chá-mate, em relação a concentração total e as frações bioacessíveis, são apresentados em capítulos distintos.

### CAPÍTULO 3

#### **IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS E DAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS DE ÍONS METÁLICOS EM IOGURTE**

O iogurte é um produto fermentado, que possui uma composição similar ao leite, no entanto, com uma maior quantidade de compostos orgânicos, tais como proteínas, vitaminas, lipídeos, além de minerais (BRANDÃO et al., 2010; WANG et al., 2013). Sendo assim, o iogurte pode ser considerado uma boa fonte de nutrientes e minerais na dieta humana, além de ser amplamente consumido pela população mundial, principalmente crianças e idosos (HEKMAT e MCMAHON, 1997; BRANDÃO et al., 2010; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012). Esse elevado consumo de iogurte pode estar relacionado ao fato deste alimento ser encontrado em diferentes sabores, texturas, consistência e incrementos (pedaços de frutas, cereais, entre outros) (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012; LUIS et al., 2015). Em alguns casos, minerais e outros nutrientes são adicionados em alimentos como o iogurte para minimizar a deficiência dos mesmos, intensificando assim, sua ação no organismo humano (WATZKE, 1998; SARACOGLU et al., 2007).

A determinação de metais em matrizes complexas como o iogurte, não é uma tarefa trivial, sendo necessário destruir a matriz orgânica do alimento, através de procedimentos de digestão por via seca ou por via úmida (KORN et al., 2008). Devido aos altos volumes de reagentes e às altas temperaturas utilizadas nestes procedimentos, podem haver perdas dos analitos de interesse ou contaminação da amostra e por isso, métodos alternativos como a amostragem em suspensão vêm sendo estudados (SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010; DE ANDRADE et al., 2018). Para iogurte, são poucos os trabalhos que relatam o uso desse tipo de procedimento e abrangem apenas macro e micronutrientes (BRANDÃO et al., 2010; BRANDÃO, MATOS e FERREIRA, 2011). Neste sentido, a viabilidade do uso das suspensões na determinação de metais traço é de grande importância para manter o controle de qualidade deste tipo de alimento de alto consumo populacional. No entanto, a determinação do teor total de íons metálicos em alimentos não é suficiente para avaliar a potencialidade nutricional ou tóxica dos mesmos. Para isso é necessário avaliar a bioacessibilidade dos elementos presentes no iogurte, para assim verificar quanto desses metais pode realmente ser absorvido pelo organismo vivo.

Por isso, neste capítulo serão abordados o uso da amostragem em suspensão na determinação de metais em iogurte e a avaliação da bioacessibilidade *in vitro* dos mesmos a partir desta matriz alimentar.

### 3.1 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1.1 Procedimentos de Técnicas Limpas, Reagentes e Instrumentação para a Determinação de Íons Metálicos em Iogurte

Todos os reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico. Procedimentos de técnicas limpas foram adotados para minimizar possíveis contaminações ou adulterações de soluções e amostras (CAMPOS, BENDO e VIEL, 2002; DOS ANJOS, 2006; DE ANDRADE et al., 2014). De modo geral, os materiais utilizados foram previamente lavados com detergente comercial neutro, escova, água corrente e água destilada. Posteriormente, os materiais foram mantidos em banho de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v), por um tempo mínimo de 24 horas, e após esse período foram enxaguados com água purificada. Por fim, os materiais foram secos e armazenados em sacos plásticos (DE ANDRADE, 2013).

Durante os ensaios experimentais, a manipulação de reagentes, amostras e materiais foi realizada com o auxílio de luvas de procedimento sem talco, em bandejas e/ou bancadas previamente descontaminadas com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mol L<sup>-1</sup> e álcool (70% v/v).

Para as vidrarias utilizadas no preparo de suspensões de iogurte foi necessária uma limpeza com solução de KOH 5% (m/v) em meio de etanol, a fim de retirar resíduos de gordura provenientes da amostra. Inicialmente, as vidrarias foram limpas com detergente e deixadas em banho com a solução alcóolica por um período de 12 horas. Posteriormente, as vidrarias foram novamente lavadas com detergente e deixadas em banho de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) por um período mínimo de 24 horas.

Para preparar todas as soluções utilizadas nos experimentos de determinação de metais em iogurte, foi utilizada água ultrapura (TKA-GenPure - Thermo Scientific, Alemanha - e Millipore – SIMPAKKR1). As soluções padrão de trabalho de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd foram preparadas por diluição de soluções padrão estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Biotec, Brasil). Ácido nítrico (Carlo Erba, 65% m/m), ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, 37% m/m) e peróxido de hidrogênio (Biotec, 30% m/m), também foram utilizados no preparo de amostras.

As determinações de Pb, Cd, Cu e Cr foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) (Varian, AA 240Z), equipado com corretor Zeeman para correção de fundo e atomizador GTA 120 conectado a um auto-amostrador PSD 120. Argônio foi empregado como gás inerte com vazão de 0,3 L min<sup>-1</sup>. Tubos de grafite pirolíticos foram empregados na determinação dos metais traço.

As determinações de Zn foram realizadas em Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS) (Varian, SpectraA 220), sendo empregada uma chama ar-acetileno (oxidante) com vazões de 11 e 2 L min<sup>-1</sup> de ar e de acetileno, respectivamente. As medidas foram realizadas considerando a integração do sinal de absorbância, sendo que o tempo de leitura para cada replicata de uma mesma amostra foi de 2 s.

Em todo o estudo foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (Varian e Photron). Foi empregada uma lâmpada multielementar operando a 213,9 nm, com uma corrente de 5 mA e uma largura da fenda de 1 nm para Zn e 324,8 nm, com corrente de 4 mA e largura de fenda de 0,5 nm para Cu. Outra lâmpada operando a 357,9 nm, com uma corrente de 7 mA e uma largura de fenda de 0,2 nm, foi utilizada para o Cr. E por último, utilizou-se uma lâmpada multielementar para Pb, operando em 283,3 nm, com uma corrente de 10 mA e largura de fenda de 0,5 nm, e para Cd, operando em 228,8 nm, com corrente de 4 mA e largura de fenda de 0,5 nm.

Um banho ultrassom (Unique, modelo USC 2800, 40 kHz), placa de aquecimento (Fisatom, modelo 753A), estufa (Odontobras) e mufla (Quimis) também foram utilizados no preparo das amostras.

### 3.1.2 Amostras de Iogurte

Amostras de iogurte foram adquiridas em supermercados da cidade de Guarapuava – PR, mantendo-se como critério, para otimização e validação das metodologias de determinação direta de metais na matriz de interesse, o uso de iogurte da mesma marca. Durante todo o estudo foram utilizadas amostras de iogurte natural, sem sabor e integral (mais comum entre as diferentes marcas disponíveis no comércio). As amostras foram mantidas em freezer (0 - 4 °C) e em frascos plásticos fechados até a realização das análises.

### 3.1.3 Procedimentos Analíticos

#### 3.1.3.1 Avaliação de diferentes procedimentos para preparo da amostra e determinação de Cu e Zn em iogurte

Em busca de métodos mais rápidos e de baixo custo para tratamento da amostra de iogurte e posterior determinação de íons metálicos na matriz, quatro procedimentos de preparo de amostra foram avaliados: digestão por via úmida com refluxo em béquer (DU-B); digestão por via úmida em tubo criogênico (DU-TC); digestão por via seca (DS); e amostragem em suspensão (AS). Os procedimentos avaliados foram testados considerando-se o que vem sendo reportado pela literatura para a matriz em questão, tanto em relação aos métodos tradicionais de digestão de amostra por via úmida (adaptado de BRANDÃO et al., 2010) e por via seca (ZENEBO, PASCUET e TIGLEA, 2008) quanto à amostragem em suspensão (BRANDÃO et al., 2010). Cu e Zn foram escolhidos como metais modelo para condução destes experimentos, visto que trabalhos reportados na literatura já contemplam a determinação destes metais na matriz. Todos os procedimentos foram realizados com soluções (10 mL) constituídas de 0,4 g de iogurte enriquecidas com Cu e Zn ( $50 \mu\text{g g}^{-1}$ ). As condições para preparo da amostra são apresentadas na Tabela 3.1.

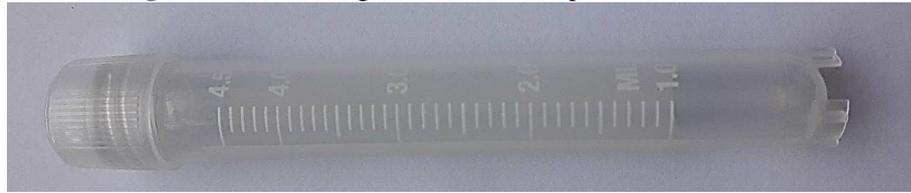
**Tabela 3.1.** Avaliação de diferentes métodos para preparo da amostra de iogurte ( $40,0 \text{ g L}^{-1}$  enriquecidas com Cu/Zn ( $50 \mu\text{g g}^{-1}$ ))

Método <sup>a</sup>	Condições de preparo de amostra	Tempo de preparo (min)
DU-B <sup>b</sup>	$\text{HNO}_3$ ( $1,7 \text{ mol L}^{-1}$ ) + $\text{H}_2\text{O}_2$ (2,4%) + aquecimento em banho de areia ( $85 \text{ }^\circ\text{C}$ )	120
DU-TC <sup>b</sup>	$\text{HNO}_3$ ( $1,7 \text{ mol L}^{-1}$ ) + $\text{H}_2\text{O}_2$ (2,4%) + aquecimento em banho de areia ( $85 \text{ }^\circ\text{C}$ )	60
DS	Secagem em estufa (210 min); secagem em banho-maria (160 min); secagem em chapa de aquecimento (150 min); carbonização em bico de Bunsen e calcinação em mufla (180 min) + 3 mL de $\text{HNO}_3$ ( $7 \text{ mol L}^{-1}$ )	700
AS	$\text{HNO}_3$ ou $\text{HCl}$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) + extração assistida por ultrassom	20

<sup>a</sup>DU-B: digestão por via úmida em béquer; DU-TC: digestão por via úmida em tubo criogênico; DS: digestão por via seca; AS: amostragem em suspensão

<sup>b</sup>Os volumes de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizados na digestão da amostra de iogurte foram 1,2 e 0,8 mL, respectivamente (considerando um volume final de 10 mL de solução)

A Figura 3.1 mostra o tubo criogênico utilizado no procedimento de DU-TC.

**Figura 3.1.** Tubo criogênico utilizado no procedimento DU-TC

**Fonte:** A autora.

As determinações de Cu e Zn foram conduzidas por FAAS. Posteriormente, para as metodologias que apresentaram melhores resultados, foi aplicado um planejamento fatorial para verificar as condições ótimas de preparo de amostra.

### 3.1.3.2 Planejamento fatorial para determinação de Cu e Zn em iogurte

Um planejamento de experimentos foi realizado para a digestão da amostra de iogurte em tubo criogênico (DU-TC) e para a amostragem em suspensão (AS). Isso foi necessário a fim de encontrar as melhores condições experimentais para a determinação de Cu e Zn nesta matriz.

Para DU-TC foi realizado um planejamento com três fatores ( $2^3$ ) com ponto central em triplicata. Os fatores avaliados nesse caso foram: concentração de  $\text{HNO}_3$ , concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e tempo de digestão. Os níveis avaliados no planejamento fatorial são mostrados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial  $2^3$  para DU-TC

Níveis	$\text{HNO}_3$ (mol L <sup>-1</sup> )	$\text{H}_2\text{O}_2$ (%)	t (min)
Superior (+1)	2,3	3,0	120
Inferior (-1)	1,0	1,8	60
Ponto Central (0)	1,7	2,4	90

Para AS, realizou-se um planejamento com dois fatores ( $2^2$ ) em duplicata, e com ponto central em triplicata. Os fatores avaliados neste caso foram a concentração de HCl e tempo de extração assistida por ultrassom. Os níveis avaliados neste planejamento fatorial são mostrados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial  $2^2$  para AS

Níveis	HCl (mol L <sup>-1</sup> )	t (min)
Superior (+1)	0,2	5
Inferior (-1)	0	1
Ponto Central (0)	0,1	3

Valores de concentração e porcentagem de recuperação de Cu e Zn em iogurte foram usados para avaliar as melhores condições experimentais. Os efeitos dos fatores sobre a resposta para cada experimento foram avaliados pela aplicação de testes estatísticos, em um nível de confiança de 95%. Neste caso, testes como ANOVA, *teste t* e gráfico de Pareto, foram utilizados para verificar a significância dos efeitos para os planejamentos experimentais estudados. Para isso foi utilizado o software estatístico Action (free software, 2014).

### 3.1.3.3 Otimização de metodologias analíticas para determinação de Cr, Cu, Pb e Cd em suspensão de iogurte por GF AAS

Para Cr e Cu, testes de quantificação em iogurte por GF AAS foram conduzidos em suspensão de iogurte ( $40,0 \text{ g L}^{-1}$ ) preparadas com  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl e assistida por ultrassom (1 min).

Para Pb e Cd, no preparo das suspensões de iogurte ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ), concentrações de 0,2 e  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  foram testadas a fim de verificar a melhor condição para determinação dos íons metálicos na matriz.

Para todos os metais foram injetados  $20 \mu\text{L}$  da suspensão de iogurte no tubo de grafite para posterior análise por GF AAS.

Para avaliar os sinais de absorvância e diminuir a interferência do sinal de fundo (background - BG) nas análises por GF AAS, foi realizada a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite. As suspensões de iogurte, utilizadas nesses procedimentos, foram enriquecidas com 12,5; 125,0; 250,0; e  $500,0 \text{ ng g}^{-1}$  (0,5; 5; 10; e  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de Cd, Cu, Cr e Pb, respectivamente, na ausência de modificador químico. O programa de aquecimento também foi otimizado para soluções aquosas dos padrões metálicos, sendo que neste caso os metais - Pb, Cd, Cr e Cu - estavam presentes nas mesmas concentrações utilizadas nas suspensões de iogurte.

### 3.1.4 Validação *In-house* das Metodologias Analíticas Desenvolvidas para a Determinação de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Iogurte por AAS

O estudo de validação foi realizado utilizando-se parâmetros como linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (AOAC, 2012).

Para investigar a interferência da matriz orgânica do iogurte nas determinações dos íons metálicos, as curvas analíticas foram obtidas de duas formas diferentes: em soluções aquosas –

padrão externo (PE), e em matriz de iogurte – adição de padrão (AP). Para cada metal foram avaliadas diferentes faixas de concentração, visando possíveis níveis de concentração do metal na matriz de interesse: Zn (0,2 a 1,6 mg L<sup>-1</sup>), Cd (0,2 a 1,0 µg L<sup>-1</sup>), Pb (1,0 a 40,0 µg L<sup>-1</sup>), Cu (1,0 a 17,0 µg L<sup>-1</sup>) e Cr (2,0 a 20,0 µg L<sup>-1</sup>).

A linearidade das curvas analíticas foi investigada por meio de regressão linear com análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste em um nível de 95% de confiança, utilizando o software estatístico Action.

Os valores de LOD e LOQ para cada metal foram calculados por meio das relações:

$$3 \times SD/m \text{ e } 10 \times SD/m, \text{ respectivamente} \quad \text{Equações (1 e 2)}$$

sendo  $m$  a inclinação da curva analítica (de menor faixa de concentração) e  $SD$  o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (HNO<sub>3</sub> ou HCl em meio aquoso, considerando as concentrações usadas no preparo das suspensões de iogurte para cada metal estudado) (RIBANI et al., 2004; ARAÚJO, 2009; DE ANDRADE et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2018).

Os testes de repetitividade foram realizados com suspensões de iogurte preparadas em triplicata e enriquecidas com 12,5; 100,0; 125,0; e 250,0 ng g<sup>-1</sup> (0,5; 4; 5; e 10 µg L<sup>-1</sup>) de Cd, Cu, Cr, e Pb, respectivamente. A adição dos elementos à suspensão foi realizada para melhorar o sinal analítico apresentado pelos mesmos. Para Zn não foi necessário enriquecer a amostra de iogurte, utilizando-se como sinal a quantidade original do metal na amostra. Estas amostras foram analisadas por AAS no mesmo dia.

No teste de precisão intermediária, as amostras de iogurte foram preparadas da mesma forma que para os testes de repetitividade e analisadas por AAS durante cinco dias consecutivos. Os resultados para a precisão dos métodos desenvolvidos foram expressos com relação ao desvio padrão relativo (RSD), desvio padrão relativo (RSD<sub>r</sub> – repetitividade e RSD<sub>PI</sub> – precisão intermediária) obtido pela ANOVA e o valor de Horrat (JAIN e ARNOLD, 2007; GONZÁLEZ, HERRADOR e ASUERO, 2010; AOAC, 2012). Estes desvios foram calculados como uma forma de verificar a confiabilidade da precisão intermediária estimada pela metodologia proposta.

O RSD foi calculado através da equação:

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

sendo  $s$  a estimativa de desvio padrão das replicatas e  $\bar{x}$  a média das replicatas realizadas.

O RSD obtido pela ANOVA (RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>PI</sub>), pode ser calculado pelas equações:

$$RSD_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

$$RSD_{PI} = \frac{s_{PI}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

sendo  $s_r$  o desvio padrão para repetitividade e  $s_{PI}$  o desvio padrão para precisão intermediária.  $\bar{x}$  é a média global da concentração do íon metálico de interesse determinado na precisão.

O valor de Horrat é dado pela equação:

$$\text{Horrat} = \frac{RSD_{Pi}}{RSD_H} \quad \text{Equação (6)}$$

sendo  $RSD_{Pi}$  o desvio padrão relativo para análises em dias diferentes, e  $RSD_H$  o desvio padrão relativo predito que é dado pela Equação 7:

$$RSD_H \% = 2C^{-0,15} \quad \text{Equação (7)}$$

sendo  $C$  a concentração do analito (em gramas) adicionado na amostra para o teste de precisão (JAIN E ARNOLD, 2007).

No cálculo do valor Horrat foi utilizado o software Gnumeric (Free statistics, 2012).

A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação com as amostras de iogurte enriquecidas em diferentes níveis de fortificação para cada elemento de interesse: 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  (1  $\text{mg L}^{-1}$ ) de Zn, 100 e 300  $\text{ng g}^{-1}$  (4 e 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Cu, 125 e 375  $\text{ng g}^{-1}$  (5 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Pb, 25 e 125  $\text{ng g}^{-1}$  (1 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Cr, 7,5 e 17,5  $\text{ng g}^{-1}$  (0,3 e 0,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Cd. Neste caso, a adição da solução de padrão metálico é feita antes do preparo da suspensão (diretamente na amostra), ficando previamente, por um tempo, em contato com o iogurte, para que posteriormente ele possa ser dispersado em meio ácido.

Os resultados de recuperação para os metais em iogurte foram obtidos considerando a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_F - C_I) \times 100 / C_A \quad \text{Equação (8)}$$

sendo  $C_F$  = a concentração da amostra fortificada;  $C_I$  = a concentração da amostra não fortificada; e  $C_A$  = a concentração do analito adicionado à amostra (AOAC, 2012).

Para verificar a significância estatística dos valores de recuperação foi aplicado um teste- $t$  em um nível de 95% de confiança, que foi calculado pela equação:

$$t = (\text{valor recuperado} - 100) \times (n - 1)^{1/2} / \text{SD} \quad \text{Equação (9)}$$

sendo  $n$  o número de medidas realizadas e  $SD$  o desvio padrão das replicatas.

### 3.1.5 Implantação de Métodos Analíticos para Avaliação da Bioacessibilidade *In Vitro* de Íons Metálicos em Iogurte

#### 3.1.5.1 Reagentes e Instrumentação

As soluções padrão de íons metálicos foram preparadas por diluição de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Biotec, Brasil). No preparo das soluções utilizadas nos experimentos foi utilizada água ultrapura – 0,06 µS cm<sup>-1</sup> (Millipore, SIMPAKKR1). No preparo dos sucos gástrico e intestinal foram utilizados pepsina de mucosa gástrica de suínos (≥ 250 unidades/mg), pancreatina de pâncreas de suínos (adequado para a cultura de células, 4 × especificações USP) e sais biliares, todas adquiridas da Sigma-Aldrich. Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, 37% m/m), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Biotec), cloreto de sódio (NaCl) (Merck), fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Biotec) e hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec), também foram utilizados no preparo de amostras.

Lavadora ultrassônica (Unique, modelo USC-2800A, 40 kHz), placa de aquecimento (SPLabor), estufa (Nova Técnica, modelo NT 511), incubadora Shaker (SPLabor, modelo SP222 e Tecnal, modelo TE-420), pHmetro (Metrohm, modelo 827 pH Lab) e uma ultracentrífuga (Hitachi – Himac CR21GII) também foram utilizados no preparo das amostras.

As determinações de Cr e Zn foram realizadas por GF AAS e FAAS, respectivamente, conforme descrito no item 3.1.1.

#### 3.1.5.2 Amostras

Para os testes iniciais de determinação da fração bioacessível de íons metálicos em amostras alimentares, foram utilizadas amostras de iogurte natural, integral e sem sabor adquiridas de supermercados da cidade de Ponta Grossa – PR. As amostras foram mantidas em freezer (0 - 4 °C) e em frascos plásticos fechados até a realização das análises.

#### 3.1.5.3 Avaliação de procedimentos analíticos para determinação da bioacessibilidade *in vitro* de Cu, Cr e Zn em iogurte

Inicialmente foram avaliados três procedimentos para determinação de frações bioacessíveis de íons metálicos em alimentos, conforme relatado na literatura (BERMEJO et al., 2002; POHL et al., 2012b; STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014). Zn, Cu e Cr foram avaliados primeiramente devido às menores interferências observadas nas determinações dos mesmos nas frações bioacessíveis das matrizes de interesse.

Para o procedimento 1 (P1) (adaptado de BERMEJO et al., 2002), 666,7 g L<sup>-1</sup> de iogurte foram colocados em tubos de polipropileno (tubos Falcon) com capacidade de 50 mL. O pH do meio foi ajustado a 2 (considerando o organismo de um adulto) com HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, 0,5 mL de suco gástrico (pepsina (0,2 mg mL<sup>-1</sup>) dissolvida em HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>)) foi adicionado à matriz. As soluções resultantes foram levadas para incubação e agitação a 37 °C, 100 rpm, por 50 min. Após esse período, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo com o objetivo de parar a digestão enzimática. As soluções obtidas foram neutralizadas (pH = 7) com adição de NaHCO<sub>3</sub> (1,5 mol L<sup>-1</sup>). Posteriormente, 0,5 mL de suco intestinal (pancreatina (0,15 mg mL<sup>-1</sup>) dissolvida em NaHCO<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>)) foi adicionado às soluções resultantes. Estas por sua vez, foram levadas novamente a incubação a 37 °C, 100 rpm, por 30 min. Por fim, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Para análise da fração bioacessível, as soluções foram centrifugadas a 4 °C (para evitar a ativação das enzimas), 10000 rpm, por 20 min. O sobrenadante foi analisado por AAS para quantificação dos metais de interesse.

Para o procedimento 2 (P2) (adaptado de STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014), 500 g L<sup>-1</sup> de iogurte foram colocados em tubo de polipropileno. Posteriormente, 2,5 mL de suco gástrico (pepsina (0,2 g L<sup>-1</sup>) dissolvida em HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>)) foi adicionado à matriz. As soluções resultantes foram levadas para incubação a 37 °C, 150 rpm, por 2 horas. Após esse período, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo, sendo posteriormente neutralizadas (pH = 7) com adição de NaHCO<sub>3</sub> (1,5 mol L<sup>-1</sup>). Posteriormente, 2,5 mL de suco intestinal (pancreatina (0,15 g L<sup>-1</sup>) e sais biliares (1,5 g L<sup>-1</sup>) dissolvidos em NaHCO<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>)) foram adicionados às soluções resultantes. Estas por sua vez, foram levadas novamente a incubação a 37 °C, 150 rpm, por 2 horas. Por fim, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Para análise da fração bioacessível, as soluções foram centrifugadas a 4 °C, 10000 rpm, por 20 min.

Para o procedimento 3 (P3) (adaptado de POHL et al., 2012b) 500 g L<sup>-1</sup> de iogurte foram colocados em tubos de polipropileno juntamente com 30 mL de suco gástrico (preparado com 6,4 g L<sup>-1</sup> de pepsina, 4 g L<sup>-1</sup> NaCl e 0,16 mol L<sup>-1</sup> de HCl). As soluções foram incubadas à 37 °C, 100 rpm, por 2 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Posteriormente, essas soluções foram neutralizadas com 50 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. Após, as soluções foram incubadas com 30 mL de suco intestinal (10,0 g L<sup>-1</sup> de pancreatina, 12,5 g L<sup>-1</sup> de sais de bÍlis e 0,07 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em NaOH 0,02 mol L<sup>-1</sup>). Novamente as soluções foram incubadas à 37 °C, 100 rpm, por 2 horas. Ao final, as amostras foram retiradas

da incubação e colocadas em banho de gelo para posterior centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min).

Um resumo dos procedimentos testados na determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em iogurte é apresentado na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Condições de extração das frações bioacessíveis de íons metálicos de iogurte para os três procedimentos testados

Procedimento	Condições de Extração	
	Etapa gástrica	Etapa Intestinal
P1	666,7 g L <sup>-1</sup> de iogurte – ajuste do pH = 2 (2 mol L <sup>-1</sup> de HCl) + 0,5 mL de suco gástrico (0,2 mg mL <sup>-1</sup> de pepsina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 100 rpm, 50 min)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (1,5 mol L <sup>-1</sup> ) + 0,5 mL de suco intestinal (0,15 mg mL <sup>-1</sup> de pancreatina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> ) → (37 °C, 100 rpm, 30 min) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)
P2	500 g L <sup>-1</sup> de iogurte + 2,5 mL de suco gástrico (0,2 g L <sup>-1</sup> de pepsina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 150 rpm, 2 horas)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (1,5 mol L <sup>-1</sup> ) + 2,5 mL de suco intestinal (0,15 g L <sup>-1</sup> de pancreatina, 1,5 g L <sup>-1</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> ) + (37 °C, 100 rpm, 2 horas) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)
P3	500 g L <sup>-1</sup> de iogurte + 30 mL de suco gástrico (3,2 g L <sup>-1</sup> de pepsina, 2,0 g L <sup>-1</sup> de NaCl e 0,08 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 100 rpm, 2 horas)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (50 g L <sup>-1</sup> ) + 30 mL de suco intestinal (10,0 g L <sup>-1</sup> de pancreatina, 12,5 g L <sup>-1</sup> de sais de bÍlis e 0,07 g L <sup>-1</sup> de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> em NaOH 0,02 mol L <sup>-1</sup> ) + (37 °C, 100 rpm, 2 horas) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)

Porém, antes de avaliar a bioacessibilidade dos íons metálicos de iogurte, foi realizado um estudo com diferentes curvas analíticas, a fim de verificar se as concentrações de enzimas utilizadas nos procedimentos poderiam causar alguma interferência na determinação dos metais por AAS. Para isto foram construídas curvas analíticas em diferentes meios para os três procedimentos investigados (BERMEJO et al., 2002; POHL et al., 2012b; STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014): 1) curva com padrão externo (PE); 2) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 1 (CP1); 3) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 2 (CP2); 4) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 3 (CP3). As condições de preparo de cada curva são apresentadas na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Avaliação de curvas analíticas preparadas em diferentes condições para a determinação das frações bioacessíveis de Zn, Cu e Cr em iogurte

Curva analítica	Condições de preparo
PE	Padrão aquoso de Cu/Cr/Zn
CP1	5,88 µg mL <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 4,41 µg mL <sup>-1</sup> de pancreatina em suco intestinal + Cu/Cr/Zn
CP2	18,5 mg L <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 13,9 mg L <sup>-1</sup> de pancreatina e 139 mg L <sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal + Cu/Cr/Zn
CP3	1,73 g L <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 4 g L <sup>-1</sup> de pancreatina e 5 g L <sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal + Cu/Cr/Zn

As curvas analíticas para Zn foram analisadas por FAAS, enquanto as curvas analíticas para Cr e Cu foram avaliadas por GF AAS.

### 3.1.6 Implementação do Procedimento *In Vitro* para Determinação das Frações Bioacessíveis de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Iogurte

Após a escolha do procedimento adequado a determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em iogurte, alguns parâmetros relacionados à performance analítica do método foram avaliados.

A linearidade das curvas analíticas foi investigada em dois meios diferentes para os 5 metais estudados. Avaliaram-se as curvas com padrão externo (PE) e em meio enzimático (18,5 mg L<sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 13,9 mg L<sup>-1</sup> de pancreatina e 139 mg L<sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal). As curvas analíticas foram avaliadas por meio de regressão linear com análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste em um nível de 95% de confiança, utilizando o software estatístico Action (free software, 2014).

Os valores para LOD e LOQ também foram calculados para cada metal através das relações  $3 \times SD/m$  e  $10 \times SD/m$ , respectivamente, sendo  $m$  a inclinação da curva analítica e  $SD$  o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (RIBANI et al., 2004; ARAÚJO, 2009; DE ANDRADE et al., 2014).

### 3.1.7 Determinação da Concentração Total e Bioacessível de Íons Metálicos em Iogurte

O método para determinação total, por amostragem em suspensão, de metais em iogurte e o procedimento para avaliação da bioacessibilidade destes íons, foram aplicados em 25 amostras de iogurte (6 marcas – A, B, C, D, E e F) – 24 amostras de iogurte regular (produzido com leite) e 1 amostra de iogurte de soja - que foram adquiridas comercialmente na cidade de Guarapuava, PR. A descrição das amostras é apresentada na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6.** Informações das amostras de iogurte utilizadas na determinação total e bioacessível de metais por AAS (informações do rótulo da embalagem comercial)

Amostra	Marca	Tipo <sup>a</sup>	Descrição	Consistência <sup>b</sup>	Proteína (g)	Gordura (g)	Carboidrato (g)	Ca (mg)	Na (mg)
A1 L1	A	I	Natural	P	6,9	5	11	247	140
A1 L2	A	I	Natural	P	6,9	5	11	247	140
A2	A	PD	Morango	P	5	2,8	28	188	93
A3 L1	A	PD	Morango - pronto para beber	L	4,4	3	25	155	77
A3 L2	A	PD	Morango - pronto para beber	L	4,4	3	25	155	77
A4	A	D	Morango 0 lactose	P	4	3	27	142	75
A5	A	I	Baunilha com Geléia de maçã e canela	P	3,3	4	33	119	60
B1	B	D	Natural	P	8	0	9	240	176
B2	B	D	Mel	P	6	0	24	230	190
B3	B	I	Morango com mirtilo - grego	P	4,5	4	19	80	80
C1	C	D	Natural	P	6,5	0,9	9,4	280	102
C2	C	I	Polpa de ameixa	P	4,9	5,2	25	179	71
C3	C	I	Pedaco de lichia	P	5	5,2	26	178	70
C4	C	I	Morango - grego	P	3,2	6,1	16	118	48
C5	C	D	Morango - soja	L	5,4	3,2	24	270	0
D1	D	PD	Mel	P	6,1	4,8	26	206	107
D2	D	I	Morango enriquecido com Zn e Ca	P	3	3	14	188	47
D3	D	I	Salada de frutas enriquecido com Zn e Ca	P	3	3	14	188	47
D4	D	I	Maçã e banana enriquecido com Zn e Ca	P	3	3	14	188	47
E1	E	I	Creme/calda de frutas vermelhas - grego	P	4,7	6,7	18	188	38
E2	E	I	Creme/calda de frutas vermelhas 0 lactose - grego	P	4,7	6,7	18	188	38
E3	E	D	Creme e preparado de fruta	P	5,3	7,6	15	207	41
F1	F	I	Morango	P	3,1	2,8	13	130	50
F2	F	I	Frutas vermelhas - pronto para beber	L	4	4	20	148	68
F3	F	I	Morango - pronto para beber	L	3,8	5,7	25	150	70

<sup>a</sup>Tipo: I = Integral; PD = Parcialmente Desnatado; D = Desnatado

<sup>b</sup>Consistência: P = Pastoso; L = Líquido

As amostras de iogurte que apresentaram frutas em sua composição foram homogeneizadas antes do preparo das suspensões ( $n = 3$ ). Para a marca A, as amostras 1 e 3 foram avaliadas em lotes diferentes a fim de verificar a influência deste parâmetro na concentração total ou bioacessível dos metais.

As amostras foram conservadas em ambiente refrigerado ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da análise.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Avaliação de Procedimentos de Preparo de Amostra para a Determinação de Cu e Zn em Iogurte Empregando Espectrometria de Absorção Atômica

Neste trabalho, diferentes procedimentos de abertura de amostra foram empregados para iogurte para posterior determinação de Cu e Zn por FAAS. Os métodos de abertura de amostra para iogurte já estabelecidos e utilizados na literatura incluíram a digestão por via úmida com refluxo em béquer (DU-B) e a digestão por via seca (DS). Esses procedimentos são baseados na destruição da matriz orgânica da amostra, facilitando assim a determinação dos analitos. Além disso, procedimentos como a digestão por via seca (calcinação), apesar de morosos, são geralmente utilizados como método de referência na quantificação de metais nas mais diversas matrizes alimentares (ZENEON, PASCUET e TIGLEA, 2008).

Outro método utilizado foi a digestão por via úmida empregando tubo criogênico (DU-TC). Esse método se baseia na mineralização da amostra de interesse com uso de pequenos volumes de reagentes oxidantes ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre outros) utilizando tubos criogênicos (capacidade máxima de 5 mL) fechados para a digestão. Esse procedimento é muito pouco utilizado em processos de abertura de amostra, porém pode apresentar vantagens tais como rápida homogeneização da amostra, redução no volume de reagentes (frente a métodos tradicionais de abertura de amostra como a digestão em béquer), e redução do risco de contaminação da amostra ou perda do analito.

Além desses procedimentos de abertura de amostra, nesse trabalho foi otimizado um método de determinação rápida de metais em amostras de iogurte empregando amostragem em suspensão (AS). A amostragem em suspensão se baseia no preparo de amostras sólidas ou semi-sólidas finamente divididas em meio líquido, e apresenta vantagens como a redução do tempo de preparo das amostras, possibilita o uso de padrões aquosos na calibração e minimiza

problemas de contaminação da amostra ou perda do analito (DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012; DE ANDRADE et al., 2014).

Nesse caso, as suspensões de iogurte foram preparadas com diferentes ácidos (HCl e HNO<sub>3</sub>) com o intuito de auxiliar a eliminação da matriz orgânica do iogurte durante a atomização do analito na análise da amostra por FAAS, facilitando assim a determinação dos elementos de interesse. A Tabela 3.7 apresenta os dados obtidos após a determinação de Cu e Zn por FAAS em amostras de iogurte que foram preparadas por diferentes procedimentos analíticos.

**Tabela 3.7.** Resultados da determinação dos íons metálicos (Zn e Cu) por FAAS em amostras de iogurte usando diferentes métodos de preparo de amostra e aplicação de teste *Tukey* de comparação múltipla de médias

Método	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	% Recuperação	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	% Recuperação	Teste Tukey <sup>a</sup>	
					Zn	Cu
DU-B	48,3±0,1	97	44,6±0,4	89	B	B
DU-TC	46,7±0,6	93	41,9±0,8	85	B C	C
DS	45,6±0,8	91	42±1	84	C	C
AS/HCl	51,6±0,2	103	46,1±0,3	92	A	A
AS/HNO <sub>3</sub>	50,8±0,5	102	46,1±0,1	92	A	A

<sup>a</sup> Valores médios de concentração que apresentam a mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de confiança de 95%.

Na Tabela 3.7 é possível observar que os valores de recuperação para Cu e Zn foram adequados em todos os procedimentos de preparo de amostra, sendo que as concentrações obtidas para os metais ficaram próximas à concentração adicionada a amostra (50  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Em todos os casos houve a subtração do controle analítico (branco) dos procedimentos avaliados. As amostras sem enriquecimento também foram avaliadas a fim de verificar a presença ou não dos metais no iogurte, sendo que as concentrações encontradas também foram utilizadas nos cálculos de recuperação. As porcentagens de recuperação para os cinco métodos avaliados variaram de 84% a 103%, estando dentro dos limites aceitáveis (80-110%) para a faixa de concentração avaliada (AOAC, 2012). Apesar de serem adequadas, nota-se que as menores porcentagens de recuperação foram obtidas para a digestão por via seca da amostra de iogurte. Esse resultado pode estar relacionado com a perda dos elementos por volatilização durante o procedimento de calcinação da amostra. Esse comportamento já é esperado, pois a digestão por via seca utiliza altas temperaturas e longo tempo para calcinação da amostra, ocasionando a perda de analitos como já foi reportado em outros estudos (DEMIREL et al., 2008; KHAN et al., 2013).

Com a realização de uma Análise de variância (ANOVA) e auxílio de um teste de comparação múltipla de médias (teste *Tukey*) em um nível de 95% de confiança, foi observado que as concentrações obtidas para Zn em iogurte após procedimento de abertura de amostra por DU-TC foram similares às concentrações obtidas com o uso da DU-B. Além disso, com a DU-TC foi possível obter concentrações de Zn similares aquelas obtidas através da DS. No entanto, ao se aplicar um teste *t* para amostras dependentes observou-se uma diferença da DU-TC em relação a DU-B, com  $t_{calculado} = 4,39$ . Considerando os graus de liberdade para este estudo ( $t_{crítico} = 4,30$ ) foi observada uma diferença entre os dois métodos. Ao comparar-se a DU-B e a DU-TC com a DS, não foram observadas diferenças entre os métodos, sendo que os valores de  $t_{calculado}$  foram de 3,98 e 3,17, respectivamente. Considerando que a DS ainda é utilizada como um procedimento padrão para tratamento de amostras alimentares, esse resultado demonstra a viabilidade no uso de procedimentos como a DU-TC, fornecendo resultados similares, com maior frequência analítica e menor risco de contaminação para a amostra. Para as suspensões, o uso das soluções de HNO<sub>3</sub> ou HCl na dispersão da amostra de iogurte não interferiu significativamente nos resultados de recuperação de Zn, sendo que ambas as suspensões apresentaram as maiores concentrações do metal (próxima ao valor esperado – 50 µg g<sup>-1</sup>), foram similares entre si ( $t_{calculado} = 1,00$ ), e se distinguiram dos outros procedimentos analíticos de abertura de amostra ( $t_{calculado} > 4,43$ ).

Para Cu, através da comparação múltipla de médias (Tabela 3.7), a DU-TC e a DS são significativamente semelhantes em um nível de 95% de confiança, sendo que a DU-B se diferenciou de todos os procedimentos avaliados. Com o teste *t* para amostras dependentes, foram obtidos valores de  $t_{calculado} = 4,90$  para DU-B em comparação com a DU-TC, mostrando diferenças entre os procedimentos ( $t_{crítico} = 4,30$ ). Do mesmo modo que para Zn, concentrações de Cu foram consideradas similares comparando-se a DU-B e DU-TC com DS. Neste caso os valores de  $t_{calculado}$  foram menores que 3,79, estando abaixo do valor de  $t_{crítico}$  (4,30). Os resultados obtidos na determinação de Cu através das suspensões de iogurte, tiveram comportamento similar ao observado para Zn. As suspensões preparadas com HCl ou HNO<sub>3</sub> apresentaram as maiores recuperações para o analito e foram semelhantes em um nível de 95% de confiança ( $t_{calculado} = 0,18$ ). Ao compará-las com os métodos tradicionais de abertura de amostra observou-se que existem diferenças entre os mesmos, mostrando a viabilidade das suspensões na determinação de metais em iogurte.

De modo geral, observou-se que a DU-TC foi similar a DS para os dois metais avaliados. Isso indica a possibilidade de uso dos tubos criogênicos em procedimentos de abertura de

amostra (que é um método pouco descrito na literatura) proporcionando maior rapidez e menor risco para a análise (perda do analito ou contaminação da amostra).

Para a suspensão, o uso das soluções de  $\text{HNO}_3$  ou  $\text{HCl}$  na dispersão da amostra de iogurte não interferiu significativamente nos resultados de recuperação dos elementos na matriz, o que pode ser evidenciado pelo teste *Tukey*. Como  $\text{HCl}$  é um ácido mais brando que o  $\text{HNO}_3$  (em relação a capacidade oxidante), escolheu-se trabalhar com  $\text{HCl}$  como ácido de diluição para as amostras de iogurte na amostragem em suspensão. Resultados similares são encontrados em estudos de determinação direta de metais em iogurte, os quais demonstraram a eficiência deste método na quantificação de espécies como Zn, Mg e Ca neste tipo de matriz (BRANDÃO et al., 2010; BRANDÃO, MATOS e FERREIRA, 2011). No entanto, no presente trabalho, foi utilizado um equipamento de absorção atômica com chama, comum em laboratórios de pesquisa, o que se diferencia dos trabalhos já relatados na literatura que utilizam equipamentos com fonte contínua de alta resolução, menos comuns em análise de rotina de amostras para a determinação da concentração de metais.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que DU-TC e AS se apresentam como procedimentos eficientes e rápidos na determinação de elementos em matrizes complexas como o iogurte. Como ambos são pouco relatados na literatura e apresentaram vantagens como menor tempo e maior facilidade no preparo da amostra, resultados adequados de recuperação, pequeno volume de reagentes, entre outros, eles foram melhor estudados. Para isto, planejamentos fatoriais foram utilizados a fim de avaliar a influência dos parâmetros usados em ambos métodos de preparo de amostra na quantificação de íons metálicos. Com isso, parâmetros como volume de reagente e tempo de preparo de amostra poderiam ser reduzidos, facilitando a determinação dos elementos de interesse.

### 3.2.2 Uso de Planejamento Fatorial na Otimização das Condições de Tratamento de Amostra para a Determinação de Cu e Zn em Iogurte por FAAS

Considerando a viabilidade apresentada neste trabalho e os relatos escassos da DU-TC e AS nos procedimentos de abertura de amostras como iogurte, planejamentos fatoriais foram realizados estudando os principais parâmetros para cada metodologia. Isso foi feito para facilitar ainda mais o preparo das amostras e posterior determinação de Cu e Zn por FAAS.

Para DU-TC foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central em triplicata, sendo que os parâmetros avaliados foram a concentração de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o tempo de digestão do iogurte. Esses parâmetros foram escolhidos visto que eles podem influenciar no

procedimento de digestão, podendo assim afetar os valores de taxa de recuperação dos íons metálicos de interesse em iogurte. A matriz do planejamento fatorial e os resultados para as concentrações de Cu e Zn obtidas através dessa metodologia são apresentadas na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8.** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para o preparo de amostra de iogurte utilizando DU-TC e resultados obtidos para concentração e taxa de recuperação de Cu e Zn por FAAS

Ensaio	HNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	t (min)	Zn (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Cu (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
1	1,0 (-1)	3,0 (+1)	120 (+1)	25,6	102,4	48,5	97
2	1,0 (-1)	3,0 (+1)	60 (-1)	22,7	90,8	45,6	91,2
3	1,0 (-1)	1,8 (-1)	120 (+1)	24,3	97,2	47,1	94,2
4	1,0 (-1)	1,8 (-1)	60 (-1)	23,7	94,8	56,1	112,2
5	2,3 (+1)	3,0 (+1)	120 (+1)	27,9	111,6	51,3	102,6
6	2,3 (+1)	3,0 (+1)	60 (-1)	24,5	98	47,1	94,2
7	2,3 (+1)	1,8 (-1)	120 (+1)	26,6	106,4	51,1	102,2
8	2,3 (+1)	1,8 (-1)	60 (-1)	26,3	105,2	49,9	99,8
9	1,7 (0)	2,4 (0)	90 (0)	26,0 ± 0,1	104 ± 0,4	51,0 ± 3,4	102 ± 7

**Nota:** valores entre parênteses representam os níveis do planejamento fatorial: superior (+1), inferior (-1) e ponto central (0)

Na Tabela 3.8 é possível observar que para Zn os valores de concentração se situaram próximos ao valor adicionado às amostras de iogurte (25 µg g<sup>-1</sup>). As concentrações determinadas para este elemento variaram de 22,7 a 27,9 µg g<sup>-1</sup>, sendo que a faixa de recuperação foi de 90,8% (Ensaio 2) a 111,6% (Ensaio 5). De modo geral, os ensaios realizados forneceram taxas de recuperação de Zn adequadas (80-110%) em relação à concentração avaliada (AOAC, 2012). Neste caso, apenas o ensaio 5 apresentou recuperação para o metal acima do esperado. Para Cu, também se observou uma similaridade entre as concentrações obtidas em relação à concentração esperada (50 µg g<sup>-1</sup>), sendo que as mesmas variaram de 45,6 a 56,1 µg g<sup>-1</sup>. As taxas de recuperação para o metal se situaram entre 91,2% (Ensaio 2) a 112,2% (Ensaio 4). Neste caso, considerando a maior concentração avaliada para este metal, pode-se verificar que todos os ensaios, com exceção do ensaio 4, apresentaram concentrações adequadas (100 ± 10%), e próximas do esperado. De modo geral, os resultados indicaram uma semelhança na concentração dos elementos estudados, considerando todos os pontos do planejamento fatorial. Isso pode também estar relacionado com a proximidade numérica entre os pontos do planejamento, indicando que pequenas variações nos parâmetros avaliados não causam influências significativas na concentração dos metais na matriz de interesse.

A Tabela 3.9 apresenta os resultados dos efeitos dos fatores principais e suas interações para o planejamento fatorial proposto.

**Tabela 3.9.** Efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados no planejamento  $2^3$  para DU-TC

Efeitos	Zn (Estimativas $\pm$ Erro padrão)	Cu (Estimativas $\pm$ Erro padrão)
<i>Média global</i>	25,2 $\pm$ 0,3	50 $\pm$ 1
<i>Principais efeitos</i>		
HNO <sub>3</sub>	2,2 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 2,4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,05 $\pm$ 0,54	-2,9 $\pm$ 2,4
Tempo	1,8 $\pm$ 0,5	-0,2 $\pm$ 2,4
<i>Efeitos de interação</i>		
HNO <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,2 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 2,4
HNO <sub>3</sub> xTempo	0,05 $\pm$ 0,54	2,9 $\pm$ 2,4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> xTempo	1,4 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 2,4
HNO <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> xTempo	0,2 $\pm$ 0,5	-2,2 $\pm$ 2,4

A Tabela 3.9 apresenta os efeitos principais e de interação para os fatores avaliados (HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tempo de digestão) na determinação de Cu e Zn em iogurte por DU-TC. Para Zn, como pode ser observado, os valores para os efeitos principais variaram de -0,05 a 2,2. Para a interação entre os fatores, os valores variaram de -0,2 a 1,4.

A fim de verificar a significância desses efeitos em um nível de 95% de confiança, pode-se aplicar um teste *t* de acordo com a seguinte equação (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007):

$$t_2 \times s(\text{efeito}) = 4,303 \times 0,54 = 2,32 \quad (\text{Equação 10})$$

Em que:  $t_2$  é o valor de  $t_{\text{crítico}}$  para os fatores e  $s(\text{efeito})$  é o erro padrão para os efeitos.

Nesse caso, para um efeito ser significativo, ele deve apresentar valor superior a 2,32. Assim, observando-se a Tabela 3.9, para as interações, não houve nenhum efeito significativo. O mesmo pode ser observado para os efeitos principais, sendo que nenhum dos fatores apresentaram significância estatística.

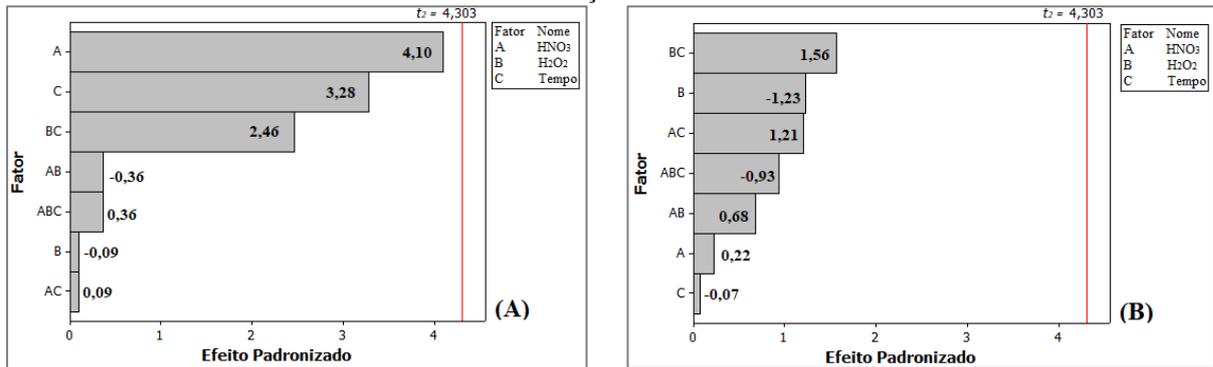
Para Cu, os valores dos efeitos principais variaram de -2,9 a 0,5, e de suas interações variaram de -2,2 a 3,7. Nesse caso, fazendo-se o cálculo para verificar a significância dos efeitos tem-se:

$$t_2 \times s(\text{efeito}) = 4,303 \times 2,4 = 10,3 \quad (\text{Equação 11})$$

Sendo assim, para Cu, nenhum dos efeitos principais ou de interação foram significativos (Tabela 3.9) para o planejamento fatorial proposto.

A Figura 3.2 apresenta o gráfico de Pareto para recuperação de Zn e Cu em iogurte obtidos através do planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central.

**Figura 3.2.** Gráficos de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação de Zn e Cu em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança



**Nota:** Valores em negrito (ao lado das barras em cinza) representam os valores de  $t$  dos efeitos padronizados para cada um dos fatores e suas interações.

**Legenda:** Zn (A) e Cu (B).

Observando-se a Figura 3.2, é possível observar que, pelo gráfico de Pareto, nenhum dos fatores, ou até mesmo a interação entre estes, apresentou significância na concentração de Zn (Figura 3.2A) e Cu (Figura 3.2B) determinados em iogurte, como já se havia observado no cálculo de significância dos efeitos.

Estes resultados são importantes considerando o tratamento de amostras por métodos tradicionais, pois demonstram a eficiência dos tubos criogênicos na digestão por via úmida, o qual é um sistema fechado, e assim, fornece menores riscos de contaminação da amostra e/ou perda do(s) analito(s) de interesse. Além disso, para iogurte, este procedimento pode ser utilizado com um tempo de digestão reduzido (60 min), em comparação com outros métodos para tratamento de amostra como o iogurte (SUTUROVIC´ et al., 2014), representando assim, um aumento na frequência analítica. Isso sugere que a introdução de tubos criogênicos no tratamento de amostras complexas pode ser efetiva para determinação de elementos de interesse.

Para AS, foi aplicado um planejamento fatorial  $2^2$  em duplicata (considerando a complexidade da matriz estudada), com ponto central em triplicata. Neste caso, a concentração de HCl e o tempo de agitação ultrassônica foram os parâmetros avaliados no preparo das suspensões de iogurte, pois ambos poderiam influenciar na concentração dos elementos de interesse. As concentrações de ácido utilizadas no planejamento diferiram daquelas utilizadas em testes preliminares. Isso foi possível pois verificou-se inicialmente que uma quantidade menor de ácido era eficiente na quantificação de Cu e Zn em iogurte, além de facilitar o preparo de amostra, reduzindo o uso de reagentes e assim, diminuindo a possibilidade de contaminação da amostra. A matriz do planejamento experimental e os resultados para as concentrações de Cu e Zn obtidas através da AS são apresentadas na Tabela 3.10.

**Tabela 3.10.** Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para preparo de amostra de iogurte utilizando AS, e resultados obtidos para concentração e taxa de recuperação de Cu e Zn em iogurte por FAAS

Ensaio	HCl (mol L <sup>-1</sup> )	t (min)	Zn (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Cu (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
1 (duplicata)	0 (-1)	1 (-1)	26,9 ± 0,3	108 ± 1	44,6 ± 0	89,27 ± 0,04
2 (duplicata)	0 (-1)	5 (+1)	26,5 ± 0,7	106 ± 3	44,6 ± 0,1	89,3 ± 0,3
3 (duplicata)	0,2 (+1)	1 (-1)	26,4 ± 0,3	106 ± 1	51,5 ± 0,4	102,9 ± 0,8
4 (duplicata)	0,2 (+1)	5 (+1)	26,2 ± 0,1	104,7 ± 0,6	50,7 ± 0,4	101,3 ± 0,9
5 (triplicata)	0,1 (0)	3 (0)	25,9 ± 0,1	103,6 ± 0,5	50,1 ± 0,4	100,3 ± 0,8

A Tabela 3.10 apresenta os resultados para Cu e Zn do planejamento fatorial proposto para AS. Para Zn, observou-se que as concentrações recuperadas em iogurte variaram de 25,9 a 26,9 (µg g<sup>-1</sup>). As concentrações de Zn em iogurte, determinadas por AS, foram semelhantes em todos os pontos do planejamento proposto. As porcentagens de recuperação para Zn variaram de 103,6 ± 0,5 (ponto central) a 108 ± 1 (Ensaio 1), e foram adequadas considerando a concentração avaliada.

Para Cu, observou-se na Tabela 3.10, que as concentrações recuperadas em iogurte variaram de 44,6 a 51,5 ± 0,4 (µg g<sup>-1</sup>). As porcentagens de recuperação neste caso, variaram de 89,27 ± 0,04% (Ensaio 1) a 102,9 ± 0,9% (Ensaio 3). Os ensaios 1 e 2 foram os que apresentaram menores concentrações de Cu, o que pode estar associado a não utilização de HCl no preparo das suspensões de iogurte. Para os demais ensaios, as recuperações foram similares e próximas dos valores esperados em relação a concentração de Cu adicionada as amostras. A presença do ácido, mesmo em baixas concentrações, pode auxiliar na liberação do metal da matriz.

A Tabela 3.11 apresenta os resultados dos efeitos principais e de interação para os fatores avaliados (HCl e tempo de agitação ultrassônica) na determinação de Cu e Zn em iogurte por AS, para o planejamento fatorial proposto.

**Tabela 3.11.** Efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados no planejamento  $2^2$  para AS

Efeitos	Zn (Estimativas ± Erro padrão)	Cu (Estimativas ± Erro padrão)
<i>Média global</i>	26,5 ± 0,1	47,9 ± 0,1
<i>Principais efeitos</i>		
HCl	-0,4 ± 0,2	6,6 ± 0,2
Tempo	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,2
<i>Efeitos de interação</i>		
HClxTempo	0,1 ± 0,2	-0,2 ± 0,2

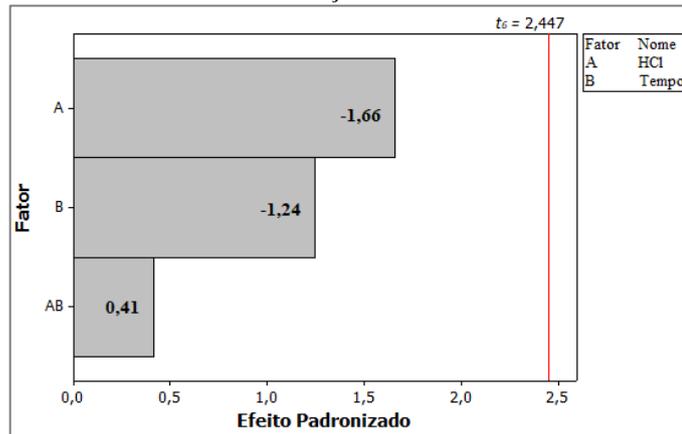
Na Tabela 3.11, para Zn, como pode ser observado, os valores para os efeitos variaram de -0,4 a 0,1. Realizando-se o cálculo para verificar a significância dos efeitos principais e de interação, tem-se:

$$t_6 \times s(\text{efeito}) = 2,447 \times 0,2 = 0,49$$

$$\text{(Equação 12)}$$

Nesse caso, observando-se a Tabela 3.11, não é possível verificar algum efeito significativo na determinação de Zn em iogurte, considerando que nenhum dos efeitos principais ou de interação foram superiores ao valor de  $t_{critico}$ . Isso pode ser comprovada pelo gráfico de Pareto, como apresentado na Figura 3.3.

**Figura 3.3.** Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação direta de Zn em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança



**Nota:** Valores em negrito (ao lado das barras em cinza) representam os valores de  $t$  dos efeitos padronizados para cada um dos fatores e suas interações.

Com relação à Figura 3.3, não se observa efeitos significativos na determinação de Zn em suspensão de iogurte, como mostrado pelos cálculos de significância dos efeitos. Assim, pode-se sugerir que o método apresenta robustez para determinação de Zn em iogurte, visto que pequenas alterações no método não causam mudanças significativas na concentração determinada do elemento na matriz. Além disso, apesar dos pontos do planejamento fatorial escolhidos em relação a faixa de concentração de HCl e o tempo de agitação ultrassônica terem sido próximos, estudos prévios para determinação de Zn em iogurte, já demonstravam que o uso de uma maior quantidade do ácido não influenciava na determinação do metal.

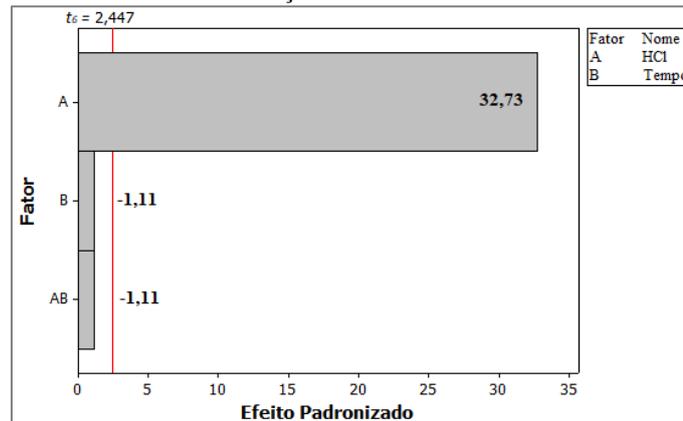
Para Cu, os valores dos efeitos principais variaram de -0,2 a 6,6. Sendo assim, através do cálculo de significância dos efeitos tem-se:

$$t_6 \times s(\text{efeito}) = 2,447 \times 0,2 = 0,49 \quad (\text{Equação 13})$$

Dessa forma, para Cu, observa-se que a concentração de HCl foi o único efeito significativo no planejamento proposto (Tabela 3.11). Por ser um efeito positivo, pode-se concluir que uma maior concentração de ácido favorece a determinação de Cu em iogurte.

A Figura 3.4 apresenta o gráfico de Pareto para recuperação de Cu em iogurte obtidos através do planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central.

**Figura 3.4.** Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial proposto para determinação direta de Cu em iogurte, considerando um nível de 95% de confiança



**Nota:** Valores em negrito (ao lado das barras em cinza) representam os valores de  $t$  dos efeitos padronizados para cada um dos fatores e suas interações.

Em relação a Figura 3.4, é possível observar pelo gráfico de Pareto, que a concentração de HCl é muito significativa na determinação de Cu em iogurte, confirmando o que já havia sido observado pelo cálculo de significância dos efeitos. Estudos prévios em relação a determinação do metal em iogurte, demonstraram que o uso de concentrações mais elevadas de HCl (acima de  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ) influenciava no resultado final, sendo que se observou uma diminuição da recuperação de Cu em iogurte (próxima a 85%). Isso pode estar relacionado com a característica da chama, sendo que a adição de mais ácido no preparo da suspensão, quando presente na chama, poderia estar prejudicando a atomização do metal. Assim, os pontos do planejamento fatorial foram escolhidos considerando essa situação anteriormente observada, sendo que mesmo estando próximos, já se observa a influencia do HCl na determinação de Cu em iogurte.

Apesar da DU-TC e AS apresentarem resultados adequados na determinação de Cu e Zn em iogurte, o último procedimento se mostrou mais rápido e de menor risco de contaminação para a amostra e para o analista, já que não envolve etapas de aquecimento e nem a manipulação de grandes volumes de reagentes perigosos. Sendo assim, a AS foi escolhida para determinação de elementos em iogurte.

A fim de se obter metodologias similares na determinação direta de íons metálicos em iogurte, a condição ótima de preparo de amostra escolhida para Cu e Zn foi: iogurte ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ),  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl (adequada taxa de recuperação para ambos os metais), sendo que a homogeneização da suspensão foi assistida por ultrassom (1 min). Posteriormente, esse método foi validado a fim de garantir confiabilidade ao mesmo.

Alguns estudos têm demonstrado uma relevante importância no uso de amostragem em suspensão para o preparo de amostras complexas como iogurte. Brandão et al. (2010) e Brandão, Matos e Ferreira (2011) desenvolveram uma metodologia de determinação direta de Zn, Ca e Mg em iogurte, usando FAAS com fonte contínua de alta resolução. Nestes trabalhos, suspensões de iogurte ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl e 20 minutos de agitação ultrassônica) foram preparadas e comparadas com um método de digestão tradicional (digestão por via úmida). Os autores verificaram que as suspensões apresentaram resultados similares ao método tradicional. Em relação aos resultados alcançados no presente trabalho quando comparado aos apresentados na literatura, houve uma diminuição da concentração de HCl ( $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  para  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e no tempo de homogeneização por ultrassom (20 min para 1 min), aumentando a frequência analítica do método.

Tendo-se estabelecido uma condição ótima de preparo de amostra, que é importante no preparo da suspensão e na determinação direta de Cu e Zn em iogurte por FAAS, essa foi testada na determinação de Cr, Pb e Cd por GF AAS na mesma matriz, a fim de verificar sua aplicabilidade na quantificação destes íons metálicos. Como as concentrações de Cu em iogurte demonstraram serem inferiores ao LOQ do FAAS, a metodologia desenvolvida por FAAS foi aplicada, otimizada e validada por GF AAS, a fim de melhorar a sensibilidade na quantificação do metal na matriz.

### 3.2.3 Determinação de Cr, Cd, Cu e Pb em Suspensão de Iogurte por GF AAS

A determinação dos metais de forma direta, sem necessidade de procedimentos de digestão de amostras de iogurte, foi escolhida devido à facilidade de preparo e resultados adequados. Foram utilizados os elementos Cu e Zn como modelos nesses estudos de otimização. Dessa forma, estudos foram conduzidos visando a aplicação do método otimizado na determinação de Cr, Cd e Pb por amostragem em suspensão de amostras de iogurte e determinação por GF AAS. Devido às baixas concentrações alcançadas para Cu em iogurte, a metodologia desenvolvida para determinação do elemento por FAAS foi também aplicada para determinação do mesmo por GF AAS.

Inicialmente, a amostra de iogurte ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) foi enriquecida com 12,5, 125,0, 250,0 e 500,0  $\text{ng g}^{-1}$  (0,5; 5; 10; e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Cd, Cu, Cr e Pb, respectivamente, e foi dispersa em HCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Após análise por GF AAS, foram obtidas recuperações de  $50 \pm 3\%$ ,  $58 \pm 6\%$ ,  $92 \pm 3\%$  e  $96 \pm 4\%$  para Cd, Pb, Cr e Cu, respectivamente. Com base nos resultados observou-se que as suspensões com HCl não foram adequadas para a determinação de Pb e Cd. Isso

provavelmente está relacionado com problemas de interferência da matriz, sendo que o HCl não foi eficiente na destruição da mesma, afetando a determinação dos elementos. Para Cr e Cu, elementos menos voláteis, o uso de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> foi adequado para o preparo de suspensões de iogurte. Alguns estudos discutem o uso de HCl na determinação de Cr por GF AAS. Isso porque existe a possibilidade de formação de espécies voláteis na presença de cloreto, o que pode causar perdas do analito ou problemas de interferência na quantificação do elemento (BAKER e MILLER-IHLI, 2006). No entanto, outros estudos relatam que a determinação de Cr não é prejudicada pelo uso de HCl em preparo de amostras (DE PAULA et al., 2012; PYRZYŃSKA, 1989). De Paula et al. (2012) usaram HCl na determinação de Cr e Ni por GF AAS em amostras de formulação farmacêutica e matérias-primas usadas na manufatura de medicamentos baseados em cefalexina e ciprofloxacina. Neste estudo os autores verificaram uma melhor eficiência na extração de Cr utilizando HCl. No presente trabalho, não foi observada nenhuma perda de Cr na presença de cloreto para o preparo das suspensões de iogurte. Isso pode estar relacionado às formas químicas de Cr em iogurte (predominantemente as orgânicas) e a própria composição da matriz. Alimentos como iogurte possuem macronutrientes como Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, etc. os quais podem agir como modificadores naturais de matriz, minimizando perdas por volatilização.

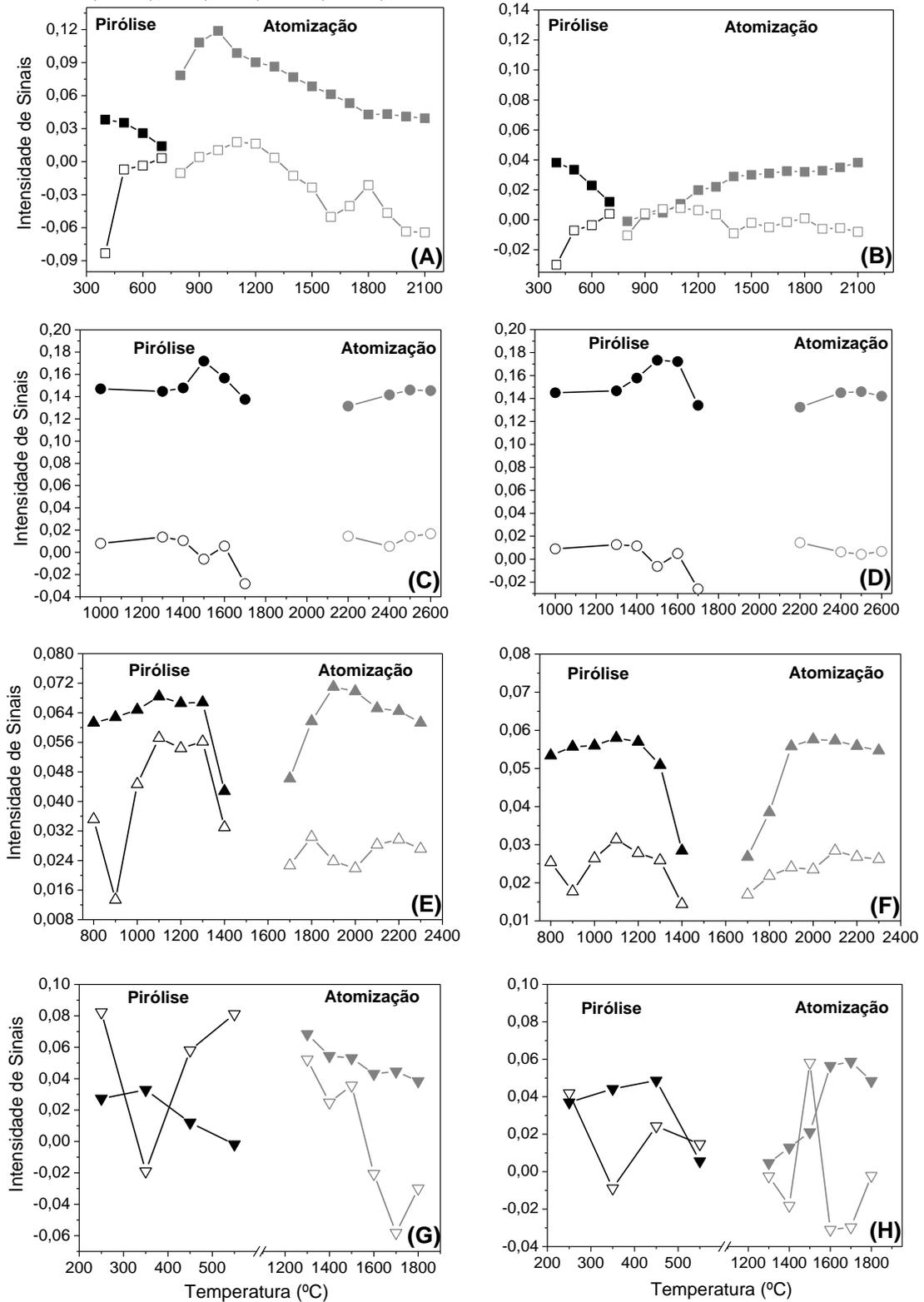
Outros testes realizados com maior concentração de HCl (0,6 mol L<sup>-1</sup>), demonstraram que não houve diferença nas recuperações para Pb e Cd, se comparado com os resultados para menor concentração do ácido. Cd e Pb são considerados elementos voláteis, sendo que o uso de HCl na quantificação de metais pode auxiliar na formação de compostos voláteis com Cl<sup>-</sup>, causando a perda do analito (CHAKRABARTI et al., 1981; IMAI et al., 1991; SARDANS, MONTES, e PENUELAS, 2010). Além disso, o Pb pode ser precipitado com HCl, causando interferências em sua determinação. Assim, a fim de verificar a influência do tipo de ácido na quantificação de Pb e Cd, testes foram conduzidos com suspensões sendo preparadas em meio de HNO<sub>3</sub> (0,2 e 0,6 mol L<sup>-1</sup>). Com o uso de 0,2 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>, foram obtidas recuperações de 44,9 ± 3,9% e 40,3 ± 3,1% para Pb e Cd, respectivamente. Isso indica que não houve uma destruição eficiente da matriz orgânica do iogurte durante a etapa de pirólise da amostra. Já para suspensões em meio de 0,6 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>, Pb e Cd apresentaram recuperações de 95,6 ± 2,5% e 90,6 ± 12,2%, respectivamente. Essas recuperações são consideradas adequadas (80-110%), em relação a faixa de concentração estudada (AOAC, 2012).

Assim, as determinações diretas de Cr, Cu, Cd e Pb por GF AAS foram realizadas utilizando 0,2 mol L<sup>-1</sup> de HCl para o Cr e Cu e 0,6 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> para Cd e Pb, como a fase líquida para o preparo das suspensões de iogurte. Em todos os casos, foram obtidas suspensões

homogêneas e estáveis.

Posteriormente, estudos foram realizados para otimizar as condições do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de Cr, Cu, Pb e Cd por GF AAS, utilizando a amostragem em suspensão. Apesar das porcentagens de recuperação para todos os metais serem adequadas, utilizando-se as temperaturas de pirólise e atomização indicadas pelo fabricante, com a otimização do programa de aquecimento buscou-se minimizar problemas como os sinais de fundo (background - BG) da amostra. As condições do programa de aquecimento escolhidas estão associadas com a simplicidade, sensibilidade, elevados sinais de absorbância, baixos sinais de fundo (BG), além do baixo custo de análise. As curvas de pirólise e atomização para os íons metálicos avaliados em suspensão de iogurte e em padrão aquoso, são apresentadas na Figura 3.5.

**Figura 3.5.** Curvas de pirólise e atomização obtidas durante a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite para suspensões de iogurte (A, C, E e G) e padrões aquosos (B, D, F e H) de Pb (A e B), Cr (C e D), Cu (E e F) e Cd (G e H)



**Nota:** Suspensões de iogurte e padrões aquosos enriquecidas com 12,5; 125,0; 250,0 e 500,0 ng g<sup>-1</sup> (ou 0,5; 5; 10 e 20 µg L<sup>-1</sup>) de Cd, Cu, Cr e Pb, respectivamente.

**Legenda:** Curvas para a pirólise estão apresentadas em preto e para a atomização em cinza;  
 Sinais de Absorbância (símbolos fechados) e Background - BG (símbolos abertos);  
 Pb (■ e □), Cr (● e ○), Cu (▲ e Δ) e Cd (▼ e ▽).

A Figura 3.5 mostra as curvas de pirólise e atomização obtidas para os quatro metais durante a otimização univariada do programa de aquecimento do forno de grafite. Os sinais de absorvância integrada são sinais analíticos médios obtidos através de réplicas ( $n=2$ ). As curvas de pirólise foram obtidas fixando-se as temperaturas de atomização em 2100, 1800, 2300 e 2600 °C para Pb, Cd, Cu e Cr, respectivamente. As curvas de atomização foram obtidas fixando-se as temperaturas de pirólise em 400, 350, 900 e 1500 °C para Pb, Cd, Cu e Cr, respectivamente. A Figura 3.5 também apresenta os sinais de fundo (BG) para os elementos.

Para Pb (Figura 3.5A e B), a faixa de temperatura de pirólise avaliada foi de 400 a 700 °C. Para atomização, variou-se as temperaturas de 800 a 2100 °C. Para a curva de pirólise, em suspensão de iogurte, foi observado um sinal de absorvância ligeiramente superior em 400 °C (Figura 3.5A). Acima desta temperatura Pb é volatilizado. O sinal de BG nesta temperatura foi baixo, como pode ser visto na Figura 3.5A. Já para a curva de atomização, o maior sinal de absorvância foi obtido em 1000 °C. No entanto, o sinal de BG observado na Figura 3.5A foi elevado nesta condição para a atomização. O mesmo comportamento foi observado para o padrão aquoso (Figura 3.5B), com relação a temperatura de pirólise (400 °C), com sinais de absorvância e BG adequados. Para atomização, no entanto, o mais elevado sinal de absorvância para Pb foi alcançado em 2100 °C, onde se obteve baixo sinal de BG. Assim, objetivando-se a escolha de temperaturas de pirólise e atomização para Pb, adequados aos dois meios estudados (aquoso e suspensão de iogurte), as temperaturas escolhidas foram 400 °C para pirólise e 2100 °C para atomização. Essas foram as condições que apresentaram similaridade, em relação ao sinal de absorvância, para as duas soluções avaliadas, e conseqüentemente, apresentaram o menor BG nos dois casos.

Para Cr, a faixa de temperatura avaliada para pirólise foi de 1000 a 1700 °C e para atomização de 2200 a 2600 °C. Como mostrado na Figura 3.5C, para suspensão de iogurte, os sinais analíticos foram constantes entre 1000 °C e 1400 °C para a curva de pirólise. O maior sinal de absorvância foi obtido em 1500 °C, sendo que acima desta temperatura, o sinal de Cr diminuiu, indicando perda do metal por volatilização. Para atomização, foi observado um patamar para os valores de absorvância de Cr. Um sinal ligeiramente superior foi observado em 2500 °C. Os sinais de fundo (BG) obtidos para Cr foram baixos em todas as faixas de temperatura estudadas, como mostrado na Figura 3.5C. Assim, as temperaturas ótimas para Cr foram 1500 °C e 2500 °C para as etapas de pirólise e atomização, respectivamente. Os resultados indicaram que houve uma eliminação eficiente da matriz orgânica do iogurte. Para o padrão aquoso, na Figura 3.5D, pode ser observado valores máximos de absorvância entre 1500 e 1600 °C para pirólise. Para estas temperaturas, os menores sinais de BG puderam ser

observados em 1500 °C (Figura 3.5D). Para atomização, o maior sinal de absorbância e menor sinal de BG são alcançados em 2500 °C.

Para Cu, variou-se a temperatura de pirólise de 800 a 1400 °C e de atomização de 1700 a 2300 °C. Para pirólise, observando-se a Figura 3.5E, é possível verificar que entre 800 e 1300 °C os sinais de absorbância foram constantes, sendo que após 1300 °C o sinal diminuiu, indicando perda do metal por volatilização. Para a mesma faixa de temperatura, os sinais de BG foram altos, com exceção em 900 °C, sendo que esta temperatura foi escolhida como ótima para a etapa de pirólise. Com relação a curva de atomização, pode-se observar sinais de absorbância constantes entre 1900 a 2300 °C, diminuindo significativamente abaixo de 1900 °C (Figura 3.5E). Para a mesma faixa de temperatura, os sinais de BG foram constantes, sendo que em 2000 °C observou-se o menor sinal de fundo. Assim, 900 °C e 2000 °C foram escolhidas como temperaturas ótimas de pirólise e atomização, respectivamente, para Cu em iogurte. Para o padrão aquoso também foi observado que os sinais de absorbância foram constantes para temperaturas de pirólise entre 800 e 1200 °C (Figura 3.5F). Para atomização, entre 1900 e 2400 °C foi observada similaridade dos sinais analíticos para Cu. Para estas temperaturas foram observados valores semelhantes para os sinais de fundo (BG) (Figura 3.5F), sendo que do mesmo modo que para a suspensão de iogurte, as temperaturas ótimas de pirólise e atomização foram 900 °C e 2000 °C, respectivamente.

Já para Cd, variou-se a temperatura de pirólise de 250 a 550 °C. E a temperatura de atomização foi variada de 1300 a 1800 °C. Com relação a curva de pirólise, para suspensão de iogurte, o sinal de absorbância diminuiu significativamente acima de 350 °C, indicando a perda do analito antes da etapa de atomização (Figura 3.5G). Baixo sinal de fundo (BG) foi obtido para Cd nesta temperatura, indicando que não existem efeitos de interferência da matriz nas determinações do analito (Figura 3.5G). Em relação a curva de atomização, observou-se que um elevado sinal de absorbância é obtido em 1300 °C (Figura 3.5G). No entanto, o sinal de BG foi alto nesta mesma temperatura (Figura 3.5G), mostrando que pode existir alguma interferência significativa da matriz na análise. Acima de 1300 °C, os sinais de absorbância foram constantes para a atomização. Assim, a escolha da condição ótima foi baseada na temperatura que apresentou o menor BG, neste caso, alcançado em 1600 °C para a temperatura de atomização. Para padrão aquoso de Cd, uma absorbância máxima foi obtida em 350 °C (Figura 3.5H) para pirólise. Para atomização, os valores máximos de absorbância são obtidos entre 1600 e 1700 °C. Em ambas temperaturas, foram obtidos os menores sinais de BG (Figura 3.5H) para o metal estudado.

É importante enfatizar que modificadores químicos para Cr, Pb, Cu e Cd não foram

necessários, devido aos sinais relativamente elevados obtidos para os metais, e pela eficiente correção de fundo proporcionada pelo equipamento utilizado (corretor Zeeman). Além disso, pode-se sugerir que a presença de íons tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no iogurte, podem atuar como modificadores naturais de matriz, como já foi observado em outros estudos (DE ANDRADE et al., 2014).

O programa de aquecimento para GF AAS otimizado para a determinação direta de Cr, Pb, Cu e Cd em iogurte está apresentado na Tabela 3.12.

**Tabela 3.12.** Programa de aquecimento do forno de grafite, otimizado para determinação direta de Cr, Pb, Cu e Cd em iogurte

Etapa	Pb			Cd			Cr			Cu			Vazão do Gás (L min <sup>-1</sup> )	Leitura
	T (°C)	Tempo (s)		T (°C)	Tempo (s)		T (°C)	Tempo (s)		T (°C)	Tempo (s)			
		R <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>											
Secagem 1	85	5	2	85	5	2	85	5	2	85	5	2	0,3	Não
Secagem 2	95	40	1	95	40	1	95	40	1	95	40	1	0,3	Não
Secagem 3	120	10	1	120	10	1	120	10	1	120	10	1	0,3	Não
Pirólise	400	5	3	350	5	3,8	1500	5	4,2	900	5	3	0,3	Não
Atomização	2100	0,9	2	1600	0,8	2	2500	0,8	2	2000	0,8	2	0	Sim
Limpeza	2100	2	1	1600	2	0	2500	2	1	2000	2	1	0,3	Não

<sup>a</sup>R = Rampa

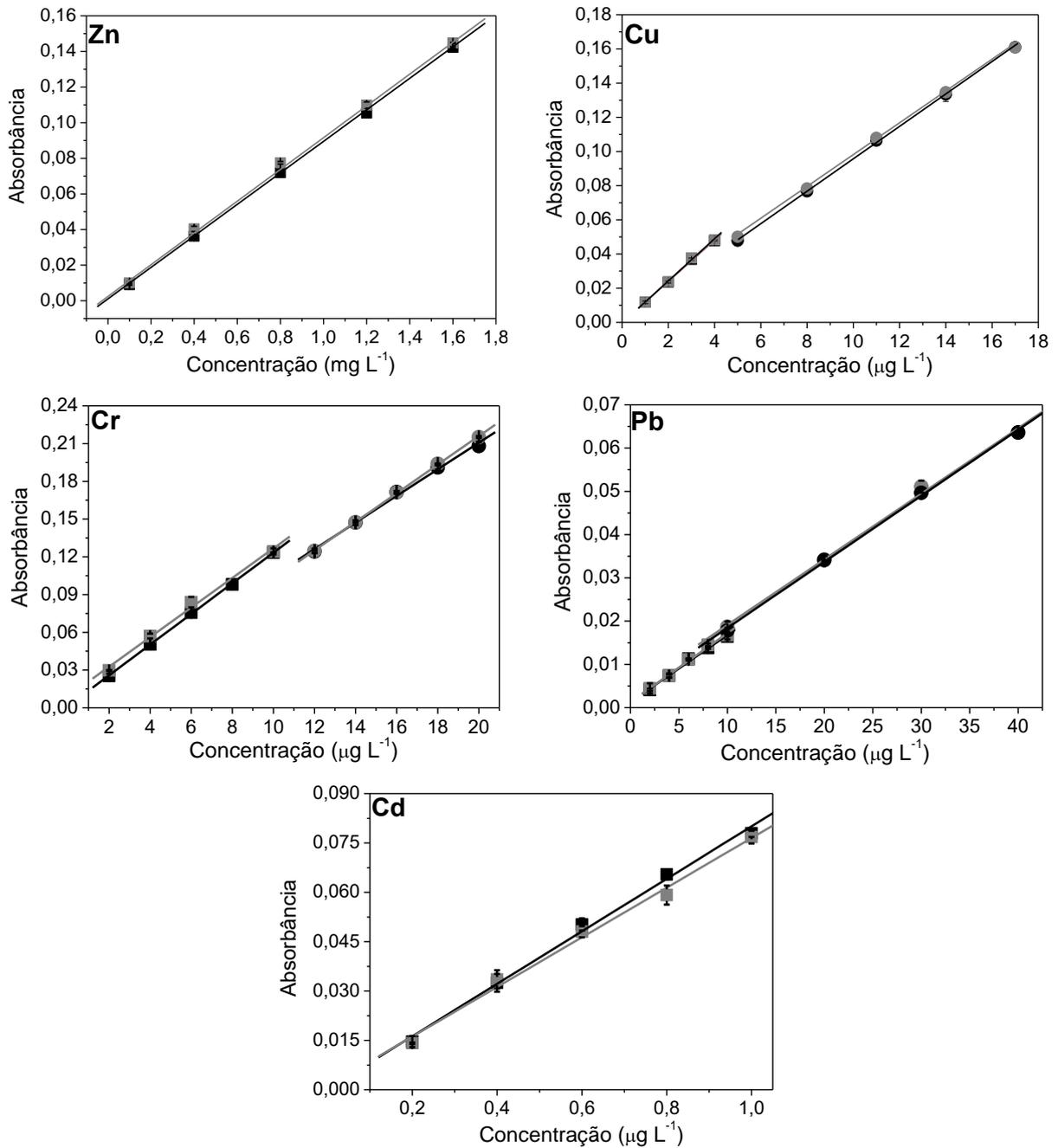
<sup>b</sup>P = Permanência

Após otimização dos procedimentos analíticos, os mesmos foram validados a fim de garantir confiabilidade na determinação direta de Zn, Pb, Cd, Cr e Cu em iogurte por Espectrometria de Absorção Atômica.

### 3.2.4 Estudo de Validação para Determinação de Zn, Cr, Pb, Cu e Cd em Suspensão de Iogurte

As curvas analíticas para Zn, Cu, Cr, Pb e Cd foram construídas com soluções de padrões metálicos sendo preparadas em meio aquoso (curva analítica com padrão externo - PE) e em matriz de iogurte (método de adição de padrão - AP). Isso foi realizado a fim de verificar se a matriz de iogurte poderia interferir na quantificação dos íons metálicos de interesse. Além disso, a possibilidade de trabalhar com duas faixas de concentração foi avaliada para Pb, Cr e Cu, porque estes elementos podem estar presentes em concentrações distintas nas amostras de iogurte. As curvas analíticas construídas para cada metal estudado são apresentadas na Figura 3.6.

**Figura 3.6.** Curvas analíticas para Zn, Cu, Cr, Pb e Cd realizadas por AAS



**Legenda:** PE (curvas em preto) e AP (curvas em cinza);

Faixa de menor concentração (■ e ■) e faixa de maior concentração (● e ●).

As curvas analíticas representadas na Figura 3.6 apresentaram semelhanças, tanto em uma faixa de concentração menor como em uma faixa de concentração maior dos elementos estudados, se comparados os dois meios avaliados (aquoso e suspensão de iogurte).

Os dados obtidos nas curvas de adição de padrão e padrão externo foram utilizados para calcular o coeficiente de regressão linear e de determinação ( $R^2$ ) (Tabela 3.13). Modelos de

regressão linear foram avaliados por meio do *teste F* e teste de falta de ajuste no nível de confiança de 95%. Dados para linearidade dos métodos são apresentados na Tabela 3.13.

**Tabela 3.13.** Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para Zn, Cu, Cr, Pb e Cd

Calibração		Parâmetros de regressão		Avaliação da linearidade			
				Regressão		Falta de ajuste	
		Equação	R <sup>2</sup>	F <sub>reg</sub>	p	F <sub>faj</sub>	p
Zn (0,1-1,6)	PE	A = 0,0011(±0,0012) + 0,0879(±0,0011)xC <sub>Zn</sub>	100,0	14520,8	0,000	5,57	0,070
	AP	A = 0,0068(±0,0017) + 0,0864(±0,0015)xC <sub>Zn</sub>	99,9	5158,4	0,000	2,66	0,184
Cu (1,0-4,0)	PE	A = -0,0003(±0,0006) + 0,0121(±0,0022)xC <sub>Cu</sub>	99,7	3012,5	0,000	2,44	0,167
	AP	A = -0,0005(±0,0011) + 0,0124(±0,0004)xC <sub>Cu</sub>	98,9	816,7	0,000	0,99	0,425
Cu (5,0-17,0)	PE	A = 0,0013(±0,0015) + 0,0094(±0,0001)xC <sub>Cu</sub>	99,7	5456,6	0,000	0,55	0,658
	AP	A = 0,0046(±0,0111) + 0,0093(±0,0001)xC <sub>Cu</sub>	99,9	9699,8	0,000	2,86	0,091
Cr (2,0-10)	PE	A = 0,0014(±0,0009) + 0,0122(±0,0001)xC <sub>Cr</sub>	99,9	8696,2	0,000	1,13	0,420
	AP	A = 0,0091(±0,0034) + 0,0118(±0,0005)xC <sub>Cr</sub>	99,0	473,4	0,000	2,52	0,196
Cr (10,0-20,0)	PE	A = -0,0008(±0,0058) + 0,0106(±0,0004)xC <sub>Cr</sub>	99,0	863,5	0,000	1,95	0,241
	AP	A = -0,0113(±0,0023) + 0,0114(±0,0001)xC <sub>Cr</sub>	99,9	6104,1	0,000	0,49	0,702
Pb (1,0-5,0)	PE	A = 0,00130(±0,00043) + 0,00155(±0,00006)xC <sub>Pb</sub>	98,4	569,5	0,000	2,15	0,213
	AP	A = 0,00131(±0,00058) + 0,00159(±0,00009)xC <sub>Pb</sub>	97,3	326,4	0,000	0,45	0,729
Pb (10,0-40,0)	PE	A = 0,00392(±0,00138) + 0,00152(±0,00005)xC <sub>Pb</sub>	99,2	902,7	0,000	2,33	0,214
	AP	A = 0,00315(±0,00097) + 0,00153(±0,00004)xC <sub>Pb</sub>	99,6	1858,9	0,000	1,27	0,375
Cd (0,2-1,0)	PE	A = -0,00009(±0,00171) + 0,0791(±0,0026)xC <sub>Cd</sub>	99,0	937,9	0,000	1,50	0,322
	AP	A = 0,00074(±0,00148) + 0,0758(±0,0022)xC <sub>Cd</sub>	99,2	1156,9	0,000	4,56	0,068

**Notas:** Unidades das concentrações para Zn é mg L<sup>-1</sup> e para Pb, Cd, Cr e Cu é µg L<sup>-1</sup>

Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança dos coeficientes lineares e angulares

F<sub>crítico</sub> (1;6;0,05) para Regressão = 5,99 e F<sub>crítico</sub> (2;4;0,05) para Falta de ajuste = 6,94 para Zn, Cu e Pb (faixa maior)

F<sub>crítico</sub> (1;8;0,05) para Regressão = 5,32 e F<sub>crítico</sub> (3;5;0,05) para Falta de ajuste = 5,41 para Cr (faixas maiores e menores), Pb (faixa menor) e Cd

F<sub>crítico</sub> (1;8;0,05) para Regressão = 5,32 e F<sub>crítico</sub> (2;6;0,05) para Falta de ajuste = 5,14 para Cu (faixas menores)

F<sub>crítico</sub> (1;13;0,05) para Regressão = 4,67 e F<sub>crítico</sub> (3;10;0,05) para Falta de ajuste = 3,71 para Cu (faixas maiores)

Em relação à Tabela 3.13, para os parâmetros de regressão, é possível verificar que as inclinações entre as curvas analíticas com padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) para todos os metais avaliados, foram similares. Para as curvas estudadas em duas faixas de concentração, Cu foi o que apresentou uma maior diferença entre as faixas de concentração avaliadas (menor e maior). No entanto, as inclinações das curvas de padrão externo e adição de padrão foram similares nas duas faixas de concentração, como já observado. Isso indica que a curva analítica em solução aquosa pode ser usada na quantificação de Zn, Cu, Cd, Pb e Cr em suspensão de iogurte por AAS. Isto apresenta uma grande vantagem para o método, pois aumenta a frequência analítica e o tempo de vida útil dos atomizadores, além de diminuir os custos das análises (DE ANDRADE et al., 2014). A Tabela 3.13, mostra também, o modelo de regressão linear, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), *teste F* e teste de falta de ajuste para as curvas analíticas. Para R<sup>2</sup>, os valores variaram entre 97,3 para 100,0 (ou seja, para r - coeficiente

de correlação – os valores variaram de 0,986 a 1,00), indicando uma relação linear entre o sinal de absorvância e as concentrações dos elementos (ARAÚJO, 2009).

Modelos de regressão linear (Tabela 3.13) foram estudados utilizando *teste F* em um nível de confiança de 95%. Valores de  $F_{reg}$  variaram de 473,44 a 14520,79, sendo que todos os valores de  $F_{reg} \gg F_{crítico}$ . Estes resultados indicam que a regressão linear é significativa para todas as curvas avaliadas. A linearidade das curvas analíticas pode ser confirmada através de testes de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) em um nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de  $F_{faj}$  (0,45 a 5,57) foram menores que os valores de  $F_{crítico}$ , indicando que  $F_{faj}$  não foi significativo no nível de confiança adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, não foi observada falta de ajuste dos modelos lineares construídos, mostrando que a linearidade das curvas analíticas é aceitável.

Neste estudo foram também calculados os valores para LOD e LOQ. A precisão do método foi avaliada pela repetitividade ( $r$ ) e precisão intermediária (PI). Os resultados para estes testes são mostrados na Tabela 3.14.

**Tabela 3.14.** Dados para LOD, LOQ e testes de precisão para o método de determinação direta de Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em iogurte

	Testes de precisão <sup>a</sup>							
	LOD	LOQ	LOD encontrado na literatura (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$r$	PI		Valor Horrat	
	ng g <sup>-1</sup>		RSD %	RSD <sub>r</sub> (ANOVA)	RSD %	RSD <sub>PI</sub> (ANOVA)		
Zn	400,0	1300,0	100 <sup>1</sup>	1,06	3,26	3,34	5,21	0,43
Cu	4,9	16,3	1,5 a 5,0 <sup>2,4</sup>	2,26	6,10	5,33	14,91	0,72
Cr	2,5	8,3	3,8 a 5,0 <sup>2,4</sup>	2,70	3,14	2,51	6,78	0,31
Pb	10,6	35,4	0,4 a 1,9 <sup>3,4</sup>	4,59	6,30	4,86	7,92	0,40
Cd	0,4	1,4	0,4 a 1,5 <sup>2,4</sup>	2,64	4,69	3,78	6,48	0,42

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação;  $r$ : repetitividade; PI: precisão intermediária; DPR: Desvio Padrão Relativo; DPR<sub>r</sub> = Desvio Padrão Relativo para repetitividade obtido pela ANOVA; DPR<sub>PI</sub> = Desvio Padrão Relativo para precisão intermediária obtido pela ANOVA

<sup>a</sup>BRANDÃO et al., 2010<sup>1</sup>; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012<sup>2</sup>; ER et al., 2013<sup>3</sup>; LUIS et al., 2015<sup>4</sup>

Como pode ser observado na Tabela 3.14, os valores de LOD e LOQ para todos os metais foram adequados em relação ao método proposto. Para Zn, Brandão e colaboradores (2010), descreveram um método de determinação direta do metal em iogurte sendo fornecido valores de LOD e LOQ de 100 e 320 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando que no estudo citado é utilizado uma fonte contínua de alta resolução (o que proporciona maior sensibilidade às análises), e em nosso estudo não é utilizada tal fonte, os valores obtidos no presente estudo podem ser considerados adequados.

Para Pb, Cd, Cu e Zn, valores de LOD e LOQ variaram de 0,4 a 10,6 ng g<sup>-1</sup> e 1,4 a 35,4 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Pb apresentou maiores limites devido à baixa inclinação da curva analítica. A comparação dos limites obtidos no presente trabalho em relação a outros de determinação direta destes metais em iogurte, não foi possível por não existirem relatos na literatura. No entanto, em outros trabalhos de determinação de metais traço em iogurte, foram encontrados LOD para os metais de interesse neste trabalho, como mostrado na Tabela 3.14. Os métodos apresentados nestes estudos são em maioria, realizados por ICP OES ou ICP-MS, aliados a métodos tradicionais de abertura de amostra (digestão por via úmida ou por via seca) (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012; ER et al., 2013; LUIS et al., 2015). Os limites de quantificação encontrados variaram de 1,0 a 12,0 µg L<sup>-1</sup> (1,25 a 15,0 ng g<sup>-1</sup>) para os quatro metais traço estudados (LUIS et al., 2015). Essa diferença entre os procedimentos e técnicas utilizadas na determinação de metais em iogurte acabam influenciando nos valores de LOD e LOQ para os métodos. Além disso, a forma como são calculados esses limites também pode proporcionar diferenças significativas nos valores. Limites calculados apenas pelo desvio padrão do controle analítico (branco) podem apresentar menores valores, ou seja, apresentar maior sensibilidade. Por outro lado, utilizando-se o desvio padrão do controle analítico e a inclinação da curva analítica para o metal de interesse, a sensibilidade diminui devido aos erros experimentais relacionados a técnica utilizada no estudo.

Em relação ao teste de precisão, os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (RSD), desvio padrão relativo (RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>PI</sub>) obtido pela ANOVA e valor Horrat, como mostrado na Tabela 3.14. Para todos os metais avaliados, a faixa de RSD variou de 1,06% a 4,59% nos testes de repetitividade (medidas no mesmo dia) e de 2,51% a 5,33% para precisão intermediária (medidas em dias consecutivos). Valores de RSD entre 15-21% são aceitáveis na determinação de metais traço, considerando a faixa de concentração estudada (AOAC, 2012).

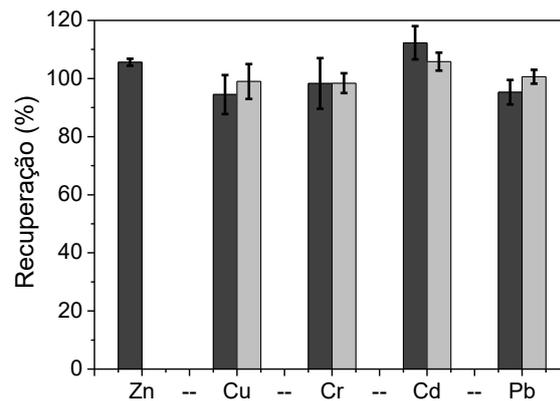
Com a realização de uma análise de variância (ANOVA), foi possível estimar um desvio padrão relativo para a repetitividade (RSD<sub>r</sub>) e precisão intermediária (RSD<sub>PI</sub>). Neste caso, os valores para os testes foram menores que 8% para repetitividade, e menor que 15% para precisão intermediária, o que é considerado adequado já que os limites são 16 e 32% para RSD<sub>r</sub> e DPR<sub>PI</sub>, respectivamente, considerando a faixa de concentração estudada (AOAC, 2012).

A precisão intermediária pode ainda ser estimada em termos de valor Horrat (AOAC, 2012). O resultado obtido para Horrat (Tabela 3.14) variou de 0,31 a 0,72 para os íons metálicos estudados, e considerando que o valor aceitável é <1,3 (GONZÁLEZ, HERRADOR e ASUERO, 2010; AOAC, 2012), pode-se dizer que os valores obtidos são adequados. Assim,

através dos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que os métodos desenvolvidos para determinação de íons metálicos em iogurte apresentaram precisão adequada, com baixa variabilidade entre as medidas realizadas no mesmo dia ou em dias diferentes.

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada por testes de recuperação dos analitos na matriz, em triplicata. Material de referência com concentrações certificadas para iogurte não estavam disponíveis para avaliação da exatidão do método. Inicialmente, as amostras de iogurte foram analisadas por AAS e os metais de interesse (Zn, Cu, Cd, Cr e Pb) foram quantificados. Posteriormente, as amostras de iogurte foram enriquecidas com os íons metálicos em diferentes concentrações: 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Zn; 7,5 e 17,5  $\text{ng g}^{-1}$  para Cd; 100 e 300  $\text{ng g}^{-1}$  para Cu; 125 e 250  $\text{ng g}^{-1}$  para Cr; 125 e 375  $\text{ng g}^{-1}$  para Pb. Os resultados para exatidão são apresentados na Figura 3.7.

**Figura 3.7.** Recuperação de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em suspensão de iogurte



**Legenda:** ■ 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Zn; 7,5 a 125  $\text{ng g}^{-1}$  para Cd, Pb, Cr e Cu e ■ 17,5 a 375  $\text{ng g}^{-1}$  para Cd, Pb, Cr e Cu.

Como pode ser observado na Figura 3.7, as recuperações para Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em iogurte variaram entre  $95 \pm 7\%$  e  $112 \pm 6\%$ . Para Zn foi avaliada apenas uma concentração para recuperação já que a faixa de trabalho para este metal é estreita. Esses resultados de porcentagem de recuperação dos metais em iogurte são adequados, considerando um limite aceitável de 60-115%, levando-se em consideração a faixa de concentração avaliada (AOAC, 2012). Um teste-t foi realizado a fim de verificar a significância entre os valores de recuperação observados e desejados para os metais em iogurte. Os valores de  $t_{\text{calculado}}$ , em relação a porcentagem dos metais, variaram de 0,20 a 3,54. Os valores de  $t_{\text{crítico}}$  a um nível de confiança de 95% foram 4,303 para Cd e Pb e 12,706 para Zn, Cu e Cr. Assim,  $t_{\text{calculado}}$  foi inferior ao  $t_{\text{crítico}}$ , indicando que não houve diferença significativa entre os valores de recuperação obtidos para os metais em iogurte e o valor desejado.

### 3.2.5 Implementação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade *In vitro* de Íons Metálicos em Matrizes Alimentares

Antes de apresentar os resultados obtidos neste estudo, vale ressaltar que durante as etapas experimentais, alguns problemas foram observados na escolha dos procedimentos de bioacessibilidade que seriam aplicados, visto que não existe um procedimento padrão para este tipo de estudo. Nas etapas gástricas e intestinais dos estudos de bioacessibilidade, diversos autores relatam quantidades diferentes de enzimas e sais biliares para o preparo dos sucos, o que acaba dificultando a adoção de um procedimento específico. Assim, neste estudo, os procedimentos avaliados foram baseados no método PBET – testes baseados na extração fisiológica – o qual é muito utilizado para bioacessibilidade, e apresenta resultados adequados (segundo a literatura) em relação às frações bioacessíveis obtidas para os componentes de interesse nas matrizes avaliadas. Além disso, para escolha dos procedimentos de bioacessibilidade, foi levado em consideração a possibilidade do uso dos mesmos em outros estudos, como por exemplo, na área de especiação química. Neste sentido, o uso do procedimento 3 para bioacessibilidade de iogurte foi impossibilitado. Os resultados para curva analítica, controle analítico, e até mesmo das frações bioacessíveis dos íons metálicos foram inadequados para o objetivo do estudo. A diferença entre as inclinações das curvas em meio aquoso e meio enzimático, para o mesmo metal, foram muito diferentes. Em meio enzimático observou-se uma diminuição significativa na inclinação das curvas para Cr, Cu e Zn. As concentrações obtidas para os controles analíticos foram elevadas para todos os metais, o que resulta também em um maior erro nas análises e baixa sensibilidade. Para as frações bioacessíveis, testes iniciais mostraram uma grande interferência das enzimas no processo de digestão, resultando em porcentagens muito maiores que 100%, ou até mesmo de frações muito baixas para os metais da matriz avaliada. Além disso, em estudos paralelos, de especiação química, devido à quantidade elevada de enzimas, observou-se uma precipitação das mesmas durante o procedimento (ocasionada pelo meio ácido requerido nos estudos de especiação). Isso impossibilitaria o uso deste procedimento de bioacessibilidade para o fim específico.

Assim, considerando os aspectos observados acima, optou-se por trabalhar com os procedimentos 1 e 2. Os dois procedimentos investigados nesse trabalho foram escolhidos também, por apresentarem diferença na composição do suco intestinal. Para P1, os sais biliares não estão presentes no suco intestinal. Já P2 é o procedimento de bioacessibilidade mais próximo àqueles apresentados na literatura, com suco intestinal mais complexo, sendo composto por pancreatina, sais biliares e bicarbonato de sódio.

Para estudos de determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em matrizes alimentares, Zn, Cu e Cr foram primeiramente quantificados em frações bioacessíveis de chá-mate e iogurte, visto que menores interferências foram observadas nas análises destes íons metálicos.

Para verificar a melhor forma de calibração, tentando minimizar qualquer efeito de matriz das enzimas na determinação de Cr, Cu e Zn por AAS, foi realizado um estudo com 3 diferentes condições de preparo de curvas analíticas (Tabela 3.15). Os dados obtidos para curvas de padrão externo e em meio enzimático foram utilizados para calcular o coeficiente de regressão linear e de determinação ( $R^2$ ) (Tabela 3.15). Modelos de regressão linear foram avaliados e um teste de falta de ajuste no nível de confiança de 95% foi aplicado aos modelos.

A Tabela 3.15 apresenta os parâmetros de regressão das curvas obtidas para iogurte, em cada condição estudada e para cada metal de interesse.

**Tabela 3.15.** Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em iogurte

Calibração	Parâmetros de regressão			Avaliação da linearidade			
	Equação	$R^2$	Regressão		Falta de ajuste		
			$F_{obs}$	$P$	$F_{faj}$	$P$	
Zn (0,2-0,8)	PE	$A = 0,0079(\pm 0,0008) + 0,150(\pm 0,001) \times C_{Zn}$	99,9	12896,9	0,000	5,21	0,077
	CP1	$A = 0,0086(\pm 0,0023) + 0,152(\pm 0,004) \times C_{Zn}$	99,6	1807,6	0,000	6,77	0,052
	CP2	$A = 0,0074(\pm 0,0014) + 0,158(\pm 0,002) \times C_{Zn}$	99,9	5241,0	0,000	6,22	0,059
Cu (3,0-15,0)	PE	$A = 0,0052(\pm 0,0012) + 0,0084(\pm 0,0001) \times C_{Cu}$	99,8	4773,7	0,000	1,53	0,316
	CP1	$A = 0,0014(\pm 0,0019) + 0,0080(\pm 0,0003) \times C_{Cu}$	97,6	360,0	0,000	0,40	0,760
	CP2	$A = 0,0068(\pm 0,0008) + 0,0081(\pm 0,0001) \times C_{Cu}$	99,9	10231,0	0,000	3,25	0,119
Cr (2,0-10,0)	PE	$A = 0,0057(\pm 0,0024) + 0,0234(\pm 0,0004) \times C_{Cr}$	99,8	4093,1	0,000	2,14	0,213
	CP1	$A = 0,0036(\pm 0,0019) + 0,0221(\pm 0,0003) \times C_{Cr}$	99,7	3136,8	0,000	5,05	0,057
	CP2	$A = 0,0051(\pm 0,0013) + 0,0223(\pm 0,0002) \times C_{Cr}$	99,9	12712,5	0,000	3,15	0,125

**Notas:** Unidades das concentrações para Zn é  $mg L^{-1}$  e para Cr e Cu é  $\mu g L^{-1}$

Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança dos coeficientes lineares e angulares

$F_{crítico} (1;6;0,05)$  para Regressão = 5,99 e  $F_{crítico} (2;4;0,05)$  para Falta de ajuste = 6,94 para Zn

$F_{crítico} (1;8;0,05)$  para Regressão = 5,32 e  $F_{crítico} (3;5;0,05)$  para Falta de ajuste = 5,41 para Cr e Cu

Em relação a Tabela 3.15, para os 3 metais avaliados, os parâmetros de regressão mostraram que as inclinações entre as curvas analíticas com padrão externo (PE) e em meio enzimático para os dois procedimentos de bioacessibilidade avaliados (CP1 e CP2) foram similares. Isso indica a possibilidade do uso da curva de padrão externo na quantificação das frações bioacessíveis de Zn, Cu e Cr a partir do iogurte.

A Tabela 3.15, mostra também, o modelo de regressão linear, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e os valores de  $F_{reg}$  e  $F_{faj}$  para as curvas analíticas. Para  $R^2$ , os valores variaram entre 97,6 para 99,9 (ou seja, para  $r$  - coeficiente de correlação - valores variaram de

0,988 a 0,999), indicando uma relação linear entre o sinal de absorvância e as concentrações dos elementos (ARAÚJO, 2009).

Modelos de regressão linear foram estudados utilizando *teste F* em um nível de confiança de 95%. Valores de  $F_{reg}$  variaram de 360,02 a 12896,94, sendo que todos os valores de  $F_{reg} \gg F_{crítico}$ . Estes resultados indicam que a regressão linear foi significativa para todas as curvas avaliadas. A linearidade das curvas analíticas pode ser confirmada através de um teste de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) em um nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de  $F_{faj}$  (0,07 a 6,77) foram menores que os valores de  $F_{crítico}$ , indicando que  $F_{faj}$  não foi significativo no nível de confiança adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, não foi observado falta de ajuste dos modelos lineares construídos, mostrando que as curvas analíticas apresentaram linearidade em toda a faixa de concentração investigada.

Com a avaliação e escolha da melhor forma de calibração para os metais de interesse no estudo de bioacessibilidade, foi possível calcular o LOD e LOQ para os mesmos. Os valores obtidos para os metais estudados nas diferentes matrizes alimentares, pelos dois procedimentos de bioacessibilidade avaliados, são mostrados na Tabela 3.16.

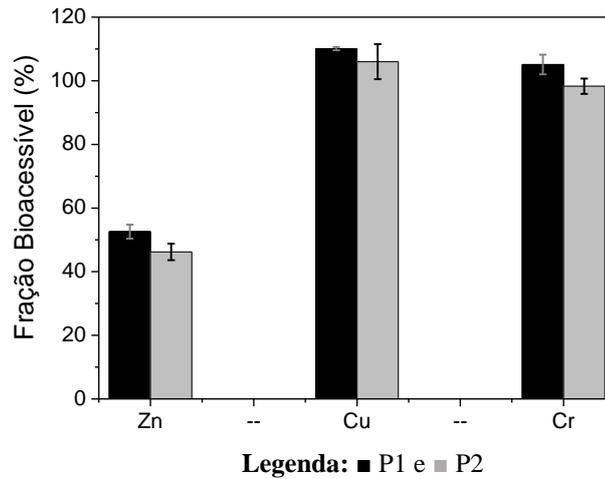
**Tabela 3.16.** Valores de LOD e LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ ) obtidos para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em iogurte para P1 e P2

Íon metálico	Iogurte			
	P1		P2	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Zn	54,4	181,2	37,7	125,7
Cu	5,7	19,1	7,8	26
Cr	1,8	5,9	1,2	4,2

De modo geral, para bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr a partir do iogurte, valores para LOD e LOQ foram similares entre os dois procedimentos estudados. Considerando a complexidade do meio extrator da fração bioacessível, os LOD e LOQ podem ser considerados adequados.

Após a avaliação das curvas analíticas e dos LOD e LOQ, um estudo de bioacessibilidade, prévio às análises em matrizes alimentares, foi realizado em meio aquoso, a fim de verificar a interação entre os metais e as enzimas presentes nos procedimentos avaliados. Para isso, soluções foram preparadas com solução de padrão metálico –  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  para Zn e  $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para Cu e Cr - em meio aquoso. A Figura 3.8 apresenta o gráfico da fração bioacessível para Zn, Cr e Cu em solução aquosa obtido para os dois procedimentos de bioacessibilidade avaliados, P1 (BERMEJO et al., 2002) e P2 (STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014).

**Figura 3.8.** Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr em solução aquosa (n=3), quantificada por AAS



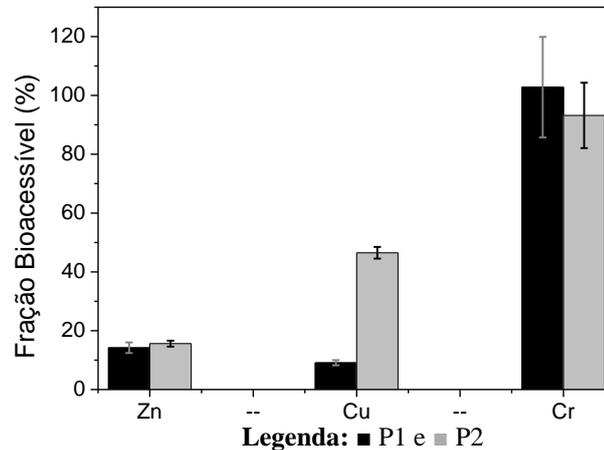
Com relação à Figura 3.8, na solução aquosa simulada (enriquecida com os íons metálicos), para Cu e Cr não foram observadas diferenças entre os procedimentos de bioacessibilidade avaliados, e as frações bioacessíveis foram próximas a 100%, indicando que não existe interferência do meio enzimático na bioacessibilidade destes metais. Já para Zn, verificou-se que apesar de não haver diferença entre os procedimentos avaliados, para ambos, a fração bioacessível foi próxima a 50%, indicando que existe uma interação entre as enzimas utilizadas nos procedimentos e o íon metálico de interesse. Isso já é esperado, considerando que o Zn é conhecido por atuar como um fator de ativação de diversas enzimas (SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006). Provavelmente, essa característica do Zn tenha contribuído para diminuição da fração bioacessível em solução, onde boa parte do metal torna-se indisponível para ser absorvido pelo organismo. Isso indica que nos cálculos da bioacessibilidade de Zn em alimentos, é necessário descontar essa fração que não é bioacessível, demonstrando essa interação das enzimas com o “metal livre”.

Após esse estudo com solução aquosa simulada, foi realizada a quantificação das frações bioacessíveis de Cr, Cu e Zn em iogurte. Porém, antes de verificar a fração bioacessível, os metais foram quantificados em suspensão de iogurte, conforme os estudos realizados neste trabalho.

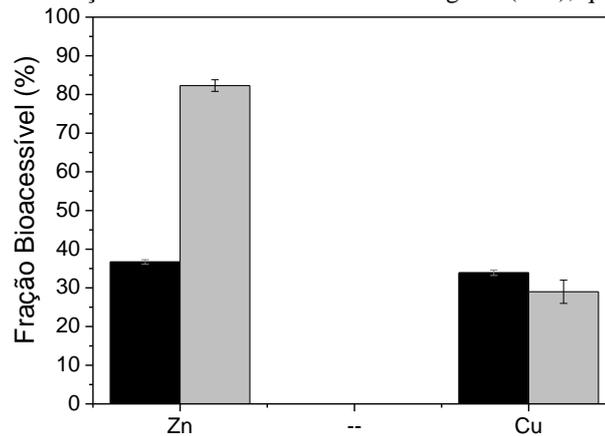
Brevemente, para iogurte, a suspensão foi preparada com 40 g L<sup>-1</sup> de iogurte, 0,2 mol L<sup>-1</sup> de HCl e 1 min de agitação ultrassônica. A suspensão foi injetada diretamente no equipamento para determinação de Zn por FAAS. Para determinação de Cu e Cr, 20 µL da suspensão de iogurte foi injetada diretamente no tubo de grafite para análise por GF AAS. A quantificação das frações bioacessíveis foi realizada por AAS utilizando as mesmas condições de análise que foram usadas para a determinação da concentração total de metais em iogurte.

Para iogurte, as concentrações médias de Zn, Cu e Cr encontradas foram de  $6,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $60$  e  $9,7 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. As frações bioacessíveis para iogurte após procedimentos de bioacessibilidade *in vitro* são mostradas na Figura 3.9.

**Figura 3.9.** Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr do iogurte (n=3), quantificada por AAS



Na Figura 3.9, observa-se que a bioacessibilidade para Cr de iogurte foi próxima a 100%, sendo similar entre os dois procedimentos avaliados. Para Cu, uma fração bioacessível maior foi observada para P2 (>46%) se comparado a P1 (próximo a 9%). Para Zn em iogurte foi observada uma bioacessibilidade baixa (<16), sendo observada uma grande interferência da matriz do iogurte nos procedimentos *in vitro*. Neste sentido, observando as diferenças entre os procedimentos para bioacessibilidade de Cu em iogurte, e a interferência na bioacessibilidade de Zn em iogurte, testes foram realizados reduzindo a quantidade de iogurte utilizada no procedimento 1 de  $666,7$  para  $133 \text{ g L}^{-1}$  e no procedimento 2 de  $500$  para  $100 \text{ g L}^{-1}$ , isso nas soluções iniciais, antes da realização do procedimento de bioacessibilidade. O resultado para este estudo é apresentado na Figura 3.10.

**Figura 3.10.** Fração bioacessível de Cu e Zn do iogurte (n=3), quantificada por AAS

**Nota:** Concentração inicial de Zn:  $6,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ; e Cu:  $94 \text{ ng g}^{-1}$

**Legenda:** ■ P1 e ■ P2

Observando-se a Figura 3.10, para Cu, verificou-se uma similaridade entre as frações bioacessíveis obtidas pelos dois procedimentos *in vitro* avaliados.

Para Zn, pode-se verificar que para P1, uma menor quantidade das enzimas presentes nos sucos gástrico e intestinal, não auxiliou na disponibilidade dos metais ao final da digestão enzimática. Para este procedimento, a bioacessibilidade foi menor que 37%, sem considerar a fração não disponível apresentada pela solução simulada, como já citado. A complexidade da matriz do iogurte pode ter dificultado a atuação dos sucos gástrico e intestinal durante a digestão enzimática, interferindo assim, na bioacessibilidade de Zn. O uso de um suco intestinal mais simples (constituído apenas de pancreatina e  $\text{NaHCO}_3$ ) pode também ter influenciado neste resultado.

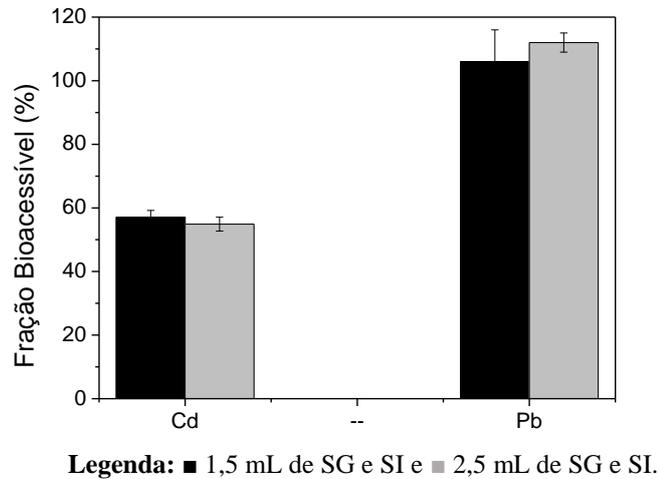
Já para P2, as frações bioacessíveis para Zn foram de 82%, muito maior do que a apresentada para o metal anteriormente (em maior concentração de iogurte). Considerando a diminuição deste valor em relação ao controle obtido pela solução simulada (em meio aquoso) para P2 (54%), a bioacessibilidade real do metal fica próxima a 28%. O uso de um suco intestinal mais complexo (constituído de pancreatina, sais biliares e  $\text{NaHCO}_3$ ), pode ter contribuído para um aumento na fração bioacessível do metal. Com base na literatura, sabe-se que a presença de sais biliares é importante para o processo de digestão de alimentos pelo organismo humano. A biliar atua na digestão de lipídeos emulsionando gorduras alimentares em pequenas gotas promovendo atividade da lipase pancreática (GUERRA et al., 2012). Além disso, o conjunto presente no suco intestinal (pancreatina, sais biliares e  $\text{NaHCO}_3$ ) é responsável pela quebra de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, tornando-as mais favoráveis para absorção (INTAWONGSE e DEAN, 2006).

Considerando os pontos citados e os resultados obtidos neste estudo, o procedimento 2 foi escolhido para determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em iogurte. Como já foi dito anteriormente, esse procedimento é mais complexo e mais próximo do processo natural de digestão humana. A maioria dos estudos sobre bioacessibilidade, apresentados na literatura, utilizam o suco intestinal com pancreatina e sais biliares, considerando que isso facilita a absorção de nutrientes para o organismo (WANG et al., 2011; HU et al., 2013; TOKALIOĞLU et al., 2014).

Após a escolha do procedimento P2 para a determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em iogurte, ele foi testado na determinação das frações bioacessíveis de Pb e Cd na matriz.

Inicialmente, realizou-se o procedimento de bioacessibilidade para soluções aquosas contendo o padrão metálico dos elementos, a fim de verificar a interação das enzimas com os metais livres em solução. Para isso, soluções foram preparadas com 0,5 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd e Pb, respectivamente. No entanto, os resultados obtidos não foram adequados. O sinal de fundo (BG) obtido na determinação dos metais era muito superior ao sinal analítico dos mesmos, indicando um sério problema de interferência das enzimas na análise por GF AAS. Além disso, encontrou-se muita dificuldade na construção da curva analítica para os metais. Mesmo sendo construída na presença das enzimas utilizadas no procedimento *in vitro*, as curvas não apresentavam sinais adequados (tanto para absorvância quanto para BG). A fim de tentar solucionar esse problema, vários testes em relação ao programa de aquecimento do forno de grafite (temperatura e tempo de rampa e permanência) foram realizados. No entanto, não foi observada nenhuma melhora nos resultados. Por fim, resolveu-se testar a adição de  $\text{HNO}_3$  (na mesma concentração otimizada para determinação total de Pb e Cd em suspensão de iogurte – 0,6 mol  $\text{L}^{-1}$ ) na solução de iogurte, após o procedimento de bioacessibilidade, e nas curvas analíticas para cada metal. O uso de  $\text{HNO}_3$  poderia auxiliar na atomização destes metais, considerando que no procedimento de bioacessibilidade apenas HCl é utilizado, e como já citado anteriormente esse ácido não favorece a atomização de elementos voláteis como Pb e Cd. O procedimento de bioacessibilidade também foi modificado. Além do procedimento utilizando 2,5 mL de sucos gástrico (SG) e intestinal (SI), um procedimento também foi testado utilizando 1,5 mL dos sucos nas etapas da digestão. Uma menor concentração das enzimas poderia diminuir os sinais de fundo para as amostras. Os resultados para estes testes são mostrados na Figura 3.11.

**Figura 3.11.** Fração bioacessível de Pb e Cd em solução aquosa (padrão metálico) (n=3), quantificada por GF AAS



Na Figura 3.11 é possível verificar que houve uma similaridade entre as frações bioacessíveis para os dois metais avaliados, o que demonstra que a quantidade de enzima não influenciou no processo. Ou seja, a redução dos sucos gástrico e intestinal, não interferiu na bioacessibilidade dos metais a partir da solução aquosa. Para Cd, as frações bioacessíveis foram próximas a 55%, demonstrando que 45% do metal livre não está disponível para absorção intestinal. Já para Pb foi observada uma bioacessibilidade total (100%) em solução aquosa. Apesar de não ser observada diferença entre as frações bioacessíveis dos metais em diferentes concentrações de enzimas do procedimento *in vitro*, o sinal de fundo (BG) para Pb foi aproximadamente 2,5 vezes maior quando utilizado um maior volume de suco gástrico e intestinal, ou seja, uma maior concentração de enzimas no procedimento. Para Cd, esse aumento foi de 1,7 vezes quando os sinais de BG para ambos procedimentos foram comparadas. Assim, considerando a complexidade da matriz estudada, para Pb e Cd resolveu-se trabalhar com adição de 1,5 mL de suco gástrico e intestinal para a digestão enzimática de iogurte.

Do mesmo modo que para Zn, Cu e Cr, as curvas analíticas com padrão externo (PE) e em meio enzimático (PB) foram avaliadas a fim de verificar qualquer efeito das enzimas na determinação de Pb e Cd por GF AAS. Os dados obtidos para as curvas analíticas foram utilizados para calcular o coeficiente de regressão linear e de determinação ( $R^2$ ). Modelos de regressão linear foram avaliados e um teste de falta de ajuste foi aplicado no nível de confiança de 95%. A Tabela 3.17 apresenta os parâmetros de regressão das curvas obtidas para o procedimento de digestão enzimática de iogurte, em cada condição estudada e para cada metal de interesse.

**Tabela 3.17.** Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Pb e Cd em iogurte por GF AAS

Calibração		Parâmetros de regressão		Avaliação da linearidade			
				Regressão		Falta de ajuste	
		Equação	R <sup>2</sup>	F <sub>reg</sub>	p	F <sub>faj</sub>	p
Cd (0,2-1,0 µg L <sup>-1</sup> )	PE	A = 0,0005(±0,0008) + 0,0706(±0,0012)xC <sub>Cd</sub>	99,6	3489,1	0,000	3,56	0,055
	PB	A = 0,0018(±0,0012) + 0,0928(±0,0019)xC <sub>Cd</sub>	99,4	2450,8	0,000	0,26	0,851
Pb (2,0-8,0 µg L <sup>-1</sup> )	PE	A = - 0,00110(±0,0004) + 0,00197(±0,00007)xC <sub>Pb</sub>	98,7	839,2	0,000	0,47	0,643
	PB	A = - 0,00093(±0,00019) + 0,00145(±0,00003)xC <sub>Pb</sub>	99,4	1800,3	0,000	1,85	0,218

**Nota:** Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança dos coeficientes lineares e angulares

F<sub>crítico</sub> (1;10;0,05) para Regressão = 4,96 e F<sub>crítico</sub> (2;8;0,05) para Falta de ajuste = 4,46 para Pb

F<sub>crítico</sub> (1;13;0,05) para Regressão = 4,67 e F<sub>crítico</sub> (3;10;0,05) para Falta de ajuste = 3,49 para Cd

Para Pb e Cd, na Tabela 3.17, é possível verificar que existe uma diferença significativa entre as inclinações das curvas analíticas em padrão externo e em meio enzimático. Em meio enzimático, para Cd, houve um aumento da inclinação da curva analítica se comparada a curva com padrão externo. Já para Pb, observou-se uma maior sensibilidade para a curva com padrão externo em relação a curva em meio enzimático. Isso indica que a quantificação destes metais nas frações bioacessíveis de iogurte deve ser realizada em curva simulada com os sucos gástrico e intestinal do procedimento estudado.

A Tabela 3.17, mostra também o modelo de regressão linear, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), e os valores de F<sub>reg</sub> e F<sub>faj</sub> para as curvas analíticas. Para R<sup>2</sup>, os valores variaram entre 98,7 para 99,6, indicando uma relação linear entre o sinal de absorvância e as concentrações dos elementos (ARAÚJO, 2009).

Modelos de regressão linear foram estudados em um nível de confiança de 95%. Valores de F<sub>reg</sub> variaram de 839,2 a 3489,1, sendo que todos os valores de F<sub>reg</sub> >> F<sub>crítico</sub>. Estes resultados indicam que a regressão linear é significativa para todas as curvas avaliadas. A linearidade das curvas analíticas pode ser confirmada através de testes de falta de ajuste (F<sub>faj</sub>) em um nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de F<sub>faj</sub> (0,26 a 3,56) foram menores que os valores de F<sub>crítico</sub>, indicando que F<sub>faj</sub> não foi significativo no nível de confiança adotado (p > 0,05). Assim, foi confirmada a linearidade das curvas analíticas, não sendo observado falta de ajuste dos modelos lineares construídos.

Após a avaliação das curvas analíticas, foi possível verificar o LOD e LOQ para Pb e Cd determinados em iogurte após a digestão enzimática. Os valores para LOD foram 0,25 e 2,21 ng g<sup>-1</sup> para Cd e Pb, respectivamente. Para o LOQ, Cd e Pb apresentaram valores de 0,83 e 7,36 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores podem ser considerados adequados devido à complexidade do meio extrator avaliado.

Tendo-se definido as melhores condições de quantificação das frações bioacessíveis de Zn, Cr, Cu, Pb e Cd em iogurte, os procedimentos de bioacessibilidade puderam ser avaliados na matriz de interesse.

### 3.2.6 Determinação da Concentração Total de Metais Traço em Suspensão de Iogurte

O método de amostragem em suspensão e os ensaios de bioacessibilidade *in vitro* foram aplicados para a determinação de Zn, Cu, Cd, Cr e Pb em amostras de iogurte comerciais. Foram utilizados diferentes tipos de iogurte, incluindo: iogurte natural, com sabor, integral, semi-desnatado, desnatado, e de soja. Ao total, foram avaliadas 25 amostras de iogurte de 6 diferentes marcas (ver Tabela 3.5). Os resultados obtidos para concentração dos íons metálicos de interesse estão apresentados na Tabela 3.18.

**Tabela 3.18.** Quantificação das concentrações totais de Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em iogurte (n=3), empregando amostragem em suspensão por AAS

Amostra	Marca	Tipo <sup>a</sup>	Descrição	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Cr ( $\text{ng g}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Cd ( $\text{ng g}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Pb ( $\text{ng g}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
A1 L1	A	I	Natural	5,62±0,02	64±1	<8,3	<1,4	<35,4
A1 L2	A	I	Natural	6,2±0,2	67±10	<8,3	<1,4	<35,4
A2	A	PD	Morango	4,41±0,04	69±8	<8,3	1,6±0,3	<35,4
A3 L1	A	PD	Morango - pronto para beber	3,40±0,02	66±3	<8,3	5,0±0,2	37±12
A3 L2	A	PD	Morango - pronto para beber	2,66±0,04	30±1	9,230±0,001	<1,4	<35,4
A4	A	D	Morango 0 lactose	3,7±0,3	58±1	<8,3	<1,4	<35,4
A5	A	I	Baunilha com Geléia de maçã e canela	3,10±0,05	83±3	<8,3	<1,4	<35,4
B1	B	D	Natural	5,5±0,1	74±2	<8,3	<1,4	<35,4
B2	B	D	Mel	4,76±0,05	78±6	<8,3	<1,4	<35,4
B3	B	I	Morango com mirtilo - grego	6,19±0,06	111±6	<8,3	<1,4	<35,4
C1	C	D	Natural	6,2±0,4	84,2±3	<8,3	<1,4	<35,4
C2	C	I	Polpa de ameixa	3,45±0,03	175±3	<8,3	<1,4	<35,4
C3	C	I	Pedacço de lichia	3,5±0,1	198±1	<8,3	<1,4	<35,4
C4	C	I	Morango - grego	4,0±0,1	102±5	9±2	<1,4	<35,4
C5	C	D	Morango - soja	3,7±0,2	806±13	9±2	1,7±0,2	<35,4
D1	D	PD	Mel	3,64±0,08	51±2	<8,3	<1,4	<35,4
D2	D	I	Morango enriquecido com Zn e Ca	25,6±0,5	59±10	14±4	1,7±0,1	<35,4
D3	D	I	Salada de frutas enriquecido com Zn e Ca	24,1±0,1	57±5	13±2	<1,4	<35,4
D4	D	I	Maçã e banana enriquecido com Zn e Ca	30,3±0,3	68±3	15,7±0,4	<1,4	<35,4
E1	E	I	Creme/calda de frutas vermelhas - grego	5,40±0,001	75±6	<8,3	<1,4	<35,4
E2	E	I	Creme/calda de frutas vermelhas 0 lactose - grego	4,9±0,1	64±9	<8,3	2,16±0,02	<35,4
E3	E	D	Creme e preparado de fruta	6,93±0,08	47±6	<8,3	<1,4	<35,4
F1	F	I	Morango	4,05±0,02	40±3	9,0±0,7	<1,4	<35,4
F2	F	I	Frutas vermelhas - pronto para beber	2,53±0,02	36±2	9,99±0,01	<1,4	<35,4
F3	F	I	Morango - pronto para beber	6,82±0,007	24±4	10,6±0,5	<1,4	<35,4
Média Geral				7±8	103±151	11±3	2±1	37±12
LOQ				1,3	16,3	8,3	1,4	35,4

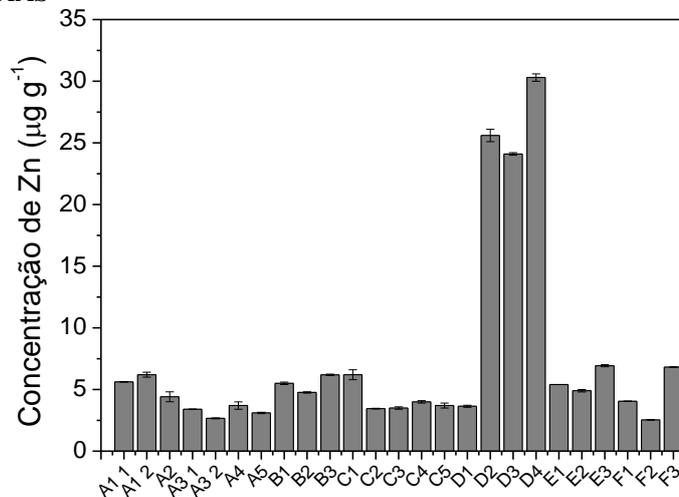
<sup>a</sup>Tipo: I = Integral; PD = Parcialmente Desnatado; D = Desnatado

<sup>b</sup>A Média foi calculada considerando apenas as amostras que tiveram concentrações quantificadas de metais

A Tabela 3.18, apresenta as 25 amostras avaliadas. Para a marca A foram avaliadas 2 amostras (A1 e A3) em lotes diferentes a fim de verificar se havia, ou não, variações em relação à concentração dos metais ou nas frações bioacessíveis dos mesmos. Zn e Cu puderam ser quantificados em todas as amostras avaliadas. Já Cr, Cd e Pb foram quantificados em menos de 40% das amostras.

A Figura 3.12 apresenta o gráfico das concentrações de Zn quantificadas nas 25 amostras de iogurte.

**Figura 3.12.** Concentrações totais de Zn determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e FAAS



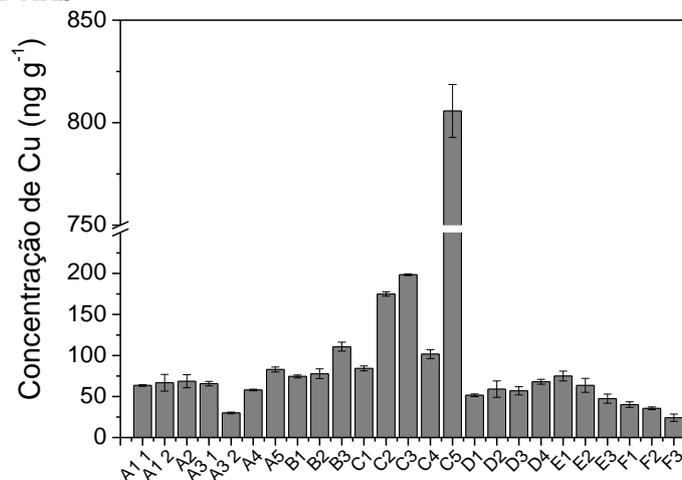
Para Zn, as concentrações em iogurte variaram de  $2,66 \pm 0,04$  a  $30,3 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ . De modo geral, as concentrações médias foram muito próximas, sendo que a marca D foi a que apresentou a média mais elevada (Tabela 3.18). Isso está associado ao fato das amostras D2-D4 serem enriquecidas com Zn (na forma de sulfato de zinco). Essa diferença nas concentrações de Zn para as três amostras da marca D, também foi evidenciada na Figura 3.12, onde as demais amostras apresentaram certa similaridade para a concentração do metal. Segundo a tabela nutricional disponível para estas amostras, a concentração de Zn indicada é de  $2,6 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de iogurte. Na quantificação realizada nestas amostras, as concentrações de Zn encontradas variaram de  $2,41$  a  $3,03 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de iogurte, próximo ao valor tabelado. Para as amostras de iogurte natural integral (A1 L1 e A1 L2) as concentrações foram similares. Essas concentrações também foram similares às apresentadas pelas amostras de iogurte natural desnatado (B1 e C1). Para as amostras de iogurte do tipo “grego” (B3, C4, E1 e E2) as concentrações variaram de  $4,0 \pm 0,1$  a  $6,19 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$  e foram similares às apresentadas pelas outras amostras avaliadas (iogurte integral ou desnatado). Estes dados são concordantes com os apresentados na literatura.

Brandão et al. (2010) encontraram concentrações de Zn em iogurte brasileiro entre 2,12 e 4,82  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Llorent-Martínez et al. (2012) avaliaram amostras de iogurte da Espanha e encontraram concentrações para Zn na faixa de 1,5 a 4,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Essas concentrações também são comparáveis aquelas disponibilizadas na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), sendo que para Zn, nas amostras avaliadas, foram encontradas concentrações de 3 a 5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (NEPA, 2011). Assim, os resultados encontrados neste estudo indicam que a amostragem em suspensão foi um método eficiente para a quantificação de Zn em iogurte utilizando FAAS.

Em relação aos metais traço, as concentrações de Cu, Cr, Cd e Pb determinadas nas amostras de iogurte variavam de  $<1,4$  (Cd) a  $806 \pm 13 \text{ ng g}^{-1}$  (Cu), como mostrado na Tabela 3.18.

Assim como para Zn, Cu foi quantificado em todas as amostras de iogurte avaliadas. A Figura 3.13 apresenta o gráfico das concentrações de Cu quantificadas em iogurte.

**Figura 3.13.** Concentrações totais de Cu determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS

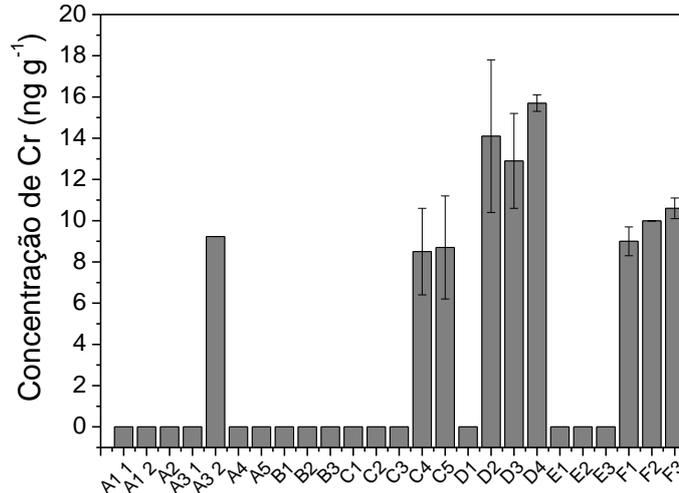


As concentrações de Cu em iogurte variaram de  $24 \pm 4$  a  $806 \pm 13 \text{ ng g}^{-1}$ , como mostrado na Tabela 3.18. De modo geral, as concentrações foram similares entre as marcas avaliadas, sendo que a marca C foi a que apresentou amostras de iogurte com as maiores concentrações de Cu, tanto para as amostras saborizadas ou com adição de frutas, quanto para a amostra de iogurte integral. Além disso, essa marca, se comparada às demais, foi a que apresentou maior variabilidade entre as amostras avaliadas, como mostrado na Figura 3.13. Para esta marca, ganha destaque a amostra C5 (iogurte de soja), a qual apresentou a maior concentração do metal. Estudos como o proposto por Llorent-Martínez e colaboradores (2012), relatam que iogurtes a base de soja podem apresentar concentrações de Cu 7,5 vezes maiores do que iogurtes

produzidos com leite (máximo de  $180 \text{ ng g}^{-1}$  de Cu em iogurte de leite e máximo de  $1350 \text{ ng g}^{-1}$  de Cu em iogurte de soja). Isso se deve a grande disponibilidade deste metal na região agrícola devido a sua presença em fertilizantes e adubos em geral. No presente estudo, pode-se notar concentrações de Cu 13 vezes maiores em iogurte de soja, quando comparados com iogurte produzido com leite bovino. Na literatura, para iogurte produzido com leite, são apresentadas concentrações de Cu na faixa de  $35,0$  a  $290,0 \text{ ng g}^{-1}$  (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012; LUIS et al., 2015). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), em amostras de iogurte podem ser encontradas concentrações de  $200 \text{ ng}$  de Cu em  $1 \text{ g}$  de iogurte (NEPA, 2011).

A Figura 3.14 apresenta o gráfico das concentrações de Cr quantificadas em iogurte.

**Figura 3.14.** Concentrações totais de Cr determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS

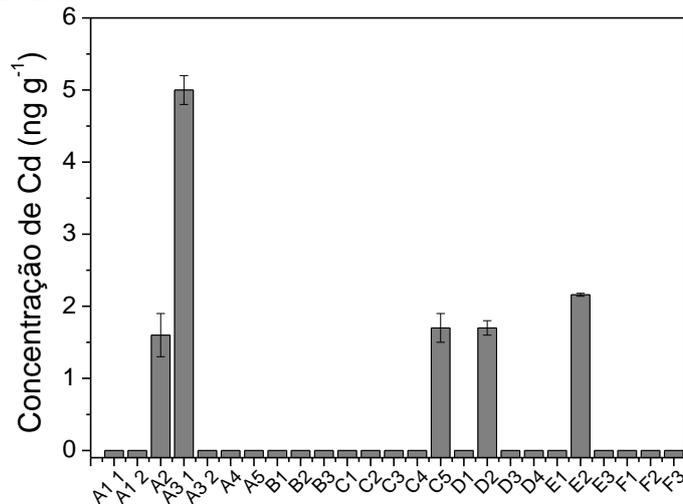


Para Cr, 36% das amostras de iogurte foram quantificadas, sendo que as marcas D e F foram as que tiveram Cr presente na maioria das amostras avaliadas, como observado na Figura 3.14. De modo geral, as concentrações do metal em iogurte foram próximas entre as amostras, sendo que estas variaram de  $8,5 \pm 2,1$  a  $15,7 \pm 0,4 \text{ ng g}^{-1}$ . Para a marca D, as amostras de D2 a D4 foram as que apresentaram maior concentração de Cr. Essas amostras são enriquecidas com Zn e Ca, podendo sugerir que durante o enriquecimento das mesmas com estes nutrientes, pode estar acontecendo algum processo de contaminação por Cr. Além disso, a matéria-prima de origem destes iogurtes pode contribuir com essas concentrações do metal. A amostra C5 (iogurte de soja), também apresentou quantidade significativa de Cr o que pode estar relacionado com o cultivo da soja. O fato de Cr muitas vezes ser encontrado em fertilizantes agrícolas, e estes serem amplamente utilizados em culturas como a da soja, pode contribuir para

acumulação do metal no produto e nos derivados do mesmo (JUNIOR, LUCHESE e LENZI, 2000; NACKE et al., 2013).

Para metais sem função biológica conhecida, como Cd e Pb, também foi possível verificar a presença dos mesmos em amostras de iogurte. A Figura 3.15 mostra as concentrações de Cd quantificadas em amostras de iogurte.

**Figura 3.15.** Concentrações totais de Cd determinadas em amostras de iogurte utilizando amostragem em suspensão e GF AAS



Para Cd, apenas 5 amostras puderam ser quantificadas, sendo que as concentrações foram menores que 5 ng g<sup>-1</sup> (Tabela 3.18). A maior concentração do metal foi apresentada pela amostra A3 L1 (Figura 3.15), que foi a única amostra que apresentou Pb quantificável em iogurte. Novamente a presença de metais tóxicos, a exemplo de Pb e Cd, demonstra a possibilidade de contaminação do alimento em alguma etapa da industrialização do mesmo. A amostra C5, de iogurte de soja, também apresentou concentração quantificável de Cd. Este tipo de resultado tem sido observado em outros estudos, que indicam maior presença de metais traço, principalmente metais tóxicos, em iogurtes produzidos com soja (LLORENT-MARTINEZ et al., 2012). De maneira similar ao Cr, o Cd também pode ser encontrado em fertilizantes agrícolas, sendo que quantidades traço podem ser acumuladas nas mais diversas plantações, a exemplo da soja, tornando-se assim, presente nos seus produtos derivados.

A concentração de Pb em todas as amostras estudadas ficou abaixo do limite de quantificação do método proposto, com exceção da amostra A3 L1, a qual apresentou concentração de  $37 \pm 12$  ng g<sup>-1</sup>. A presença de Pb em amostras de iogurte pode estar relacionada, provavelmente, com a origem da matéria-prima do alimento, ou com processos de contaminação durante a industrialização do mesmo. Quantificações de metais traço em

suspensão de iogurte, realizadas em outros períodos deste trabalho, demonstraram a presença de Pb em iogurte com concentrações de até  $114 \pm 8 \text{ ng g}^{-1}$  (DE ANDRADE et al., 2018). Isso sugere que pode existir algum processo de contaminação do iogurte por Pb, e que essa contaminação pode ser sazonal, estando relacionada, possivelmente, com épocas em que o uso de fertilizantes e/ou agroquímicos é mais intensificado em regiões agrícolas e pecuárias.

Na literatura, as concentrações de Pb, Cd e Cr em iogurte podem ser encontradas na faixa de 1,0 a 126,0  $\text{ng g}^{-1}$ ; 0,1 a 118,0  $\text{ng g}^{-1}$ ; e 20,0 a 75,0  $\text{ng g}^{-1}$ , respectivamente (KAYA, AKDENIZ e YAMAN, 2008; ABDULKHALIQ et al., 2012; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012; ER, SENKAL e YAMAN, 2013; LUIS et al., 2015). A variabilidade na concentração dos metais estudados em amostras de iogurte de diferentes países pode ser explicada pela diferença na pecuária e agricultura desenvolvida no país, além do processamento do produto de interesse.

Devido à quantidade significativa de amostras avaliadas, uma análise quimiométrica mais aprofundada se faz necessária a fim de verificar a relação entre as amostras e as concentrações dos metais avaliados.

### 3.2.7 Análise Estatística das Concentrações Totais de Metais em Iogurte empregando Análise dos Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais (PCA) é uma ferramenta quimiométrica baseada em um projeto de dados multidimensionais que são dispostos em diferentes coordenadas de um gráfico, dependendo da variância máxima e da correlação mínima entre esses dados. Os dados experimentais podem ser transformados em gráficos, conhecidos como gráficos de escores, dentro de coordenadas 2D ou 3D. No gráfico de escores, os grupos de valores formados podem ser usados na classificação/separação de amostras com dados similares (WEI et al., 2010). A PCA é um método que visa à análise exploratória de dados, reduzindo a dimensionalidade de um conjunto de dados, mas preservando ao máximo a variabilidade dos mesmos (JOLLIFFE e CADIMA, 2016). Assim, os fatores principais (PCs) identificados devem melhor explicar a variabilidade que possa existir na matriz dos dados (PELLERANO et al., 2012).

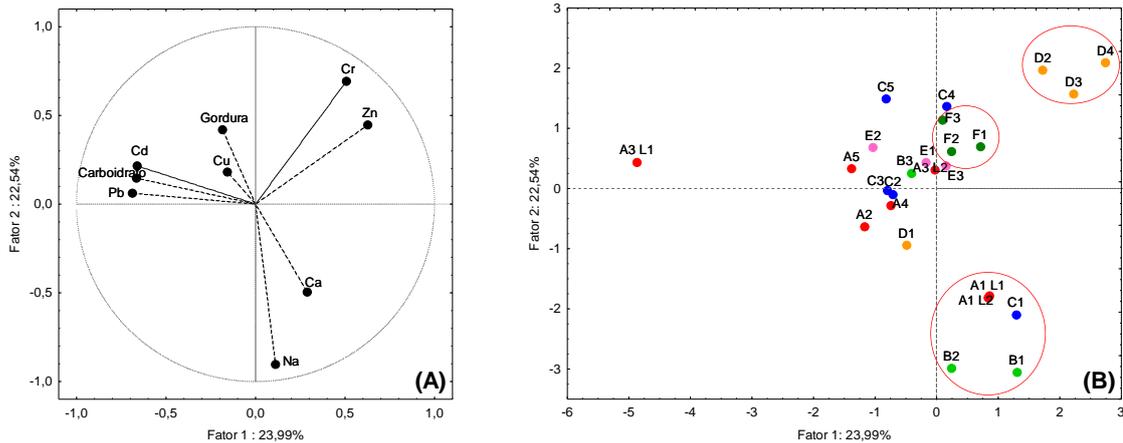
No presente trabalho, os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais foram as concentrações de Zn, Cu, Pb, Cd, Cr, gordura, carboidrato, Ca e Na. Os parâmetros gordura, carboidrato, Ca e Na foram designados a partir dos dados disponíveis nas tabelas nutricionais correspondentes a cada amostra de iogurte estudada.

A partir dos parâmetros utilizados foi construída uma matriz de dados de dimensão que corresponde aos nove parâmetros e seus respectivos valores obtidos para 25 amostras de

iogurte. Os dados originais foram autoescalados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada.

A Figura 3.16 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 3.16.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 das concentrações totais de metais obtidos com a análise multivariada dos dados de iogurte



**Notas:** No gráfico de escores, letras e números referem-se à identificação das amostras de iogurte.

**Legenda:** Marcas: ● A; ● B; ● C; ● D; ● E; ● F.

Com a PCA foi possível obter uma explicação de 46,5% da variabilidade dos dados. Considerando as diferentes origens do iogurte e as diferentes características inerentes a cada amostra, essa explicação pode ser considerada adequada. Na Figura 3.16A é possível verificar que existem algumas relações entre as variáveis avaliadas. Pela primeira componente principal (PC1) (eixo X), observa-se uma relação entre as variáveis Zn e Cr para as amostras de iogurte, com coeficientes maiores que 0,51. Além disso, nota-se que há uma relação inversa entre Zn e Cr e as variáveis Cd, Pb e carboidrato, sendo estas as variáveis que apresentaram os coeficientes de correlação mais significativos (entre -0,66 para Cd e -0,69 para Pb). Para a segunda componente (PC2) os coeficientes de correlação mais significativos foram para as variáveis Zn e Cr (acima de 0,45), os quais foram inversamente correlacionados com as variáveis Ca e Na, com coeficientes de -0,50 e -0,90, respectivamente. Metais como Cu, Cd e Pb, por exemplo, além de se correlacionarem entre si, apresentaram também forte correlação com teor de gordura e carboidrato presentes nas amostras de iogurte.

Avaliando-se a Figura 3.16B nota-se que a primeira componente principal foi responsável pelo agrupamento das amostras de iogurte em grupos distintos. Em relação à PC1 (eixo X), a direita do gráfico (eixo positivo de X e negativo de Y), verifica-se que as amostras de iogurte natural (A1 L1, A1 L2, B1 e C1) apresentaram forte relação com os parâmetros Ca e Na. Neste grupo ainda foi possível agrupar a amostra B2. Ainda no lado direito do gráfico,

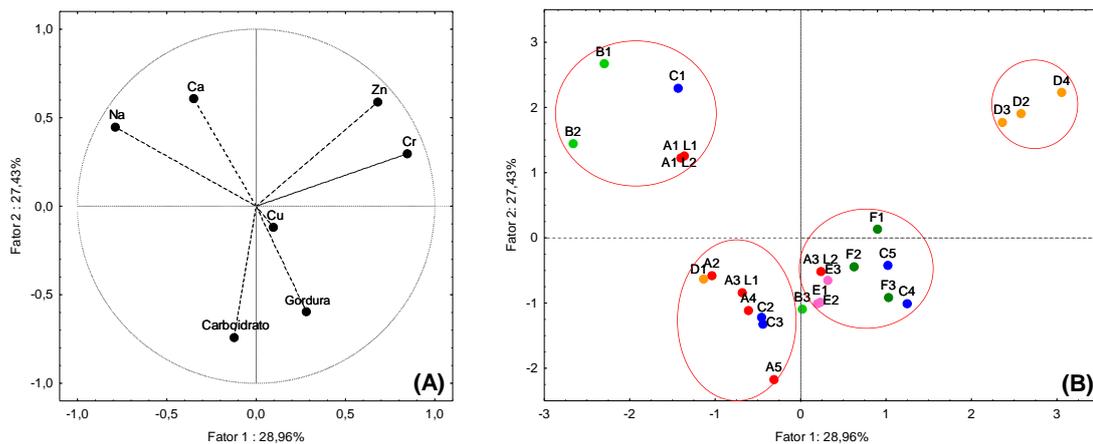
mas no quadrante positivo de X e Y, foi possível observar dois agrupamentos de amostras de duas marcas (D2 a D4, e F1 a F3). Essas amostras demonstraram ter forte relação com as concentrações de Cr e Zn. As amostras de iogurte pertencente ao lado esquerdo do gráfico (eixo negativo de X) mostraram relação com os outros parâmetros avaliados. A maioria destas amostras se correlacionaram com a concentração de Cu e a quantidade de gordura. A amostra A3 L1 foi a única que se destacou em relação ao Pb e Cd e quantidade de carboidrato.

Como Pb e Cd foram quantificados em poucas amostras de iogurte, uma nova PCA foi realizada a fim de melhor correlacionar as amostras com as variáveis de interesse.

Os parâmetros utilizados para a nova análise de componentes principais foram Zn, Cu, Cr, gordura, carboidrato, Ca e Na.

A Figura 3.17 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 3.17.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de iogurte



**Notas:** No gráfico de escores, letras e números referem-se à identificação das amostras de iogurte.

**Legenda:** Marcas: ● A; ● B; ● C; ● D; ● E; ● F.

Para essa PCA foi possível obter uma explicação adequada de 56,4% da variabilidade dos dados.

Na Figura 3.17A, é possível observar pela primeira componente principal (PC1) que novamente existe uma relação entre as variáveis Zn e Cr para as amostras de iogurte (coeficientes  $> 0,68$ ). O coeficiente de correlação para Na foi muito significativo ( $-0,79$ ), no entanto, ele apresentou relação inversa com Zn e Cr. Para a segunda componente (PC2) os coeficientes de correlação com maior significância foram apresentados pelas variáveis Zn e Ca, com valores de 0,59 e 0,61, respectivamente. Observa-se também uma relação inversa destas duas variáveis com o teor de gordura e carboidrato presentes nas amostras. Para estes dois

últimos, os coeficientes foram significativos, com valores de -0,60 para gordura e -0,74 para carboidrato. Além disso, é possível verificar uma relação das concentrações de Cu com o teor de gordura presente nas amostras.

Em relação a Figura 3.17B, pela PC1, as amostras de iogurte localizadas no quadrante positivo em relação ao eixo X e eixo Y, distantes da linha zero, apresentaram concentrações mais elevadas de Cr e Zn, como observado anteriormente. Consequentemente, as amostras localizadas no quadrante positivo de X e negativo de Y, apresentaram concentrações inferiores para os dois metais. No entanto, neste quadrante, pode ser observado um grupo de amostras que são similares em relação a quantidade de gordura, ou em relação as concentrações de Cu quantificadas. Em relação ao eixo negativo de X e Y, observa-se um grupo de amostras relacionadas com o teor de carboidrato, sendo que grande parte das amostras da marca A foram agrupadas em relação a esse parâmetro. Já em relação ao eixo negativo de X e positivo de Y, verifica-se novamente que as amostras de iogurte natural (A1 L1, A1 L2, B1 e C1) e a amostra B2 apresentaram forte relação com os parâmetros Ca e Na.

Em relação a PC2, pelo eixo positivo de X, observa-se uma separação das amostras (principalmente de iogurte natural, ou enriquecidas com Ca e Zn) em relação as concentrações de elementos essenciais (Zn, Cr, Na e Ca). Já em relação ao eixo negativo de X, pela CP2, a maioria das amostras avaliadas foram agrupadas em relação a quantidade de carboidrato e gordura presente nas mesmas.

Neste sentido, observa-se que mesmo se tratando de amostras com características distintas, observam-se semelhanças entre os iogurtes avaliados, em relação tanto com a presença de espécies metálicas, quanto com a composição das amostras. Em alguns casos, foi possível verificar uma similaridade entre diferentes amostras relacionadas a composição amostral e a presença de algum elemento específico nas mesmas.

Como o iogurte é um alimento de amplo consumo pela população mundial, principalmente crianças e idosos, e considerando a presença de espécies metálicas neste alimento, torna-se necessário avaliar se o produto é adequado para consumo humano através de cálculos de ingestão diária.

### 3.2.8 Grau de Ingestão Humana de Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em função do consumo de Iogurte

Ao considerar a ingestão diária de iogurte por seres vivos (160 g – 1 pote), pode-se calcular a quantidade de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb que foram ingeridos por uma pessoa de 70 kg, ou por uma criança de 20 kg. Esses resultados são mostrados na Tabela 3.19. Os valores foram

calculados utilizando a média e a faixa de concentração total dos metais em iogurte.

**Tabela 3.19.** Estimativa da ingestão humana de Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$  por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) e uma criança (20 kg) que consome iogurte (160 g por dia)

Frequência de ingestão		Zn		Cu		Cr		Cd		Pb
		Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média
Diária	Adulto	16,5	6,1 – 69,3	0,2	0,05 – 1,8	0,03	0,02 – 0,04	0,005	0,004 – 0,01	0,09
	Criança	57,6	21,3 – 242,4	0,8	0,2 – 6,5	0,09	0,07 – 0,13	0,019	0,01 – 0,04	0,30
Semanal	Adulto	115,2	42,6 – 484,8	1,7	0,4 – 12,9	0,2	0,14 – 0,25	0,04	0,03 – 0,08	0,60
	Criança	403,2	149 – 1696,8	5,8	1,4 – 45,1	0,6	0,48 – 0,88	0,13	0,09 – 0,28	2,09
Mensal	Adulto	493,7	182,4 – 2078	7,1	1,6 – 55,2	0,8	0,58 – 1,08	0,16	0,11 – 0,34	2,56
	Criança	1728	638,4 – 7272	24,8	5,7 – 193	2,7	2,04 – 3,77	0,57	0,39 – 1,2	8,97

A Tabela 3.19, mostra que o nível de ingestão dos metais por seres humanos seguiu a ordem de  $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cr} > \text{Cd}$ . Considerando uma criança que consome semanalmente 1,12 kg de iogurte, a ingestão média de Zn, Cu, Pb, Cr e Cd seria 403,2; 5,8; 2,09; 0,6; e 0,13  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Para um adulto, a ingestão média seria 115,2; 1,7; 0,60; 0,2; e 0,04  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para Zn, Cu, Pb, Cr e Cd, respectivamente. Devido à menor massa corporal apresentada por crianças, é esperado que a ingestão de metais seja maior por esses indivíduos. Considerando o amplo consumo de iogurte pelos infantes, isso demonstra a importância de avaliar os níveis destes metais neste tipo de alimento.

A JECFA (FAO/WHO) – Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives – considera aceitável, para Cd, uma ingestão mensal de até 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo (FAO/WHO, 2014). Para Pb, uma dose semanal de 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , era considerada aceitável. No entanto, atualmente este valor não tem sido considerado seguro. Estudos mostraram que esta quantidade pode causar uma diminuição de 3 pontos de QI (quociente de inteligência) em crianças e um aumento de aproximadamente 3 mmHg (0,4 kPa) na pressão sanguínea de adultos (FAO/WHO, 2012). Assim, não é possível estabelecer uma dose segura de Pb para a saúde dos seres vivos. Para Cr, um limite aceitável para ingestão diária é de até 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo (ou 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo para ingestão semanal) (BAARS et al., 2001). Para Cu, é aceitável uma dose diária de 0,5 mg  $\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo (500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo) (FAO/WHO, 2014). Com relação a esses limites máximos toleráveis, um cálculo da porcentagem de ingestão para os metais traço a partir do iogurte, fornece valores de 2,8; 0,6; 0,4 e 0,2% para Pb, Cr, Cu e Cd, respectivamente. Todos os valores de ingestão frequente de metais calculados neste estudo, através do consumo de iogurte, estão abaixo dos valores limites permitidos para cada metal.

Para Zn, se tratando de um micronutriente essencial para a dieta humana, a ingestão diária recomendada (IDR) para crianças (4 a 8 anos) é de 5 mg dia<sup>-1</sup>, e para adultos é de 8 e 11 mg dia<sup>-1</sup>, para mulheres e homens, respectivamente (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004; BRASIL, 2005). Com relação aos níveis de ingestão superior tolerável de Zn, esses valores são de 12 e 40 mg dia<sup>-1</sup> para crianças e adultos, respectivamente (IOM, 2001). Considerando a concentração média de Zn encontrada em amostras de iogurte (7,2 µg g<sup>-1</sup>), a ingestão diária seria 1,15 mg do metal. Isso corresponde a 23% da dose diária ideal de ingestão de Zn para crianças e varia de 10,5 (homens) a 14,4% (mulheres), para adultos.

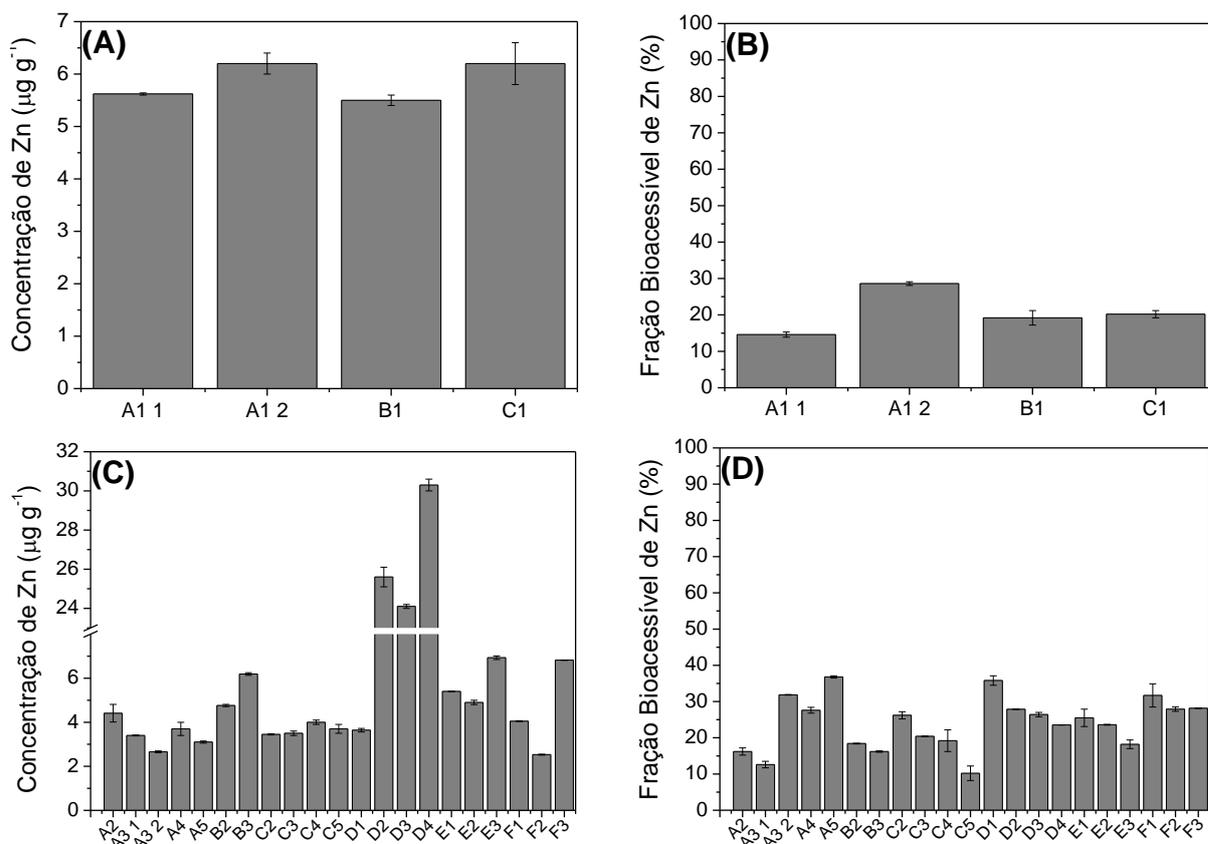
Para Cu, considerando também a sua essencialidade para a dieta humana, os valores de IDR são de 440 µg dia<sup>-1</sup> para crianças (4 a 8 anos) e 900 µg dia<sup>-1</sup> para adultos (IOM, 2001; BRASIL, 2005). Em relação a ingestão máxima permitida do metal, os valores são de 3 e 10 mg dia<sup>-1</sup>, para crianças e adultos, respectivamente (IOM, 2001). A concentração média de Cu em iogurte é de 103,4 ng g<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma ingestão diária de 16,5 µg do metal. Isso indica que a contribuição do iogurte para ingestão de Cu é de 3,75% para crianças, e de 1,8% para adultos.

No entanto, esses dados estão relacionados com uma possível ingestão total dos íons metálicos através do consumo de iogurte, e deve-se considerar a interação dos íons metálicos com o organismo dos seres vivos. Alguns metais ou seus complexos, após a ingestão, podem ter maior (ou menor) solubilidade e assim serem absorvidos mais (ou menos) facilmente tornando-se (ou não) bioacessíveis para o organismo. Nesse sentido, estudos de simulação *in vitro* podem fornecer resultados importantes com relação à ingestão de íons metálicos na rota de digestão-absorção de alimentos pelos seres vivos.

### 3.2.9 Determinação da Bioacessibilidade de Íons Metálicos em Iogurte

Os testes *in vitro* discutidos anteriormente, foram aplicados nas amostras avaliadas a fim de verificar se os metais estudados poderiam estar disponíveis para absorção intestinal a partir do consumo de iogurte. As amostras foram separadas em relação à similaridade física: amostras de iogurte natural foram avaliadas separadamente de amostras de iogurte saborizado ou com fruta adicionada. Isso foi feito para melhor explicar os resultados, já que anteriormente verificou-se que iogurtes com características semelhantes possuíam concentrações similares de metais.

A Figura 3.18 apresenta os dados referentes às concentrações totais e frações bioacessíveis de Zn a partir do iogurte.

**Figura 3.18.** Concentração total e frações bioacessíveis de Zn em iogurte determinadas por FAAS

**Legenda:** Concentração total - iogurte natural (A) e iogurte saborizado ou com adição de frutas (C);  
Fração bioacessível: iogurte natural (B) e iogurte saborizado ou com adição de frutas (D).

Em relação a Figura 3.18A, é possível observar que existe uma similaridade entre as amostras de iogurte natural, sendo que as concentrações são próximas entre as mesmas. Ao verificar a bioacessibilidade de Zn a partir destas amostras (Figura 3.18B), observa-se que essas frações são diferentes e não ultrapassam os 30%. Como já observado anteriormente, existe uma interação de Zn com as enzimas do procedimento, diminuindo a fração bioacessível do metal (em solução aquosa). Para iogurte, com uma matriz complexa, essa diminuição foi ainda maior. Para as amostras da marca A, que se diferenciam apenas no lote, observou-se uma diferença de aproximadamente 13% na fração bioacessível de Zn. Isso demonstra que mesmo, a princípio, elas tendo uma composição similar, durante a digestão enzimática, a interação do metal com as enzimas do processo modifica a bioacessibilidade de Zn. Já para as amostras B1 e C1, ambas desnatadas, as frações bioacessíveis foram baixas (< 20%) e similares entre si.

As amostras de iogurte natural, em relação à tabela nutricional, apresentam quantidades elevadas de proteína (acima de 6,5 g), o que também pode ser um fator determinante na baixa bioacessibilidade de Zn apresentada por essas amostras. Apesar da ligação Zn-proteína influenciar positivamente na absorção do metal (YUYAMA et al., 2007), para leite e derivados

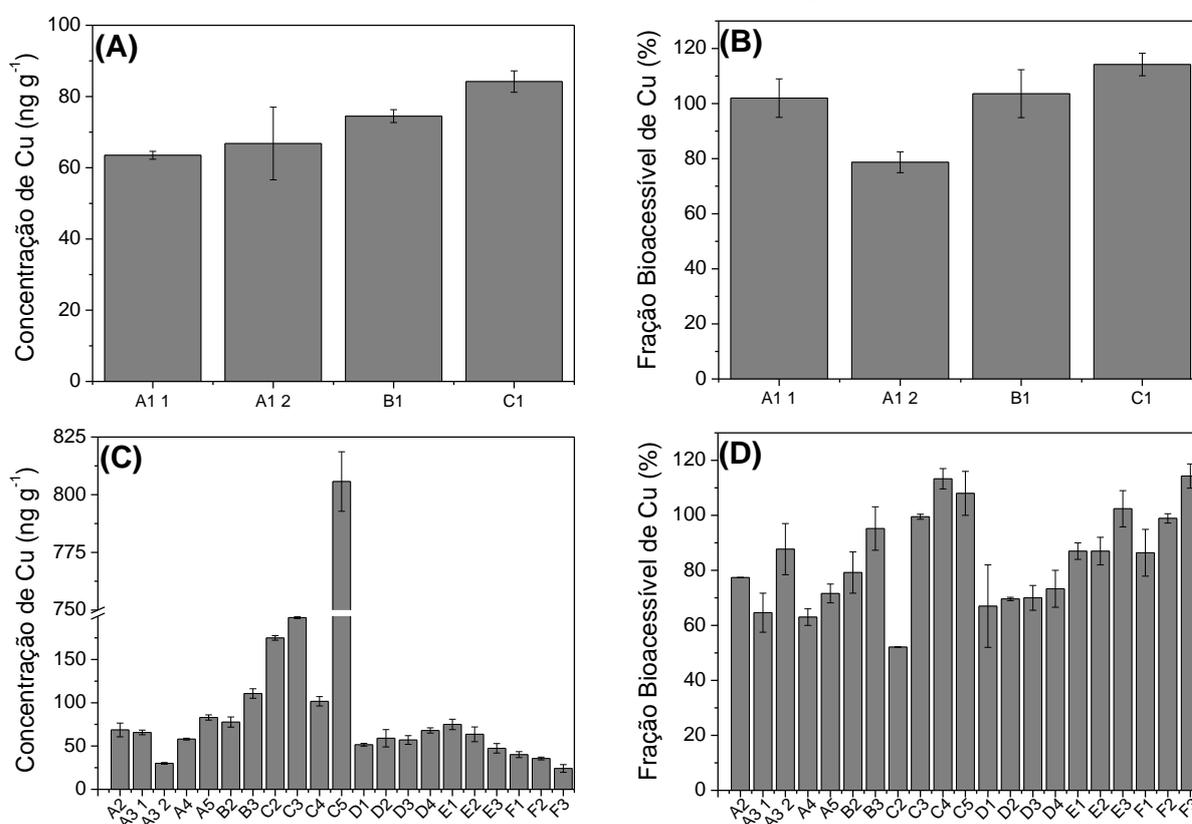
isso acaba influenciando negativamente. Isso ocorre porque a caseína, proteína majoritária nesses alimentos, dificulta a absorção de Zn, diferente do que é observado para outras proteínas presentes em alimentos (MAFRA e COZZOLINO, 2004; BOSSU, 2009).

Para os iogurtes saborizados ou com fruta adicionada, pela Figura 3.18C, verifica-se diferença entre as marcas avaliadas, sendo que a marca C foi a única que apresentou similaridade nas concentrações de Zn. As maiores concentrações do metal observadas nas amostras D2 a D4, são devido ao enriquecimento dessas amostras com sulfato de zinco, como já comentado anteriormente. A amostra F3, apresentou uma concentração de Zn elevada quando comparada às demais amostras da marca. É importante ressaltar que esta amostra é especialmente indicada para consumo por crianças. Com relação às frações bioacessíveis (Figura 3.18D), de modo geral, essas foram menores que 40%. Além disso, a variabilidade entre as amostras foi significativa, sendo que amostras como a A3, avaliada em dois lotes distintos, tiveram frações bioacessíveis muito diferentes (diferença maior que 15%). Novamente, isso indica que aparentemente a mesma composição amostral não reflete a fração bioacessível final de Zn. Além disso, a amostra A3 L1 foi a que apresentou maior concentração de Cd entre todas as amostras avaliadas, e também foi a que apresentou a segunda menor fração bioacessível de Zn ( $12,6 \pm 0,9\%$ ). Ao que se sabe, durante o processo de digestão enzimática, o Zn pode competir com outros metais bivalentes, os quais podem ser complexados no trato gastrointestinal, como por exemplo o Cd, e assim o Zn pode ser excretado (YUYAMA et al., 2007; BOSSU, 2009). Ou seja, essa interação diminui a biodisponibilidade de Zn no organismo humano. A interação do metal com a matriz e durante o processo de digestão influencia no resultado final para absorção intestinal. As maiores frações bioacessíveis de Zn foram para as amostras A5 (integral) e D1 (parcialmente desnatada), sendo ambas saborizadas, e com elevadas quantidades de carboidrato (Tabela 3.5). A amostra D1, apesar de não ser enriquecida com Zn como as outras amostras da mesma marca, apresentou a maior fração bioacessível do metal (35,8%) dentre as amostras do grupo. Mesmo contendo a maior concentração de Zn, as amostras D2 a D4, não apresentaram uma bioacessibilidade elevada. A menor fração bioacessível de Zn foi apresentada pela amostra C5, de iogurte de soja. Justamente o fato deste iogurte ser produzido com soja pode ter contribuído para esse resultado. As dietas baseadas em produtos vegetais geralmente contêm inibidores da absorção de minerais, como ácido fítico ou fitatos, polifenóis, oxalatos e fibras (LAZARTE et al., 2015). Neste caso, os fitatos são conhecidos como os principais inibidores da absorção de Zn em alimentos à base de plantas. Além de amendoim, arroz, milho e outros cereais, a soja também apresenta conteúdo significativo de fitatos. Portanto, a menor fração bioacessível de Zn apresentada pelo iogurte

de soja pode estar relacionada com a presença de inibidores como fitatos, que através da ligação com Zn em um complexo insolúvel no trato gastrointestinal, reduz a quantidade do metal disponível para absorção. Além disso, a amostra C5 apresenta, segundo dados nutricionais (Tabela 3.5), quantidade significativa de proteína de soja (5,4 g em média) e de Ca (270 mg). Estudos relatam que a relação entre os fitatos e a proteína da soja, ou até mesmo a concentração de Ca e os fitatos, podem reduzir significativamente a absorção de Zn, reduzindo assim sua biodisponibilidade (LÖNNERDAL, 2000; SANDSTEAD e AU, 2007; LAZARTE et al., 2015).

Para Cu, os resultados para concentração total e bioacessibilidade são mostradas na Figura 3.19.

**Figura 3.19.** Concentração total e frações bioacessíveis de Cu em iogurte determinadas por GF AAS



**Legenda:** Concentração total - iogurte natural (A) e iogurte saborizado ou com adição de frutas (C);  
Fração bioacessível: iogurte natural (B) e iogurte saborizado ou com adição de frutas (D).

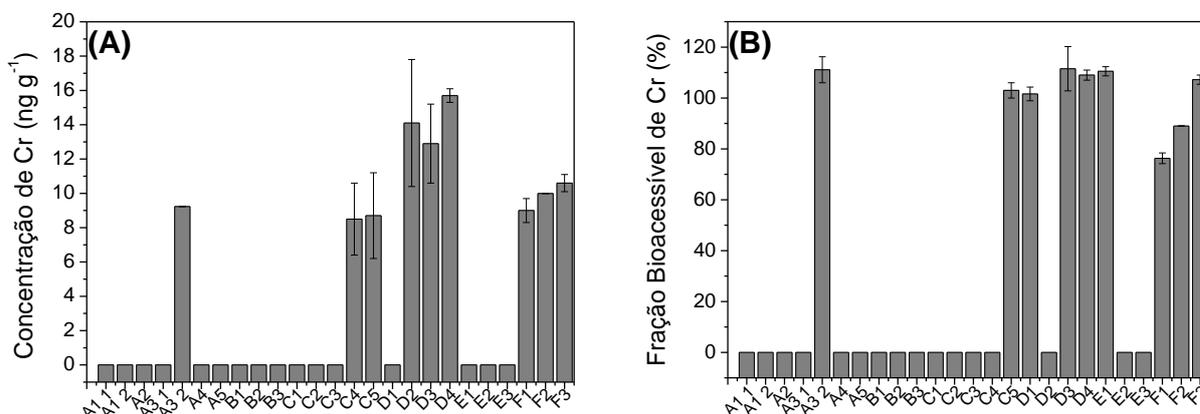
Para as amostras de iogurte natural, através da Figura 3.19A, percebe-se que as concentrações de Cu para as amostras de marca A, de lotes diferentes, foram similares. As amostras B1 e C1, de iogurte desnatado, apresentaram concentrações maiores de Cu quando comparadas às amostras da marca A (iogurtes integrais). Com relação à bioacessibilidade (Figura 3.19B), observou-se que a maioria das amostras apresentaram frações bioacessíveis

próximas a 100%, com exceção da amostra A1 L2, que apresentou uma fração de  $78,7 \pm 3,8\%$ . Novamente, amostras semelhantes, mas de lotes diferentes, apresentaram frações bioacessíveis distintas, o que pode estar relacionado com a composição da amostra avaliada.

Considerando amostras de iogurte saborizadas ou com frutas adicionadas, foram observadas diferenças nas concentrações de Cu (Figura 3.19C). As maiores concentrações foram observadas para as amostras da marca C, com grande destaque para o iogurte de soja (C5). Para uma mesma amostra, porém de lote diferente (A3), as concentrações de Cu apresentaram diferenças significativas, o que pode indicar que a origem ou industrialização da amostra influencia na concentração de metais neste tipo de alimento. Com relação à bioacessibilidade (Figura 3.19D), as porcentagens para Cu variaram de  $52,120 \pm 0,007\%$  (C2) a  $114 \pm 4\%$  (F3). Com exceção da amostra C2, todas as outras amostras apresentaram frações bioacessíveis acima de 60%. Ainda em relação à marca C, todas as outras amostras, exceto a C2, apresentaram uma bioacessibilidade total (100%) de Cu a partir do iogurte. Considerando a elevada concentração do metal apresentada pela amostra C5, e sua total bioacessibilidade, torna-se importante avaliar esse tipo de alimento e verificar sua contribuição nutricional em relação a metais como Cu. Alguns estudos relatam que amostras com maiores concentrações de Zn diminuem a biodisponibilidade de Cu (CABRERA et al., 1996; YUYAMA et al., 2007; GHARIBZAHEDI e JAFARI, 2017). Observando as amostras D2 a D4, as quais apresentaram as mais elevadas concentrações de Zn, as frações bioacessíveis de Cu em iogurte variaram de  $69,6 \pm 0,6\%$  a  $73 \pm 7\%$ . Se comparada às outras amostras, realmente se observa uma menor bioacessibilidade do metal nas mesmas. No entanto, esse comportamento não é regra entre as amostras, e a composição amostral pode influenciar significativamente nas frações bioacessíveis de Cu.

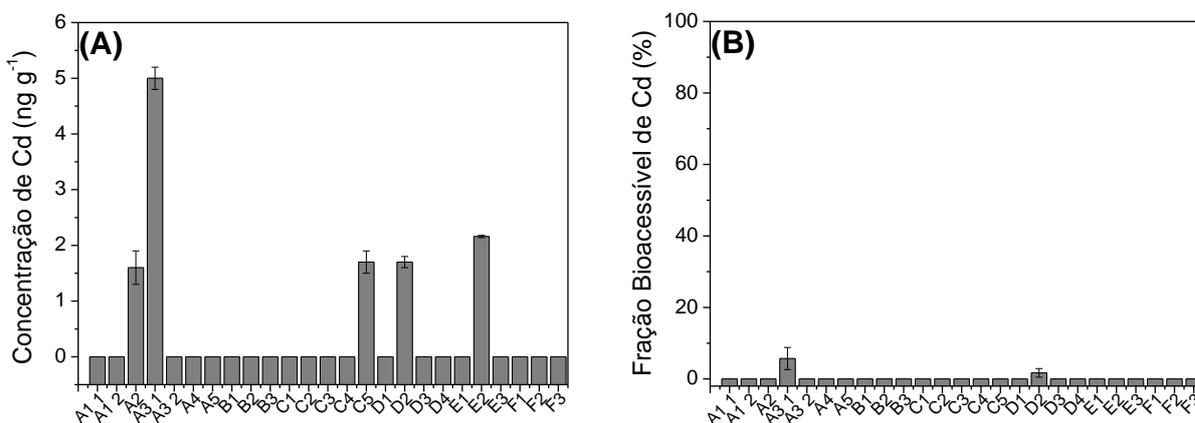
Para Cr e Cd, menos de 40% das amostras de iogurte apresentaram concentrações quantificáveis dos mesmos. Os resultados para concentração total e bioacessibilidade de Cr em iogurte são mostrados na Figura 3.20.

**Figura 3.20.** Concentração total de Cr (A) e suas respectivas frações bioacessíveis (B) em iogurte determinadas por GF AAS



Para Cr, as concentrações totais (Figura 3.20A) foram menores que  $16 \text{ ng g}^{-1}$ , e apenas amostras saborizadas ou com adição de frutas apresentaram quantidades significativas do metal. Dessas amostras, a maioria era de iogurte integral. Com relação às frações bioacessíveis de Cr a partir de iogurte (Figura 3.20B), a faixa observada variou de  $76 \pm 2\%$  a  $112 \pm 9\%$ , sendo que para a maioria das amostras (que apresentaram concentrações quantificáveis de Cr) o metal tem capacidade total de ser absorvido pelo organismo dos seres vivos. A absorção de Cr depende basicamente de três fatores: estado de oxidação do metal; forma (complexado ou não); e conteúdo intestinal (DA SILVA e COZZOLINO, 2007). Geralmente a absorção intestinal de Cr é baixa (menor que 5%), sendo que os compostos orgânicos de Cr (por exemplo, na forma de nicotinato ou picolinato de cromo) são mais facilmente absorvidos do que os compostos inorgânicos (por exemplo, na forma de cloreto de cromo) (ESFA, 2014). No iogurte, o que pode estar favorecendo a absorção de Cr é a presença de ácido nicotínico na composição da matriz (GAHRUIE et al., 2015). Estudos relatam que a presença dessa substância em alimentos facilita a absorção de Cr pelo organismo, devido à formação do nicotinato de cromo (altamente absorvido pelo organismo), elevando assim sua biodisponibilidade (DISILVESTRO e DY, 2007; EFSA, 2014). Neste sentido, a variação na composição da amostra pode influenciar na disponibilidade do metal.

A Figura 3.21 apresenta os resultados para concentração total e bioacessível de Cd em iogurte.

**Figura 3.21.** Concentração total de Cd (A) e suas respectivas frações bioacessíveis (B) em iogurte

Para Cd, 5 amostras analisadas apresentaram quantidades significativas do metal (Figura 3.21A), sendo que a maior concentração não ultrapassou  $5 \text{ ng g}^{-1}$ . Em relação à bioacessibilidade (Figura 3.21B), as frações bioacessíveis de Cd foram muito baixas, o que pode ser considerado adequado, visto a toxicidade apresentada pelo metal para o organismo humano. O metabolismo do Cd possui características específicas, sendo que esse metal apresenta forte competição com metais bivalentes, o que indica que um aumento na concentração de Cd pode diminuir a absorção intestinal de Zn e Ca, por exemplo. Além disso, o Cd tem baixa capacidade de absorção pelo organismo (geralmente variando de 3 a 8%) (MAIHARA e FÁVARO, 2007), como pode ser observado para iogurte.

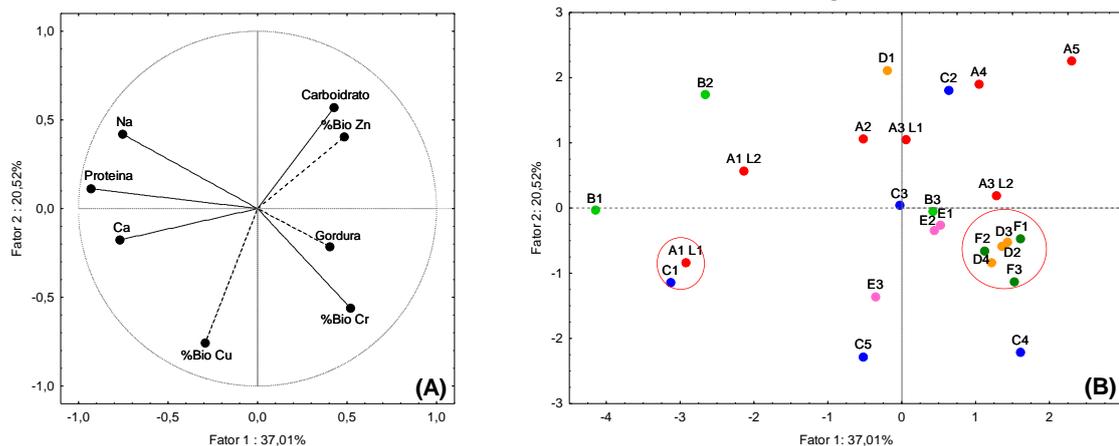
Para Pb apenas uma amostra foi quantificada, como observado anteriormente ( $37,4 \pm 11,9 \text{ ng g}^{-1}$ ). A bioacessibilidade apresentada pela amostra foi de  $33 \pm 5\%$ , que pode ser considerada relativamente baixa. Segundo a literatura, a absorção alimentar de Pb é geralmente baixa (menor que 10%), sendo que isso pode variar de acordo com a idade, com a dieta adotada, entre outros (MAIHARA e FÁVARO, 2007). Além disso, dietas ricas em elementos como Ca, P, Fe, Cu e Zn, podem auxiliar na diminuição da absorção de Pb (SKERFVING e BERGDAHL, 2007). Tendo-se em vista o potencial acumulativo de Pb no organismo, principalmente de crianças, essa baixa fração bioacessível é desejável, diminuindo os riscos de ingestão aguda do metal por seres vivos.

Considerando o significativo número de amostras avaliadas, uma PCA foi construída buscando correlacionar as amostras com parâmetros importantes, bem como com as porcentagens bioacessíveis dos metais avaliados. Como Pb e Cd foram quantificados em poucas amostras de iogurte, a PCA foi realizada apenas com a bioacessibilidade dos metais que mais se destacaram para as amostras.

Os parâmetros utilizados para a nova análise de componentes principais foram as frações bioacessíveis de Zn, Cu, Cr, e quantidade de gordura, proteína, carboidrato, Ca e Na.

A Figura 3.22 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 3.22.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 obtidas para as frações bioacessíveis de metais com a análise multivariada dos dados de iogurte



**Notas:** No gráfico de escores, letras e números referem-se à identificação das amostras de iogurte.

**Legenda:** Marcas: ● A; ● B; ● C; ● D; ● E; ● F.

Em relação à PCA, pela Figura 3.22, foi possível explicar 57,5% da variabilidade dos dados, o que é considerado adequado tendo-se em vista as diferentes variáveis e amostras avaliadas.

Na Figura 3.22A, observa-se, pela primeira componente principal (PC1), que as correlações mais significativas foram apresentadas pelos parâmetros proteína, Ca e Na ( $>-0,75$ ), sendo que essa correlação foi inversa à apresentada pela porcentagem bioacessível de Cr (0,52), que também foi significativa. Além disso, verificou-se uma relação entre as frações bioacessíveis de Zn e a quantidade de carboidrato. A bioacessibilidade de Cr também apresentou uma relação com a quantidade de gordura presente nas amostras. Para a segunda componente (PC2) o coeficiente de correlação com maior significância foi apresentado pela fração bioacessível de Cu ( $-0,76$ ), a qual está inversamente correlacionada com a variável carboidrato (0,57).

Em relação à Figura 3.22B, pela PC1, as amostras de iogurte localizadas no quadrante positivo em relação ao eixo X e eixo Y, apresentaram uma maior correlação com a porcentagem bioacessível de Zn e com a quantidade de carboidrato presente nas mesmas. Neste quadrante, grande parte das amostras da marca A puderam ser agrupadas. Por outro lado, as amostras localizadas neste quadrante apresentaram correlação inversa em relação à porcentagem

bioacessível de Cu e quantidade de Ca. Já as amostras localizadas no quadrante positivo de X e negativo de Y, apresentaram frações bioacessíveis de Zn e quantidades de carboidratos inferiores. Contudo, neste quadrante, pode ser observado um grupo de amostras que são similares em relação à quantidade de gordura, ou em relação a bioacessibilidade de Cr. Todas as amostras da marca F e 75% das amostras da marca D (D2 a D4), puderam ser agrupadas em relação a estes parâmetros. Observando-se os eixos negativos de X e Y, verifica-se algumas amostras sendo influenciadas pela bioacessibilidade de Cu ou quantidade de Ca. Duas amostras de iogurte natural (A1 L1 e C1) foram agrupadas em relação ao teor de Ca. Observa-se também que a amostra C5, a qual apresentou menor fração bioacessível de Zn, foi influenciada pela bioacessibilidade Cu e quantidade de Ca presente na amostra, indicando, como citado anteriormente, aquele efeito negativo da ligação Zn-fitato-Ca, que diminui a disponibilidade de Zn. As outras duas amostras de iogurte natural foram separadas em relação ao teor de Na e proteína (A1 L2 e B1), ficando agrupadas no quadrante correspondente aos eixos negativo de X e positivo de Y.

Em relação à PC2, pelo eixo positivo de X, observa-se uma separação das amostras em relação a bioacessibilidade de Zn, carboidrato, Na e proteína. Nesses quadrantes, aproximadamente 86% das amostras da marca A foram influenciadas por esses parâmetros. Já em relação ao eixo negativo de X, pela PC2, as amostras foram separadas em relação a bioacessibilidade de Cu e Cr, quantidade de gordura e Ca.

Conhecendo-se as frações bioacessíveis dos metais em iogurte, é possível estimar a ingestão dos mesmos com o consumo frequente do alimento. Considerando o consumo diário de 160 g, pode-se calcular a quantidade de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb que seriam ingeridos por uma pessoa de 70 kg, ou por uma criança de 20 kg, em relação à quantidade bioacessível, ou seja, que poderia ser absorvida pelos seres vivos.

Esses resultados são mostrados na Tabela 3.20. Os valores foram calculados utilizando a média e a faixa de concentração dos metais em iogurte.

**Tabela 3.20.** Estimativa da ingestão humana de Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$  por kg de peso corpóreo), com relação a bioacessibilidade, para um adulto (70 kg) e uma criança (20 kg) que consome iogurte (160 g por dia)

Frequência de ingestão		Zn		Cu		Cr		Cd		Pb
		Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média
Diária	Adulto	3,9	1,9 – 16,3	0,2	0,05 – 1,8	0,03	0,02 – 0,04	$8 \times 10^{-5}$	$0 – 5,7 \times 10^{-4}$	0,03
	Criança	13,5	6,8 – 57,2	0,7	0,2 – 6,5	0,09	0,07 – 0,13	$3 \times 10^{-4}$	$0 – 2,3 \times 10^{-3}$	0,1
Semanal	Adulto	27,1	13,6 – 114,4	1,5	0,4 – 12,9	0,2	0,14 – 0,25	$6 \times 10^{-4}$	$0 – 4,6 \times 10^{-3}$	0,2
	Criança	94,8	47,5 – 400,4	5,0	1,4 – 45,1	0,6	0,48 – 0,88	$2 \times 10^{-3}$	$0 – 0,016$	0,7
Mensal	Adulto	116	58,2 – 490,4	6,1	1,6 – 55,2	0,8	0,58 – 1,08	$2,6 \times 10^{-3}$	$0 – 0,019$	0,8
	Criança	406	203,6 – 1716	21,5	5,7 – 193	2,7	2,04 – 3,77	$9 \times 10^{-3}$	$0 – 0,068$	3,0

A Tabela 3.20, mostra que o nível de ingestão média dos metais por seres humanos seguiu a ordem de  $Zn > Cu > Pb > Cr > Cd$ . Em relação aos valores obtidos para ingestão de acordo com a fração bioacessível para cada metal, nota-se que houve uma diminuição significativa na ingestão de Zn, Cd e Pb, devido às menores bioacessibilidades apresentadas por esses metais. Desse modo, a Tabela 3.21 apresenta os valores de ingestão, com relação à bioacessibilidade, dos metais estudados a partir do consumo de iogurte, comparados aos valores recomendados ou permitidos para cada metal.

**Tabela 3.21.** Porcentagem de ingestão de metais a partir do iogurte, com relação a bioacessibilidade, comparados ao valor recomendado ou permitido para cada metal estudado

Metais	Valor de ingestão	Valor de ingestão (bioacessibilidade)	Valor referencial	% Ingestão
Zn	1,15 mg dia <sup>-1</sup>	0,27 mg dia <sup>-1</sup>	11 mg dia <sup>-1</sup> (adulto)	2,5
Cu	1,7 µg kg <sup>-1</sup>	1,67 µg kg <sup>-1</sup>	500 µg kg <sup>-1</sup>	0,3
Cr	0,2 µg kg <sup>-1</sup>	0,2 µg kg <sup>-1</sup>	35 µg kg <sup>-1</sup>	0,6
Cd	0,04 µg kg <sup>-1</sup>	0,0007 µg kg <sup>-1</sup>	25 µg kg <sup>-1</sup>	0,003
Pb	0,6 µg kg <sup>-1</sup>	0,23 µg kg <sup>-1</sup>	25 µg kg <sup>-1</sup>	0,9

Observando-se a Tabela 3.21, para Cu e Cr, como a bioacessibilidade é quase total, a ingestão destes metais com o consumo de iogurte é total. Isso indica que para Cu, por exemplo, a contribuição para a IDR com o consumo de iogurte é de 3,75% para crianças, e de 1,8% para adultos, como foi observado nos cálculos teóricos de ingestão. Levando-se em consideração os limites máximos permitidos para ingestão de metais traço com relação à massa corporal dos indivíduos, as porcentagens calculadas, considerando a bioacessibilidade, foram de 0,9; 0,6; 0,33; 0,003% para Pb, Cr, Cu e Cd. Esses valores são significativamente menores para alguns metais como Pb e Cd, devido às baixas frações bioacessíveis observadas a partir de iogurte, quando comparados aos valores calculados anteriormente (antes da realização da bioacessibilidade) (Tabela 3.21).

Para Zn, como já indicado anteriormente, a ingestão diária recomendada (IDR) para crianças é de 5 mg dia<sup>-1</sup>, e para adultos varia de 8 a 11 mg dia<sup>-1</sup> (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004; BRASIL, 2005). Considerando a concentração média de Zn encontrada em amostras de iogurte (7,2 µg g<sup>-1</sup>) e a bioacessibilidade média do metal (23,5%) a partir deste alimento, a ingestão diária seria 0,27 mg do metal. Isso corresponde a 5,4% da dose diária ideal de ingestão de Zn para crianças, e de 2,5 (homens) a 3,4% (mulheres) para adultos. Com relação aos cálculos teóricos de ingestão (Tabela 3.21), observou-se uma diminuição de 17,6% da contribuição do iogurte para ingestão de Zn por crianças. Para adultos a diminuição é de 8 e 11% para homens e mulheres, respectivamente. Isso demonstra que o iogurte não pode ser considerado uma fonte adequada de Zn, visto que a contribuição nutricional do alimento em relação as doses do metal, é muito baixa.

Todos os valores de ingestão frequente de metais através do consumo de iogurte avaliados neste estudo, estão abaixo dos valores limites permitidos para cada metal. Isso demonstra que não existe chance de ocorrer exposição aguda de seres vivos a estes metais com o consumo frequente de iogurte. Também, pode-se sugerir que esse alimento não pode ser considerado uma fonte nutricional suficiente de outros elementos essenciais como Zn, Cu e Cr (se na forma trivalente). Estudos tem demonstrado que a contribuição nutricional de Cr através do consumo de iogurte é baixa (LUIS et al., 2015). Igualmente, Cu tem um baixo potencial nutricional considerando o consumo de leite e demais produtos lácteos (ELLINGSEN et al., 2007).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste estudo, foi possível verificar que a amostragem em suspensão se apresenta como uma metodologia rápida para a quantificação de Cu e Zn em iogurte, se comparado às metodologias tradicionais (digestão por via seca ou por via úmida) de preparo de amostra. Verificou-se que o uso de HCl ou HNO<sub>3</sub> foi adequado no preparo das suspensões de iogurte, e conseqüentemente, na determinação de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb por AAS. A adição de ácidos nas suspensões foi eficaz na destruição da matéria orgânica do iogurte, fato este, observado, principalmente, pelos baixos sinais de fundo (BG) apresentados nas determinações dos metais traços por GF AAS. Para todos os metais, a determinação em suspensão de iogurte pode ser realizada utilizando curva analítica com padrão externo, o que diminui custos e aumenta a frequência analítica do método. Além disso, a amostragem em suspensão se mostrou adequada na determinação rápida de Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em iogurte por AAS, visto que todos os parâmetros de validação foram adequados se comparados aos valores aceitáveis estipulados por artigos, ou órgãos de regulamentação para métodos analíticos. Isso indica que os métodos podem ser aplicados em diferentes amostras de iogurte para quantificação direta de elementos traço. Conseqüentemente, pode ser fornecida uma alternativa rápida e de baixo custo na avaliação destes metais na matriz, considerando o consumo significativo deste alimento pela população mundial.

Com relação às 25 amostras de iogurte avaliadas neste estudo, foi possível verificar que Zn e Cu foram quantificados em todas as amostras, com concentrações médias de  $7 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $103 \pm 152 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. Para Cr, Cd e Pb, menos de 40% das amostras foram quantificadas, no entanto, a presença destes elementos em iogurte, pode estar relacionada com contaminação industrial ou ambiental, provenientes também da matéria-prima (leite bovino ou

de soja) utilizada na produção do alimento. Com a realização de uma Análise de Componentes Principais (PCA), verificou-se que amostras de iogurte natural se correlacionam com quantidades de Ca e Na presentes no mesmo. Já as concentrações de Cu puderam ser correlacionadas com a quantidade de gordura existentes no iogurte. Cálculos teóricos de ingestão dos metais com o consumo deste alimento mostraram que para metais essenciais, os valores de ingestão diária recomendada são mais significativos para Zn, onde a contribuição nutricional do iogurte para esse metal pode chegar a 23% para crianças, e ficar acima de 10% para adultos. Já para Cu, a contribuição do iogurte para ingestão do metal ficou abaixo dos 4% para crianças e adultos. Em relação aos metais traço, Pb, Cd e Cr, a quantidade ingerida ficou abaixo dos 3%, o que já sugere um baixo potencial nutritivo, no caso de Cr (se na forma trivalente), ou tóxico, em relação a Pb e Cd.

Com relação à avaliação da bioacessibilidade de íons metálicos a partir do iogurte, foi possível estabelecer um procedimento *in vitro* adequado em relação aos valores de LOD e LOQ, precisão e linearidade. A quantificação das frações bioacessíveis pode ser realizada com curva com padrão aquoso para a maioria dos metais, exceto para Pb e Cd, onde as frações devem ser determinadas com curva em meio enzimático. Com a realização de testes *in vitro* de simulação gastrointestinal para as 25 amostras de iogurte, foi possível observar que para metais essenciais como Cu e Cr(III), a bioacessibilidade foi relativamente alta (> 60%) para a maioria das amostras, chegando a 100% em alguns casos. Apesar disso, como as concentrações totais desses elementos são relativamente baixas em iogurte, a quantidade ingerida dos metais é baixa também (< 4%), o que diminui o potencial nutricional desse alimento para os seres vivos em relação a estes metais. Para Zn, devido à baixa bioacessibilidade a partir do iogurte (< 40%), a ingestão diária para adultos e crianças se torna baixa (< 6%) através do seu consumo, indicando que esse alimento não se apresenta como uma fonte nutricional para este elemento. No entanto, uma possível absorção de metais tóxicos como Pb e Cd é baixa ou até mesmo, em alguns casos, nula com o consumo de iogurte, o que, do ponto de vista nutricional, é muito importante. Com a realização de uma PCA, verificou-se algumas correlações para bioacessibilidade dos metais avaliados com alguns constituintes das amostras do iogurte. Por exemplo, frações bioacessíveis de Zn se correlacionaram positivamente com a quantidade de carboidrato presente em amostras de iogurte. Já a porcentagem bioacessível de Cr apresentou certa relação (positiva) com a quantidade de gordura existente em algumas amostras.

## CAPÍTULO 4

### DETERMINAÇÃO TOTAL E BIOACESSÍVEL DE ÍONS METÁLICOS EM CHÁ-MATE (*ILEX PARAGUARIENSES*)

O chá-mate (*Ilex paraguarienses*) é amplamente consumido no Brasil, principalmente na região Sul do país. Este alto consumo, pode estar associado aos benefícios da erva-mate, dentre as quais destacam-se a atividade antioxidante, propriedades vaso-dilatadoras, redutoras de lipídeos e de peso (HECK e DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011; LINCK, DE SÁ e ELISABETSKY, 2014; BORGES et al., 2017). Além disso, o chá-mate, assim como outros alimentos/bebidas, pode ser uma fonte importante de metais para o organismo dos seres vivos (HECK e DE MEJIA, 2007).

Grande parte dos estudos de perfil mineral de chás está relacionada com procedimentos de extração das espécies metálicas presentes em diferentes partes das plantas (principalmente folhas e talos) (VULCANO, SILVEIRA E ALVAREZ-LEITE, 2008). No entanto, a quantificação de metais na bebida originada pelas diferentes ervas, através de infusão ou decocção, vem sendo realizada em estudos relatados na literatura (KARAK e BHAGAT, 2010; SZYMCZYCHA-MADEJA, WELNA e POHL, 2012; CHEN et al., 2014). Mesmo assim, para chá-mate, estudos são escassos, principalmente em relação à presença de espécies metálicas na bebida. A maioria dos estudos, ainda tem focado a bebida extraída do mate verde, no caso o chimarrão (BORGES et al., 2017).

Considerando uma possível presença de metais essenciais e de metais tóxicos no chá-mate, torna-se importante determinar as concentrações totais e bioacessíveis dos mesmos, a fim de verificar o potencial nutricional ou tóxico destes elementos para os seres vivos a partir do consumo deste tipo de bebida.

Neste capítulo será abordada a quantificação de metais em chá-mate de diferentes marcas e sabores, bem como a avaliação da bioacessibilidade destes elementos a partir da bebida através de procedimentos de simulação gastrointestinal *in vitro*.

## 4.1 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1.1 Amostras de Chá-mate

As amostras de chá-mate utilizadas nesse estudo foram adquiridas no comércio da cidade de Guarapuava-PR. Para testes iniciais escolheu-se, aleatoriamente, uma marca e um sabor de chá (Marca 1, sabor natural) como amostra modelo. Para quantificação dos íons metálicos de interesse, a fim de verificar o perfil dos chás comercializados na região, foram adquiridas, ao total, 21 amostras, contemplando 3 marcas diferentes de chá-mate: Marca 1 - Fazenda Rio Grande- PR (natural, laranja, pêssego, limão, canela, doce de leite e chocolate e caramelo); Marca 2 - Guarapuava-PR (natural, laranja, pêssego, limão, canela, morango, quentão e maçã com canela); e Marca 3 - Chapecó-SC (natural, pêssego, limão e canela).

### 4.1.2 Determinação do Teor de Umidade (%) das Amostras de Chá-mate

Inicialmente realizou-se a determinação do teor de umidade das amostras de chás. As amostras foram retiradas dos saquinhos, e na forma de pó foram aquecidas em estufa (à temperatura de 50 °C), em vários ciclos de 10 min cada, até se obter massa constante. Foi utilizado uma estufa (Odontobras) com controle de temperatura adequado.

### 4.1.3 Preparo da Amostra

A fim de verificar as melhores formas de preparo dos chás, foram comparados os procedimentos de infusão e decocção. Para ambos os procedimentos, utilizou-se chá-mate na forma de pó (aproximadamente 1,65 g – massa seca) em um volume de 100 mL de água ultrapura.

Alguns parâmetros experimentais foram investigados para o preparo das bebidas através do uso de um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central. Os fatores escolhidos foram tempo de infusão e temperatura. Esses fatores foram escolhidos, pois eles podem influenciar a quantidade dos metais de interesse na bebida final. A matriz do planejamento fatorial proposto é apresentada na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central, para infusão de chá-mate

Níveis	Temperatura (°C)	t (min)
Superior (+1)	90 ± 5	10
Inferior (-1)	50 ± 5	3
Ponto Central (0)	70 ± 5	7

Após o preparo das bebidas realizaram-se as medidas de concentração de Cr e Zn por GF AAS e FAAS, respectivamente.

As decocções foram realizadas em chapa de aquecimento (Fisatom) com temperatura controlada, até ebulição (90-94°C) e permanência por 5 min. Após isso, as amostras foram guardadas em recipientes de plástico descontaminados, embaladas em sacos plásticos (para evitar contaminação externa), e reservadas em geladeira (0 - 4 °C) para conservação, até o momento da análise.

Uma amostra de chá-mate foi escolhida aleatoriamente para verificação da representatividade da amostragem. Foram adquiridos 4 lotes diferentes de chá-mate de mesma marca e mesmo sabor (Marca 1, sabor natural). Foi realizado um quarteamento, a fim de se obter 3 porções independentes da amostra, com massa próxima a 1,75 g. Essas foram preparadas conforme citado anteriormente.

Os elementos determinados, as condições de atomização e as faixas utilizadas para a curva analítica, são mostradas na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Condições de atomização e faixa de trabalho para cada metal determinado em decocção de chá-mate

Equipamento	Metal	Curva analítica <sup>a</sup>	Chama	T <sup>Pirólise</sup> (°C)	T <sup>Atomização</sup> (°C)	I (mA)	λ (nm)
FAAS	Zn	0,2-1,6	Ar/Acetileno	-	-	5,0	213,9
	Al <sup>b</sup>	0,1-2,0	Acetileno/Óxido Nitroso	-	-	10,0	309,3
GFAAS	Cr	1,0-10,0	-	1000	2600	7,0	357,9
	Cu	1,0-15,0	-	800	1600	4,0	324,8
	Pb	1-10,0	-	400	1000	10,0	283,3
	Cd	0,2-1,0	-	250	1800	4,0	228,8

<sup>a</sup>As unidades de concentração para Zn e Al estão em mg L<sup>-1</sup>, e para Cr, Cu, Pb e Cd estão em µg L<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup>Para Al foi utilizado KCl (3,35 mol L<sup>-1</sup>) para construção da curva analítica e análise das amostras de chá (0,335 mol L<sup>-1</sup> de KCl em solução), devido ao caráter refratário do metal.

Os dados obtidos para concentração de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr nas amostras de chá-mate foram avaliados com auxílio de ferramentas quimiométricas a fim de melhor relacionar as amostras com os teores de metais encontrados. Para tal, a Análise de Componentes Principais (PCA), foi empregada na análise dos dados, utilizando-se o software Action.

#### 4.1.4 Avaliação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade *In vitro* de Cu, Cr e Zn em Chá-mate

Inicialmente foram avaliados três procedimentos para determinação de frações bioacessíveis de íons metálicos em chá-mate, conforme apresentado para iogurte (item 3.1.5.3). Para essa bebida, Zn, Cu e Cr também foram avaliados primeiramente devido às menores interferências observadas nas determinações dos mesmos nas frações bioacessíveis.

Para o procedimento 1 (P1) (adaptado de BERMEJO et al., 2002), 20 mL de decocção de chá-mate foram colocados em tubos de polipropileno (tubos Falcon). O procedimento de bioacessibilidade foi realizado conforme descrito no item 3.1.5.3. Brevemente, no procedimento, inicialmente o pH do meio foi ajustado a 2 com HCl ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ). Posteriormente, 0,5 mL de suco gástrico foi adicionado à matriz. As soluções resultantes foram levadas para incubação e agitação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100 rpm, por 50 min. Após esse período, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. As soluções obtidas foram neutralizadas (pH = 7) com adição de  $\text{NaHCO}_3$ . Posteriormente, 0,5 mL de suco intestinal foi adicionado as soluções resultantes. Estas por sua vez, foram levadas novamente a incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100 rpm, por 30 min. Por fim, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Para análise da fração bioacessível, as soluções foram centrifugadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10000 rpm, por 20 min.

Para o procedimento 2 (P2) (adaptado de STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014), 20 mL de decocção de chá-mate foram colocados em tubo de polipropileno. Posteriormente, 2,5 mL de suco gástrico foi adicionado à matriz. As soluções resultantes foram levadas para incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 150 rpm, por 2 horas. Após esse período, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo, sendo posteriormente neutralizadas com adição de  $\text{NaHCO}_3$ . Posteriormente, 2,5 mL de suco intestinal foi adicionado as soluções resultantes. Estas por sua vez, foram levadas novamente a incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 150 rpm, por 2 horas. Por fim, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Para análise da fração bioacessível, as soluções foram centrifugadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10000 rpm, por 20 min.

Para o procedimento 3 (P3) (adaptado de POHL et al., 2012b) 30 mL de decocção de chá-mate foram colocados em tubos de polipropileno juntamente com 30 mL de suco gástrico. As soluções foram incubadas à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100 rpm, por 2 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo. Posteriormente, essas soluções foram neutralizadas com  $\text{NaHCO}_3$ , e incubadas com 30 mL de suco intestinal ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100 rpm,

2 horas). Ao final, as amostras foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo para posterior centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min).

Um resumo dos procedimentos testados na determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em chá-mate é apresentada na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Condições de extração das frações bioacessíveis de íons metálicos de decocção de chá-mate para os três procedimentos testados

Procedimento	Condições de Extração	
	Etapa gástrica	Etapa Intestinal
P1	20 mL de decocção de chá-mate – ajuste do pH = 2 (2 mol L <sup>-1</sup> de HCl) + 0,5 mL de suco gástrico (0,2 mg mL <sup>-1</sup> de pepsina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 100 rpm, 50 min)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (1,5 mol L <sup>-1</sup> ) + 0,5 mL de suco intestinal (0,15 mg mL <sup>-1</sup> de pancreatina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> ) → (37 °C, 100 rpm, 30 min) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)
P2	20 mL de decocção de chá-mate + 2,5 mL de suco gástrico (0,2 g L <sup>-1</sup> de pepsina e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 150 rpm, 2 horas)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (1,5 mol L <sup>-1</sup> ) + 2,5 mL de suco intestinal (0,15 g L <sup>-1</sup> de pancreatina, 1,5 g L <sup>-1</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> ) + (37 °C, 100 rpm, 2 horas) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)
P3	30 mL de decocção de chá-mate + 30 mL de suco gástrico (3,2 g L <sup>-1</sup> de pepsina, 2,0 g L <sup>-1</sup> de NaCl e 0,08 mol L <sup>-1</sup> de HCl) → (37 °C, 100 rpm, 2 horas)	pH = 7 com NaHCO <sub>3</sub> (50 g L <sup>-1</sup> ) + 30 mL de suco intestinal (10,0 g L <sup>-1</sup> de pancreatina, 12,5 g L <sup>-1</sup> de sais de bÍlis e 0,07 g L <sup>-1</sup> de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> em NaOH 0,02 mol L <sup>-1</sup> ) + (37 °C, 100 rpm, 2 horas) → centrifugação (4 °C, 10000 rpm, por 20 min)

Porém, assim como para iogurte, antes de avaliar a bioacessibilidade dos íons metálicos a partir de chá-mate, foi realizado um estudo com diferentes curvas analíticas, para verificar se as enzimas presentes nos procedimentos poderiam influenciar na quantificação dos elementos por AAS. As curvas analíticas foram construídas na presença das enzimas dos procedimentos de bioacessibilidade investigados (BERMEJO et al., 2002; STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014): 1) curva com padrão externo (PE); 2) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 1 (CP1); 3) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 2 (CP2); 4) curva em meio de suco gástrico + suco intestinal para o procedimento 3 (CP3). As condições de preparo de cada curva são apresentadas na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Avaliação de curvas analíticas preparadas em diferentes condições para determinação das frações bioacessíveis de Zn, Cu e Cr em decocção de chá-mate

Curva analítica	Condições de preparo
PE	Padrão aquoso de Cu/Cr/Zn
CP1	5,88 µg mL <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 4,41 µg mL <sup>-1</sup> de pancreatina em suco intestinal + Cu/Cr/Zn
CP2	18,5 mg L <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 13,9 mg L <sup>-1</sup> de pancreatina e 139 mg L <sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal + Cu/Cr/Zn
CP3	1,73 g L <sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 4 g L <sup>-1</sup> de pancreatina e 5 g L <sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal + Cu/Cr/Zn

As curvas analíticas para Zn foram realizadas por FAAS, enquanto as curvas analíticas para Cr e Cu foram feitas por GF AAS.

#### 4.1.5 Implementação do Procedimento *In Vitro* para Determinação das Frações Bioacessíveis de Al, Zn, Cu, Cr, Pb e Cd em Chá-mate

Após a escolha do procedimento adequado à determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em decocção de chá-mate, alguns parâmetros relacionados à performance analítica do método foram avaliados.

A linearidade das curvas analíticas foi investigada em dois meios diferentes para os 6 metais estudados. Avaliaram-se as curvas com padrão externo (PE) e em meio enzimático (18,5 mg L<sup>-1</sup> de pepsina em suco gástrico + 13,9 mg L<sup>-1</sup> de pancreatina e 139 mg L<sup>-1</sup> de sais biliares em suco intestinal). As curvas analíticas foram avaliadas por meio de regressão linear com análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste em um nível de 95% de confiança, utilizando software estatístico Action (ACTION, free software, 2014).

Os valores para LOD e LOQ também foram calculados para cada metal através das relações  $3 \times SD/m$  e  $10 \times SD/m$ , respectivamente, sendo  $m$  a inclinação da curva analítica e  $SD$  é o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (RIBANI et al., 2004; ARAÚJO, 2009).

#### 4.1.6 Determinação da Concentração Total e Bioacessível de Íons Metálicos em Chá-mate

O procedimento de bioacessibilidade *in vitro* foi aplicado em 20 amostras de chá-mate de 3 marcas disponíveis comercialmente: Marca 1 - Fazenda Rio Grande- PR (natural (dois lotes), laranja, pêssego, limão e canela); Marca 2 - Guarapuava-PR (natural, laranja, pêssego, limão, canela e capuccino); e Marca 3 - Chapecó-SC (natural, pêssego, limão e canela – dois lotes para cada sabor). A escolha das amostras para o estudo de bioacessibilidade foi feita levando-se em consideração a disponibilidade comercial, e assim, a maior facilidade de consumo pela população. Antes da avaliação das frações bioacessíveis, as decocções de chá-mate foram preparadas e quantificadas por AAS conforme procedimento já descrito.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da forma de obtenção do chá através do preparo da sua infusão ou decocção, optou-se por utilizar uma mesma amostra de chá-mate adquirida aleatoriamente e definida como amostra “modelo”. A infusão ou a decocção do chá foi realizada com a amostra em “pó” em um volume de 100 mL de água ultrapura. A Tabela 4.5 apresenta a matriz e os resultados do planejamento fatorial obtidos para os elementos Zn e Cr quantificados em infusões de chá-mate empregando AAS, além dos valores de efeito principal e interação entre os fatores avaliados.

**Tabela 4.5.** Matriz e resultados para planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central para determinação de Zn e Cr em chá-mate, e valores de efeitos principais e de interação entre os fatores avaliados

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Zn (µg g <sup>-1</sup> )	Cr (ng g <sup>-1</sup> )
1 (duplicata)	3 (-1)	50 (-1)	0,2 ± 0,1	25,4 ± 16,3
2 (duplicata)	10 (+1)	50 (-1)	1,6 ± 0,4	37 ± 21
3 (duplicata)	3 (-1)	90 (+1)	0,9 ± 0,3	33 ± 6
4 (duplicata)	10 (+1)	90 (+1)	1,6 ± 0,9	47,9 ± 2,6
5 (duplicata)	7 (0)	70 (0)	0,7 ± 0,4	33,3
Efeitos		Zn (Estimativas ± Erro padrão)	Cr (Estimativas ± Erro padrão)	
<i>Média global</i>		1,06 ± 0,18	31,1 ± 3,8	
<i>Principais efeitos</i>				
Tempo		1,08 ± 0,36	22,3 ± 7,6	
Temperatura		0,36 ± 0,36	18,4 ± 7,6	
<i>Efeitos de interação</i>				
TemperaturaxTempo		-0,36 ± 0,36	-7,2 ± 7,6	

A Tabela 4.5 mostra os resultados para Zn e Cr em chá-mate obtidos pelo planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central. Pelos dados da Tabela 4.5 foi possível verificar que tanto para Zn quanto para Cr, quando há aumento do tempo de preparo das infusões, há um aumento na concentração do metal na infusão, como já é esperado.

A Tabela 4.5, apresenta também os valores de efeitos principais e de interação obtidos no planejamento proposto para Zn e Cr em infusões de chá-mate. Para Zn os efeitos variaram de -0,36 a 1,08. Ao calcular a significância dos efeitos principais e de interação do planejamento fatorial, tem-se:  $t_5 = 2,571 \times 0,36 = 0,92$ , o que demonstra que apenas o tempo mostrou ser significativo na determinação de Zn em infusão de chá-mate, já que o valor para este efeito (1,08) foi superior a 0,92. Para Cr, os efeitos variaram de -7,2 a 22,3. Através do cálculo de significância dos efeitos tem-se:  $t_5 = 2,571 \times 7,6 = 19,5$ . Para Cr, considerando que os efeitos devem ter valor superior a 19,5 para serem significativos, também foi possível observar que o tempo foi o único fator que influenciou na determinação do metal em infusão de chá-mate, visto que o efeito (22,3) para o mesmo foi significativo no planejamento proposto. Esses resultados

comprovam aquilo que foi observado anteriormente, mostrando que um aumento no tempo de infusão favorece a extração de Zn e Cr de chá-mate.

A decocção do chá-mate também foi realizada a fim de verificar a quantidade de metal que é extraída através deste procedimento. Para Zn, a concentração média obtida foi de  $4,6 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para Cr foi observada uma concentração média de  $45 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$ .

Comparando-se os dados para infusão e decocção de chá-mate, percebe-se que as concentrações de Zn e Cr obtidas para o chá na decocção foram maiores do que as concentrações determinadas na infusão do mesmo. Isso é esperado, devido à maior temperatura e maior tempo de extração da bebida, o que influencia também na maior extração dos metais presentes no chá. Além disso, os desvios das replicatas das infusões para as concentrações de Zn e Cr, foram maiores que os desvios das replicatas para decocção dos chás. Isso pode indicar um maior controle analítico neste último procedimento, considerando o preparo das soluções e quantificação do metal de interesse por Espectrometria de Absorção Atômica. Isso garante também uma maior confiabilidade nas análises.

Por esse motivo, optou-se por trabalhar com a decocção a fim de se conseguir melhores resultados de concentração para íons metálicos, além de maior repetitividade no preparo de replicatas dos chás e assim maior facilidade e confiabilidade no preparo da bebida.

As quantificações de Zn, Al, Cr, Pb, Cd e Cu foram realizadas, inicialmente, em 21 amostras de chá-mate provenientes dos estados do Paraná e Santa Catarina, e adquiridas comercialmente na cidade de Guarapuava – PR. Esses metais foram avaliados considerando o possível efeito nutricional ou tóxico que eles podem causar aos seres vivos, dependendo da quantidade ingerida dos mesmos na alimentação. Todos os chás foram preparados em triplicata, utilizando a massa seca de chá para preparo das decocções.

A Tabela 4.6 apresenta os teores de umidade e as concentrações médias obtidas nas decocções de chá-mate para todas as amostras, além dos limites de quantificação (LOQ) para cada metal estudado. O LOQ foi calculado através da relação  $10 \times SD/m$ , sendo  $m$  a inclinação da curva analítica e  $SD$  é o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (RIBANI et al., 2004; ARAÚJO, 2009).

**Tabela 4.6.** Valores médios de umidade, e concentração para metais (n=3) determinados por AAS, em decocções de chá-mate de diferentes marcas e sabores

Marca	Umidade (%)	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Al ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cr ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Pb ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Cd ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Cu ( $\text{ng g}^{-1}$ )
M1CC	2,6 $\pm$ 0,1	15,8 $\pm$ 0,4	52 $\pm$ 1	304 $\pm$ 16	114 $\pm$ 7	43 $\pm$ 5	761 $\pm$ 22
M1DL	2,5 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2	231 $\pm$ 10	273 $\pm$ 17	61 $\pm$ 4	530 $\pm$ 10
M1La	1,2 $\pm$ 0,2	15,2 $\pm$ 0,3	43 $\pm$ 4	250 $\pm$ 22	139 $\pm$ 20	31 $\pm$ 4	508 $\pm$ 8
M1C	1,0 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,2	64 $\pm$ 2	443 $\pm$ 22	210 $\pm$ 20	47 $\pm$ 2	616 $\pm$ 18
M1NG	22,3 $\pm$ 0,6	23,3 $\pm$ 0,8	46 $\pm$ 5	180 $\pm$ 12	< 28,1	37 $\pm$ 4	508 $\pm$ 28
M1P	3,7 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 1	20,0 $\pm$ 0,2	168 $\pm$ 8	87 $\pm$ 4	31 $\pm$ 2	505 $\pm$ 4
M1Li	2,7 $\pm$ 0,2	17,0 $\pm$ 0,3	18 $\pm$ 4	225 $\pm$ 7	73 $\pm$ 7	37 $\pm$ 5	442 $\pm$ 19
M1N	2,0 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,3	50 $\pm$ 1	160 $\pm$ 2	53 $\pm$ 5	29 $\pm$ 3	414 $\pm$ 19
M1QTO	2,2 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 0,1	51 $\pm$ 4	161 $\pm$ 11	76 $\pm$ 9	31 $\pm$ 2	403 $\pm$ 8
M2N	3,7 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,2	23 $\pm$ 2	46 $\pm$ 12	74,1 $\pm$ 0,5	17 $\pm$ 2	714 $\pm$ 11
M2Q	2,9 $\pm$ 0,2	9,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 1	37,4 $\pm$ 0,2	60 $\pm$ 7	21 $\pm$ 1	519 $\pm$ 13
M2MC	3,7 $\pm$ 0,1	9 $\pm$ 1	13,5 $\pm$ 0,6	38 $\pm$ 3	109 $\pm$ 7	19 $\pm$ 2	620 $\pm$ 14
M2M	3,6 $\pm$ 0,4	20,2 $\pm$ 0,2	49 $\pm$ 4	104 $\pm$ 7	81 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	769 $\pm$ 19
M2La	2,9 $\pm$ 0,1	8,6 $\pm$ 0,3	9 $\pm$ 1	38 $\pm$ 2	90 $\pm$ 7	20,2 $\pm$ 0,8	323 $\pm$ 12
M2Li	3,0 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,8	11 $\pm$ 2	39 $\pm$ 5	62,8 $\pm$ 0,3	14 $\pm$ 2	609 $\pm$ 5
M2C	4,2 $\pm$ 0,2	12,4 $\pm$ 0,6	12 $\pm$ 1	161 $\pm$ 11	78 $\pm$ 2	8,7 $\pm$ 0,7	476 $\pm$ 8
M2P	3,7 $\pm$ 0,2	12,2 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 1	126 $\pm$ 8	80 $\pm$ 6	19 $\pm$ 1	798 $\pm$ 14
M3N	2,0 $\pm$ 0,1	37 $\pm$ 1	71 $\pm$ 4	142 $\pm$ 5	52 $\pm$ 9	68 $\pm$ 5	429 $\pm$ 33
M3P	1,8 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 0,4	53 $\pm$ 5	96 $\pm$ 3	119 $\pm$ 24	29 $\pm$ 2	322 $\pm$ 21
M3L	1,9 $\pm$ 0,7	21 $\pm$ 1	68 $\pm$ 10	204 $\pm$ 4	125 $\pm$ 16	62 $\pm$ 6	278 $\pm$ 22
M3C	1,6 $\pm$ 0,2	6 $\pm$ 1	128 $\pm$ 11	71 $\pm$ 7	35,2 $\pm$ 0,6	19 $\pm$ 1	299 $\pm$ 20
LOQ	-	0,9	6,3	11,7	28,1	1,4	16,8

M1CC (Marca 1, chocolate e canela); M1DL (Marca 1, Doce de Leite); M1La (Marca 1, laranja); M1C (Marca 1, canela); M1NG (Marca 1, natural granel); M1P (Marca 1, pêssego); M1Li (Marca 1, limão); M1N (Marca 1, natural); M1QTO (Marca 1, quarteamento); M2N (Marca 2, natural); M2Q (Marca 2, quentão); M2MC (Marca 2, maçã com canela); M2M (Marca 2, morango); M2La (Marca 2, laranja); M2Li (Marca 2, limão); M2C (Marca 2, canela); M2P (Marca 2, pêssego); M3N (Marca 3, natural); M3P (Marca 3, pêssego); M3L (Marca 3, limão); M3C (Marca 3, canela); LOQ (Limite de quantificação).

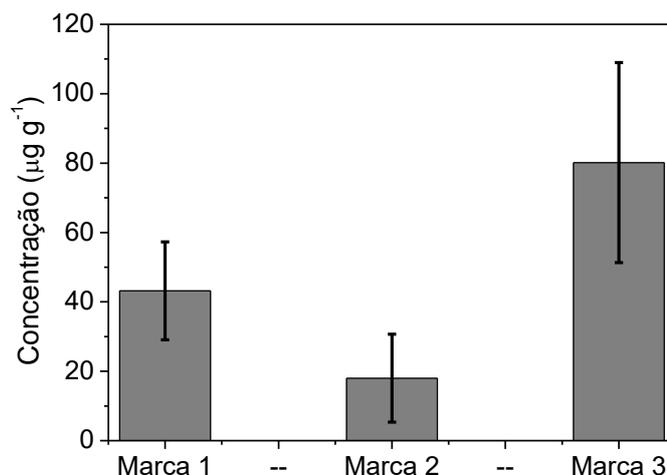
De acordo com a Tabela 4.6 pode-se verificar que em relação ao teor de umidade das amostras de chá-mate, este variou de  $1,0 \pm 0,3$  a  $22,3 \pm 0,6\%$ . No geral, estes teores foram similares em todas as amostras, com exceção da MING. Esta amostra não é embalada individualmente (em saquinhos), o que pode ser um dos motivos do maior teor de umidade apresentada pela mesma.

Em relação à concentração de metais, calculados com relação à massa seca de chá-mate, destaca-se primeiramente, a amostra proveniente do quarteamento (M1QTO). Observou-se que as concentrações de metais encontradas nessa amostra foram muito próximas às concentrações encontradas na amostra MIN, da mesma marca e sabor. Ou seja, o uso de apenas um lote de amostra na quantificação de íons metálicos, pode ser considerado representativo para os outros lotes do produto.

Para Zn, as concentrações variaram de  $6,0 \pm 0,9$  a  $37 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ . A maior e menor concentração do metal foram apresentadas por amostras da marca 3, o que pode indicar problemas de uniformidade no beneficiamento da erva-mate para produção de chá, ou uso de erva proveniente de diferentes locais de cultivo. Além disso, a variabilidade de Zn existente entre todas as amostras pode estar associada à diferença no teor do metal em solos, ou pelo uso de aditivos que podem alterar a concentração do metal no produto (MARCHI et al., 2009). Esse metal é considerado um micronutriente essencial, se ingerido em doses adequadas, pois atua na estrutura e na catálise de metaloenzimas, além de agir na regulação da expressão genética (SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006).

Para Al foram encontradas concentrações em chá-mate de  $7 \pm 1$  a  $128 \pm 11 \mu\text{g g}^{-1}$ . Essa grande variabilidade pode estar relacionada, principalmente, com a composição do solo de cultivo da erva-mate. Estudos relatam que esse tipo de planta apresenta alta afinidade por Al, principalmente se cultivada em solo ácido (CARR et al., 2003; BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011). Além disso, os maiores teores do metal no chá-mate podem estar associados com o fato de que os solos onde são cultivados a erva-mate, desde o Norte do Rio Grande do Sul até o Nordeste do Paraná, são solos com alto teor de matéria orgânica e com altas concentrações de Al trocável (STURION e DE RESENDE, 2010). Considerando que as amostras avaliadas são provenientes de dois estados do Sul, isso pode indicar uma justificativa para as significativas concentrações do metal encontradas na bebida proveniente do mate.

O processamento do chá-mate, também pode ser um fator importante para a diferença no teor do metal, visto que a marca 3 foi a que apresentou maior concentração e maior variabilidade no teor de Al em suas amostras. A Figura 4.1 mostra a semelhança/diferença entre as marcas de chá-mate avaliadas neste estudo com relação ao teor de Al quantificado.

**Figura 4.1.** Concentração média total de Al nas três marcas de chá-mate estudadas

Com relação à Figura 4.1, na qual são apresentadas as concentrações de Al para as 3 marcas de chá-mate avaliadas, pode-se observar que a marca 3 foi a que apresentou maior concentração e maior variabilidade no teor de Al em suas amostras. Isso pode ser um indicativo de problema no processamento do chá, como já comentado, ou também, pode ter origem da própria área de cultivo da erva-mate, a qual foi utilizada na industrialização do chá.

Geralmente, as concentrações deste metal encontradas em folhas de erva-mate podem variar em 1 a 25 mg g<sup>-1</sup> em média (DE CAMPOS et al., 2014). Na literatura, podem ser encontradas concentrações de 78,60 µg g<sup>-1</sup> de Al em infusões de erva-mate (WRÓBEL, WRÓBEL e URBINA, 2000). A dose de Al considerada tolerável pelo Comitê Internacional de Avaliação de Riscos de Contaminação em Alimentos - o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives da FAO/WHO), é de 2 mg por kg de peso corpóreo por semana (FAO/WHO, 2014). Alguns estudos apontam que altas doses de ingestão de Al podem estar relacionadas com doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (MOLLOY et al., 2007; DA COSTA et al, 2009; MIRZA et al., 2017). No entanto, ainda não existe uma comprovação entre essas doenças e a concentração de Al presente no cérebro (BONDY e CAMPBELL, 2017).

Para Cu, a concentração em chá-mate variou de  $278 \pm 22$  a  $769 \pm 19$  ng g<sup>-1</sup>, sendo que as maiores concentrações foram observadas nas amostras pertencentes às marcas 1 e 2. Elevados teores deste metal em chá-mate podem estar relacionados com a concentração do mesmo no solo de cultivo de erva-mate. A ingestão diária recomendada de Cu é de 0,9 µg g<sup>-1</sup> (900 ng g<sup>-1</sup>) (BRASIL, 2005). Na literatura, infusões de erva-mate apresentam concentrações para Cu de 9,02 µg g<sup>-1</sup> (9020 ng g<sup>-1</sup>) (WRÓBEL, WRÓBEL e URBINA, 2000).

Para Cr verificou-se que a concentração variou de  $37,4 \pm 0,2$  a  $443 \pm 22$  ng g<sup>-1</sup>. Como Cr é encontrado naturalmente no ambiente, além de poder ser encontrado em fertilizantes

agrícolas, isso pode sugerir uma possível explicação para a grande variabilidade deste metal em chá-mate (MARCHI et al., 2009; NACKE et al., 2013). De acordo com a recomendação diária de Cr prescrita pela Agência de Alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA) o limite é de  $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $120 \text{ ng g}^{-1}$ ) do metal (FDA, 2013; MILANI, MORGANO e CADORE, 2016). Com base em algumas amostras avaliadas neste estudo, pode-se dizer que existe algum processo de contaminação ambiental, ou até mesmo industrial, que influencia na concentração do metal em chá-mate. Na literatura, infusões de erva-mate apresentam concentrações de Cr de  $1,07 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $1070 \text{ ng g}^{-1}$ ) (WRÓBEL, WRÓBEL e URBINA, 2000).

O Pb não exerce função no organismo humano, porém ele pode ser cumulativo, tornando-se assim, precursor de diversos danos à saúde: problemas no sistema nervoso, na medula óssea e nos rins, podendo ainda agir como promotor de alguns tipos de câncer (SCHIFER, JUNIOR e MONTANO, 2005; SKERFVING e BERGDAHL, 2007). As concentrações deste metal em chá-mate variaram de  $<28,1$  a  $273 \pm 17 \text{ ng g}^{-1}$ . Essa variabilidade pode estar relacionada com alguns processos de contaminação no cultivo da erva-mate (regiões próximas a indústrias ou de intenso tráfego de veículos) ou durante o processamento do produto. A Anvisa considera como limite aceitável  $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $600 \text{ ng g}^{-1}$ ) de Pb em chás, erva-mate e outros vegetais para infusão (BRASIL, 2013). Vulcano et al. (2008), avaliaram infusões de erva-mate e encontraram concentrações de  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $90 \text{ ng g}^{-1}$ ) de Pb nas infusões.

A concentração de Cd nas bebidas provenientes das amostras de chá variou de  $8,7 \pm 0,7$  a  $68 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$ . Foi possível verificar que novamente as amostras da marca 3 apresentaram a maior variabilidade na concentração do metal, o que pode sugerir algum processo de contaminação. O Cd não exibe funções primordiais no metabolismo dos seres vivos, sendo até mesmo tóxico e cumulativo (WAALKES, 2003). Segundo as Farmacopéias Alemã e Européia, os teores aceitos de Cd em vegetais (folhas, frutos e raízes) é de  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ) (SAIDELLES et al., 2010). A Anvisa tolera limites de  $0,40 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $400 \text{ ng g}^{-1}$ ) de Cd em chás, erva-mate e outros vegetais para infusão (BRASIL, 2013). Para Cd, nenhuma das amostras de chá avaliadas ultrapassaram esse limite. Na literatura podem ser encontrados concentrações de Cd de  $1,4 \pm 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $70 \text{ ng g}^{-1}$ ) em infusões de erva-mate (VULCANO, SILVEIRA E ALVAREZ-LEITE, 2008).

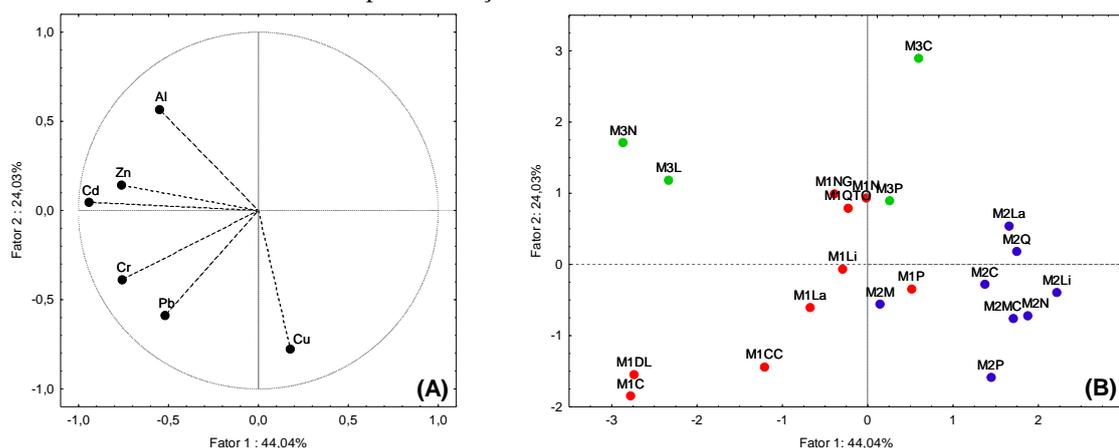
Devido ao grande número de amostras e a variabilidade nas concentrações dos metais, foi realizado uma Análise de Componentes Principais (PCA).

No presente trabalho, os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais foram as concentrações de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr para decocções de chá-mate. A partir desses parâmetros foi construída uma matriz de dados de dimensão que corresponde aos seis

parâmetros e seus respectivos valores obtidos para 21 amostras de chá-mate dos Estados do Paraná e Santa Catarina.

A Figura 4.2 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 4.2.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados para decocção de chá-mate



**Legenda:** ● Marca 1; ● Marca 2; ● Marca 3.

Pela Figura 4.2, observa-se que a 1ª e 2ª componentes principais foram suficientes para explicar 68,07% da variabilidade dos dados, sendo que a 1ª componente foi responsável por explicar 44,04% da relação existente entre as amostras no que diz respeito às variáveis consideradas. A explicação de 68% da variância dos dados é satisfatória, pois os parâmetros utilizados dependem de aspectos relacionados com posição geográfica, atividades antrópicas, etc.

Pela Figura 4.2A, é possível observar pela primeira componente principal (PC1) que a menor correlação é apresentada pela variável Cu. Todas as outras variáveis apresentaram elevados coeficientes de correlação ( $> -0,52$ ), sendo inversamente correlacionadas a concentração de Cu. Para a segunda componente (PC2) o coeficiente de correlação mais significativo foi apresentado pelo Cu ( $-0,78$ ), seguido pelo Pb ( $-0,59$ ). Inversamente correlacionado a estas variáveis está o Al, com o coeficiente positivo mais significativo ( $0,57$ ).

Avaliando-se os dados contidos na Figura 4.2B nota-se que a primeira componente principal foi responsável pela separação das amostras de chá-mate em função do fabricante (Marca). Comparando-se os dois gráficos, é possível verificar que as amostras de chá localizadas no eixo positivo de X e nos eixos negativo e positivo de Y em relação a CP1, são amostras da Marca 2 de diferentes sabores, as quais foram separadas devido à concentração de Cu. A maior concentração deste metal nas amostras pode estar relacionada a algum tipo de

contaminação industrial, proveniente, principalmente, dos equipamentos da indústria. Ou ainda, essa concentração pode estar relacionada com o cultivo da erva-mate, sendo que o solo de origem pode apresentar altas concentrações deste metal.

As amostras localizadas no eixo negativo de X e Y, pertencentes a marca 1, apresentaram forte correlação com os teores de Pb e Cr. Além disso, as amostras in natura (M1N, M1QTO e M1NG), para essa mesma marca, e que estão localizadas no eixo negativo de X e positivo de Y, apresentaram maiores concentrações de Cd, Zn e Al, fato observado para as amostras natural e com sabor laranja da marca 3 (M3N e M3L).

A marca 3 foi a que apresentou maior disparidade entre as suas amostras, com relação à concentração dos elementos, sendo que o chá sabor pêssego (M3P) e sabor canela (M3C), foram as amostras que apresentaram a menor concentração de todos os metais estudados. Com relação à aparência visual, essas amostras da marca 3, se comparadas as outras 2 marcas, apresentam diferentes colorações e acúmulo de material sólido extra-fino não assemelhado a erva-mate, como pode ser observado na Figura 4.3.

**Figura 4.3.** Aspecto físico das amostras de chá-mate pertencentes as Marcas 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita)



**Fonte:** A autora.

Portanto, com a análise de componentes principais, nota-se que a característica das amostras de chá-mate avaliadas, em termos de metais, pode estar relacionada com o local de processamento do produto (neste caso, se observou uma maior uniformidade para a marca 2), ou com o local de cultivo da erva-mate (amostras que apresentaram maior teor de metais traço, podem estar sujeitas a algum tipo de contaminação, provavelmente de origem antrópica).

As concentrações de metais apresentadas por alguns chás avaliados apontam para a necessidade de verificar a segurança alimentar do produto para os seres humanos, avaliando o grau de ingestão destes metais pelo consumo frequente da bebida.

#### 4.2.1 Grau de Ingestão Humana de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr em Função do Consumo de Chá-mate

Foram calculados os teores de ingestão de metais considerando o consumo de 1,75 g de chá-mate, na forma de decocção. A Tabela 4.7 apresenta os valores de uma estimativa de dose de ingestão dos metais. Foram utilizados os teores médios dos metais obtidos nas 21 amostras do Paraná e Santa Catarina.

**Tabela 4.7.** Estimativa da ingestão de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr através do consumo frequente de chá-mate

Frequência de ingestão	Zn ( $\mu\text{g}$ )	Al ( $\mu\text{g}$ )	Pb ( $\mu\text{g}$ )	Cd ( $\mu\text{g}$ )	Cr ( $\mu\text{g}$ )	Cu ( $\mu\text{g}$ )
Diariamente	27,19	73,16	0,18	0,06	0,28	0,93
Semanalmente	190,32	512,10	1,25	0,40	1,93	6,51
Mensalmente	815,65	2194,69	5,38	1,73	8,29	27,88

Com base na Tabela 4.7 é possível observar que o teor de ingestão humana dos metais seguiu a ordem de  $\text{Al} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Cd}$ . O Al, que segundo estudos já relatados na literatura, parece estar relacionado com algumas doenças graves para os seres vivos, foi o que apresentou maior teor de ingestão considerando o consumo frequente de chá-mate.

Em relação à ingestão da bebida por uma pessoa adulta de aproximadamente 70 kg, foi calculado uma estimativa de ingestão dos íons metálicos através do consumo frequente do produto. A Tabela 4.8 apresenta os dados obtidos para diferentes frequências de consumo do chá-mate por um adulto.

**Tabela 4.8.** Estimativa da ingestão humana de Zn, Al, Cu, Pb, Cd e Cr ( $\mu\text{g}$  por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) que consome chá-mate frequentemente (1 sachê - 1,75 g por dia)

Frequência de ingestão	Zn	Al	Pb	Cd	Cr	Cu
Diariamente	0,388	1,045	0,0026	0,0008	0,0039	0,013
Semanalmente	2,719	7,316	0,0179	0,0058	0,0276	0,093
Mensalmente	11,652	31,353	0,0768	0,0247	0,118	0,398

Em relação à ingestão humana de metais pelo consumo frequente de chá-mate (Tabela 4.8), um consumo semanal de 12,2 g de chá-mate fornece concentrações médias ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal) ingeridas significativas para Al (7,316), Zn (2,719), Cu (0,093), Cr (0,0276), Pb (0,0179) e Cd (0,0058). A JECFA (FAO/WHO) - Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives - considera aceitável uma dose semanal de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  por peso corpóreo para Pb (apesar de atualmente esse

valor não ser mais aceito e não sendo segura nenhuma dose de ingestão do metal); e  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  por peso corpóreo ( $2000 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) para Al. A dose mensal considerada aceitável para Cd é  $25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  por peso corpóreo (FAO/WHO, 2014). Para Cr, em relação ao limite de ingestão humana diária, considera-se aceitável  $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  por peso corpóreo ( $35 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  por peso corpóreo semanalmente) (BAARS et al., 2001). Para Zn e Cu, são considerados dose diárias aceitáveis de 1 e  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  por peso corpóreo (FAO/WHO, 2014).

Observando-se os dados obtidos neste trabalho, todos os valores de ingestão dos metais através do consumo de chá-mate na forma de decocção estão abaixo do limite aceitável. No entanto, é necessário a realização de testes experimentais que demonstrem a real bioacessibilidade ou até mesmo a biodisponibilidade toxicológica de íons metálicos através do consumo de bebidas como o chá-mate. Isso é necessário visto que a interação das enzimas, que atuam na digestão dos alimentos, com os íons metálicos de interesse, pode modificar a absorção dos mesmos pelo organismo vivo.

#### 4.2.2 Implementação de Procedimentos Analíticos para Determinação da Bioacessibilidade *In Vitro* de Íons Metálicos em Chá-mate

Como comentado no capítulo anterior (para iogurte), a grande variedade de estudos para avaliação da bioacessibilidade de metais e outros nutrientes em alimentos, acaba dificultando a implementação de um procedimento para a simulação *in vitro*. Nos testes iniciais com os três procedimentos para avaliação da fração bioacessível de íons metálicos a partir de decocção de chá-mate, o uso do procedimento 3 (P3) foi impossibilitado. Como já comentado anteriormente, além deste procedimento não ser adequado para aplicação em estudos de especiação, por exemplo, os resultados para curva analítica, controle analítico, e até mesmo das frações bioacessíveis dos íons metálicos não foram adequados para o objetivo do estudo. A diferença entre as inclinações das curvas em meio aquoso e meio enzimático foram significativas, sendo que em meio enzimático observou-se uma diminuição na inclinação das curvas, tanto para Cu quanto para Zn, e um aumento significativo na inclinação da curva para Cr. Os controles analíticos foram elevados para todos os metais. Já para as frações bioacessíveis, testes iniciais mostraram uma interferência das enzimas (em quantidade elevada neste procedimento), no processo de digestão, resultando em uma baixa bioacessibilidade para os metais da matriz avaliada. Assim, do mesmo modo que para iogurte, apenas os procedimentos 1 e 2 foram investigados na determinação da bioacessibilidade de íons metálicos a partir de chá-mate.

Para estudos de determinação das frações bioacessíveis, Zn, Cu e Cr foram primeiramente quantificados em frações bioacessíveis de chá-mate, considerando que foram observadas menores interferências nas análises destes elementos.

Antes da quantificação das frações bioacessíveis de íons metálicos na bebida, foi realizado um estudo das curvas analíticas, a fim de verificar possíveis interferências das enzimas utilizadas nos procedimentos de bioacessibilidade na quantificação dos metais por AAS. Para isso, foram avaliadas 3 curvas analíticas, contemplando as condições de preparo das amostras por digestão enzimática nos dois procedimentos investigados, e a curva com padrão externo. Para Zn, como a condição de análise da decocção de chá-mate por FAAS foi a mesma utilizada para quantificação do metal em suspensão de iogurte, não foi necessário verificar a linearidade das curvas de interesse já que anteriormente (para bioacessibilidade de metais de iogurte) foi observado que não existe interferência das enzimas na quantificação do metal nas frações bioacessíveis.

Os dados das curvas de padrão externo e em meio enzimático foram utilizados para calcular o coeficiente de regressão linear e de determinação ( $R^2$ ) (Tabela 4.9). Modelos de regressão linear foram avaliados e um teste de falta de ajuste foi aplicado no nível de confiança de 95%. A Tabela 4.9 apresenta os parâmetros de regressão das curvas para determinação de elementos em decocção de chá-mate, em cada condição estudada e para cada metal de interesse.

**Tabela 4.9.** Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Cu e Cr em chá-mate

Calibração	Parâmetros de regressão			Avaliação da linearidade			
	Equação	$R^2$	Regressão		Falta de ajuste		
			$F_{reg}$	$p$	$F_{faj}$	$p$	
Cu (3,0-15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PE	$A = 0,0056(\pm 0,0015) + 0,0079(\pm 0,0002) \times C_{Cu}$	99,7	2642,4	0,000	3,56	0,103
	CP1	$A = 0,0014(\pm 0,0019) + 0,0080(\pm 0,0003) \times C_{Cu}$	97,6	360,0	0,000	0,40	0,760
	CP2	$A = 0,0086(\pm 0,0014) + 0,0076(\pm 0,0001) \times C_{Cu}$	99,7	3078,4	0,000	2,25	0,200
Cr (2,0-10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PE	$A = 0,0092(\pm 0,0023) + 0,0214(\pm 0,0004) \times C_{Cr}$	99,8	3679,3	0,000	0,33	0,805
	CP1	$A = 0,0036(\pm 0,0019) + 0,0221(\pm 0,0003) \times C_{Cr}$	99,7	3136,8	0,000	5,05	0,057
	CP2	$A = 0,0072(\pm 0,0011) + 0,0219(\pm 0,0002) \times C_{Cr}$	99,9	15893,3	0,000	2,21	0,205

\*Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança dos coeficientes lineares e angulares;  $F_{crítico}(1;8;0,05)$  para Regressão = 5,32 e  $F_{crítico}(3;5;0,05)$  para Falta de ajuste = 5,41 para Cr e Cu

Em relação à Tabela 4.9, para os 2 metais avaliados e para os dois procedimentos estudados (P1 e P2), os parâmetros de regressão mostraram que as inclinações entre as curvas analíticas com padrão externo (PE) e em meio enzimático (CP1 e CP2) foram similares. Isso demonstra a possibilidade do uso da curva de padrão externo na quantificação das frações bioacessíveis de Cu e Cr em decocção de chá-mate.

A Tabela 4.9, mostra também, o modelo de regressão linear, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e valores de  $F_{reg}$  e  $F_{faj}$  para as curvas analíticas. Para  $R^2$ , os valores variaram entre 97,6 para 99,9 (ou seja, para  $r$  - coeficiente de correlação – os valores variaram de 0,988 a 0,999), indicando uma relação linear entre o sinal de absorbância e as concentrações dos elementos (ARAÚJO, 2009).

Modelos de regressão linear foram estudados utilizando *teste F* em um nível de confiança de 95%. Valores de  $F_{reg}$  variaram de 360,0 a 15893,3, sendo que todos os valores de  $F_{reg} \gg F_{crítico}$ . Estes resultados indicam que a regressão linear é significativa para todas as curvas avaliadas. Testes de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) em um nível de confiança de 95% foram utilizados para confirmar a linearidade das curvas analíticas. Em todos os casos, foram observados valores de  $F_{faj}$  (0,33 a 5,05) menores que os valores de  $F_{crítico}$  (5,41), indicando que  $F_{faj}$  não foi significativo no nível de confiança adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, a linearidade das curvas analíticas é aceitável, não sendo observado falta de ajuste dos modelos lineares construídos.

Com a avaliação e escolha da melhor forma de calibração (neste caso curva com padrão aquoso) para os metais de interesse no estudo de bioacessibilidade, foi possível calcular o LOD e o LOQ para os mesmos. Os valores obtidos para os metais estudados pelos dois procedimentos de bioacessibilidade avaliados, são mostrados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10.** Valores de LOD e LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ ) para determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em decocção de chá-mate para P1 e P2

Metal	Chá-mate			
	P1		P2	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Zn	64,7	216	44,9	149,7
Cu	6,2	20,7	9,39	31,3
Cr	1,7	5,7	1,3	4,4

De modo geral, para bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr a partir da decocção de chá-mate, valores para LOD e LOQ foram similares entre os dois procedimentos estudados. Para Zn e Cr foi observado que maiores valores de LOD e LOQ foram encontrados para o P1, sendo que para Cu observou-se o contrário, P2 forneceu maiores valores para limites de detecção e quantificação. Considerando a complexidade do meio extrator da fração bioacessível, os limites de detecção e quantificação podem ser considerados adequados.

Com os estudos de bioacessibilidade realizados anteriormente, foi possível verificar que testes em solução aquosa contendo os íons metálicos de interesse, demonstraram que há uma interação de Zn com as enzimas do procedimento, reduzindo a fração bioacessível, para

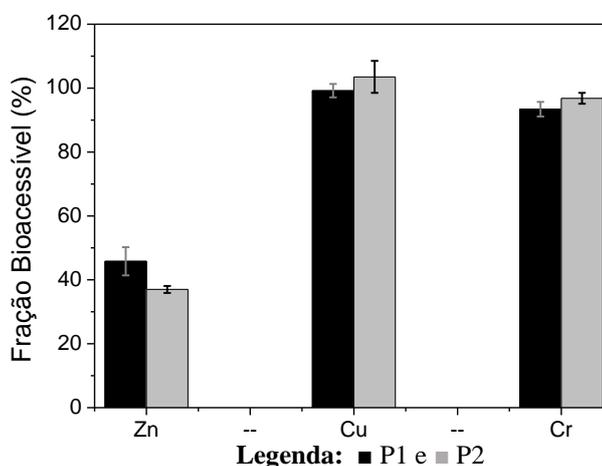
aproximadamente 50% nos dois procedimentos avaliados. Para Cr e Cu, as frações bioacessíveis foram próximas a 100%.

Com base nestes resultados em solução aquosa simulada, foi realizada a quantificação das frações bioacessíveis de Cr, Cu e Zn em decocção de chá-mate. Porém, antes de verificar a fração bioacessível, os metais foram quantificados na bebida, conforme os estudos realizados neste trabalho.

Brevemente, as decocções foram preparadas com aproximadamente 1,65 g de chá (massa seca) e água ultrapura (100 mL), sendo levadas à fervura em chapa de aquecimento, e permanência nesta condição por 5 min. A decocção foi injetada diretamente no equipamento para determinação de Zn por FAAS. Para determinação de Cu e Cr, 20  $\mu\text{L}$  da decocção foi injetada diretamente no tubo de grafite para análise por GF AAS. A quantificação das frações bioacessíveis foi realizada utilizando as mesmas condições de análise para a determinação da concentração total de metais em decocção de chá-mate por AAS (ver Tabela 4.2).

Para decocção de chá-mate, foram encontradas concentrações de 22, 0,4 e 0,28  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Zn, Cu e Cr, respectivamente. As frações bioacessíveis para ambos metais nas matrizes de interesse após procedimentos de bioacessibilidade *in vitro* são mostradas na Figura 4.4.

**Figura 4.4.** Fração bioacessível de Zn, Cu e Cr em decocções de chá-mate determinadas por AAS



Como pode ser observado na Figura 4.4, Cr e Cu apresentaram frações bioacessíveis próximas a 100% a partir das decocções de chá-mate. Além disso, P1 e P2 apresentaram uma bioacessibilidade similar para os dois íons metálicos. Para Cu as frações bioacessíveis médias foram de  $99 \pm 2\%$  e  $103 \pm 5\%$ , para P1 e P2, respectivamente. Já para Cr as frações bioacessíveis foram de  $93 \pm 2\%$  e  $97 \pm 2\%$  para P1 e P2, respectivamente. Isso indica que a composição dos sucos gástrico e intestinal não influenciou na bioacessibilidade dos metais avaliados. Com relação ao Zn, para P1 e P2, as frações bioacessíveis foram de  $46 \pm 4\%$  e  $37 \pm 1\%$ ,

respectivamente. A menor bioacessibilidade de Zn em decocção de chá-mate pode estar relacionada com o fato deste metal interagir com as enzimas presentes no processo de digestão tornando-se indisponível para a absorção humana.

Considerando os resultados deste estudo, o procedimento 2 foi escolhido para determinação das frações bioacessíveis de íons metálicos em decocção de chá-mate. Como já foi dito, o procedimento 2 é mais complexo e mais próximo do processo natural de digestão humana.

Após a escolha do procedimento (P2) para a determinação da bioacessibilidade de Zn, Cu e Cr em chá-mate, ele foi testado na determinação das frações bioacessíveis de Al, Pb e Cd na bebida.

Para Al, assim como feito anteriormente para os outros elementos, foi realizado um estudo de bioacessibilidade prévio às análises em matrizes alimentares. O objetivo era verificar a interação entre o metal e as enzimas presentes no procedimento avaliado. Para isso, soluções aquosas foram preparadas com padrão metálico de Al ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). A fim de verificar se a concentração das enzimas influenciava no procedimento de bioacessibilidade para o metal, foram testadas duas condições de digestão enzimática: 1) uso de 1,5 mL; 2) uso de 2,5 mL de sucos gástrico e intestinal. Para um menor volume de sucos, ou seja, menor concentração de enzimas, a bioacessibilidade média foi de  $99 \pm 2\%$ . Para o maior volume de sucos gastrointestinais, de acordo com o procedimento já realizado para Zn, Cr e Cu na matriz de interesse, a fração bioacessível média de Al foi de  $108 \pm 8\%$ . Em ambos os casos a bioacessibilidade de Al foi total. Assim, o uso do procedimento com maior concentração de enzima poderia ser utilizado para avaliação da bioacessibilidade do metal em decocção de chá-mate.

Para Pb e Cd, considerando as dificuldades encontradas na determinação de metais em soluções resultantes do procedimento de bioacessibilidade, para soluções aquosas de íons metálicos, como apresentando no Capítulo anterior, alguns testes foram realizados para verificar a melhor forma de determinação destes metais em decocção de chá-mate. Para esta matriz também foi utilizado  $\text{HNO}_3$  na solução digerida e nas curvas analíticas, a fim de auxiliar na atomização destes metais. A concentração das enzimas nos procedimentos de bioacessibilidade também foram avaliadas, variando-se o volume de sucos gástrico e intestinal (2,5 mL e 1,5 mL).

Para decocção de chá-mate, tanto para Pb quanto para Cd, não foi observada diferença nas frações bioacessíveis em relação à concentração das enzimas (bioacessibilidade próxima a 65% para Cd e 40% para Pb), não sendo verificada também diferença entre os sinais analíticos

e sinais de fundo (BG) para os metais determinados por GF AAS. Em relação ao BG, este foi muito baixo para os dois metais e similar em ambas concentrações do meio enzimático. Neste caso, o uso do procedimento com adição de 2,5 mL de sucos gástrico e intestinal, poderia ser aplicado para os 6 metais de interesse (Zn, Cu, Cr, Pb, Cd e Al) na avaliação das frações bioacessíveis de decocção de chá-mate.

De mesmo modo que para Zn, Cu e Cr, as curvas analíticas com padrão externo e em meio enzimático foram avaliadas a fim de verificar qualquer efeito de matriz na determinação de Al, Pb e Cd por AAS. Os dados obtidos para as curvas analíticas foram utilizados para calcular o coeficiente de regressão linear e de determinação ( $R^2$ ). Modelos de regressão linear foram avaliados e um teste de falta de ajuste foi aplicado no nível de confiança de 95%. A Tabela 4.11 apresenta os parâmetros de regressão das curvas obtidas para bioacessibilidade de chá-mate, em cada condição estudada e para cada metal de interesse.

**Tabela 4.11.** Parâmetros das curvas analíticas e dados de linearidade para determinação da bioacessibilidade de Al, Pb e Cd em decocção de chá-mate

Calibração	Parâmetros de regressão		Avaliação da linearidade				
	Equação	$R^2$	Regressão		Falta de ajuste		
			$F_{reg}$	$p$	$F_{faj}$	$p$	
Al (0,5-2,0 mg L <sup>-1</sup> )	PE	$A = 0,0020(\pm 0,0002) + 0,0031(\pm 0,0001) \times C_{Al}$	98,2	588,0	0,000	0,20	0,821
	P2	$A = 0,0018(\pm 0,0002) + 0,0032(\pm 0,0002) \times C_{Al}$	96,9	344,8	0,000	0,65	0,546
Cd (0,2-1,0 µg L <sup>-1</sup> )	PE	$A = -0,0009(\pm 0,0007) + 0,0563(\pm 0,0011) \times C_{Cd}$	99,5	2702,9	0,000	0,50	0,692
	P2	$A = -0,0002(\pm 0,0006) + 0,0555(\pm 0,0010) \times C_{Cd}$	99,6	3353,6	0,000	1,27	0,338
Pb (2,0-8,0 µg L <sup>-1</sup> )	PE	$A = -0,00110(\pm 0,0004) + 0,00197(\pm 0,00007) \times C_{Pb}$	98,7	839,2	0,000	0,47	0,643
	P2	$A = -0,00110(\pm 0,00016) + 0,00162(\pm 0,00003) \times C_{Pb}$	99,7	3137,2	0,000	0,58	0,581

**Nota:** Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança dos coeficientes lineares e angulares

$F_{crítico}$  (1;10;0,05) para Regressão = 4,96 e  $F_{crítico}$  (2;8;0,05) para Falta de ajuste = 4,46 para Pb e Al

$F_{crítico}$  (1;13;0,05) para Regressão = 4,67 e  $F_{crítico}$  (3;10;0,05) para Falta de ajuste = 3,49 para Cd

Para Al e Cd, na Tabela 4.11, é possível verificar que não existe diferença entre as inclinações das curvas analíticas em padrão externo (PE) e em meio enzimático (P2). Isso demonstra que a determinação dos metais nas frações bioacessíveis de decocção de chá-mate podem ser realizadas utilizando curva analítica com padrão externo. Para Pb, em meio enzimático, houve uma diminuição da inclinação da curva analítica se comparada a curva com padrão externo. Isso indica que a quantificação deste metal nas frações bioacessíveis de decocção de chá-mate deve ser realizada em curva simulada com os sucos gástricos e intestinais do procedimento estudado.

A Tabela 4.11, mostra também o modelo de regressão linear, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e valores de  $F_{reg}$  e  $F_{faj}$  para as curvas analíticas. Para  $R^2$ , os valores variaram

entre 96,9 para 99,7, indicando uma relação linear entre o sinal de absorvância e as concentrações dos elementos (ARAÚJO, 2009).

Modelos de regressão linear foram estudados em um nível de confiança de 95%. Valores de  $F_{reg}$  variaram de 344,82 a 3353,61, onde  $F_{reg} \gg F_{crítico}$ , indicando que a regressão linear é significativa para todas as curvas avaliadas. A confirmação da linearidade das curvas analíticas foi realizada através de testes de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) em um nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de  $F_{faj}$  (0,20 a 1,27) foram menores que os valores de  $F_{crítico}$ , indicando que  $F_{faj}$  não foi significativo no nível de confiança adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, a linearidade das curvas analíticas é aceitável, não sendo observado falta de ajuste dos modelos lineares construídos.

Após avaliação das curvas analíticas, foi possível calcular o LOD e LOQ para Al, Pb e Cd determinados em decocção de chá-mate após digestão enzimática. Os valores de LOD obtidos para Al, Cd e Pb variaram de 0,47 ng g<sup>-1</sup> (Cd) a 2,4 µg g<sup>-1</sup> (Al). Para LOQ, foram obtidos valores entre 1,57 ng g<sup>-1</sup> (Cd) e 7,99 µg g<sup>-1</sup> (Al). Considerando a complexidade do meio extrator, com a presença de diferentes enzimas, os limites de detecção e quantificação para os metais estudados podem ser considerados adequados.

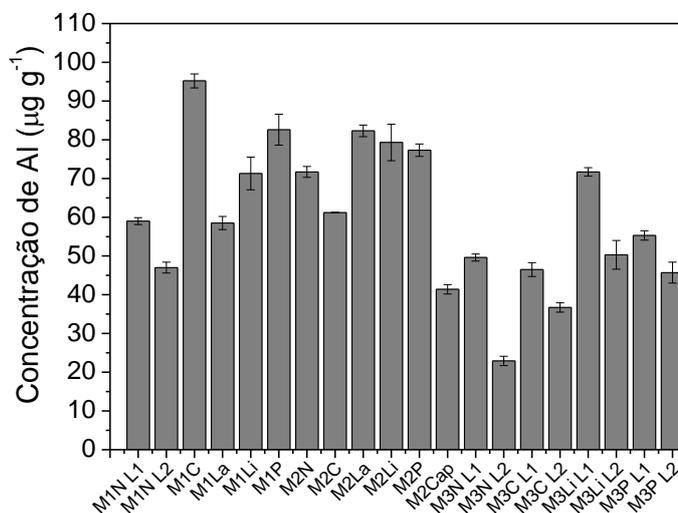
Tendo-se definido as melhores condições de quantificação das frações bioacessíveis de Zn, Al, Cr, Cu, Pb e Cd em decocção de chá-mate, os procedimentos de bioacessibilidade puderam ser avaliados na matriz de interesse.

#### 4.2.3 Determinação da Concentração Total de Íons Metálicos em Decocção de Chá-mate

A concentração total e os ensaios de bioacessibilidade *in vitro* foram aplicados para a determinação de Zn, Al, Cu, Cd, Cr e Pb em decocções de chá-mate. Apesar de anteriormente ter sido realizada uma quantificação de metais na bebida, aqui as determinações foram realizadas em novas amostras e em diferentes condições. Nas análises anteriores (Tabela 4.6), buscou-se avaliar o perfil da bebida na sua forma de consumo, em relação à presença de metais essenciais ou com potencial tóxico. Para o presente estudo, foram utilizados chá-mate de 3 marcas diferentes (às anteriormente avaliadas), com sabores diferentes e lotes diferentes. Ao todo, avaliaram-se 20 amostras de chá. Para as marcas 1 e 3, algumas amostras foram avaliadas em lotes diferentes. Isso foi realizado para verificar variações em relação à concentração dos metais ou nas frações bioacessíveis dos mesmos. Para a marca 3 optou-se por avaliar todas as amostras em lotes diferentes devido à maior variabilidade que as mesmas apresentaram em estudo anterior, em relação a concentração de metais.

A Figura 4.5 apresenta as concentrações de Al determinadas em decocção de chá-mate.

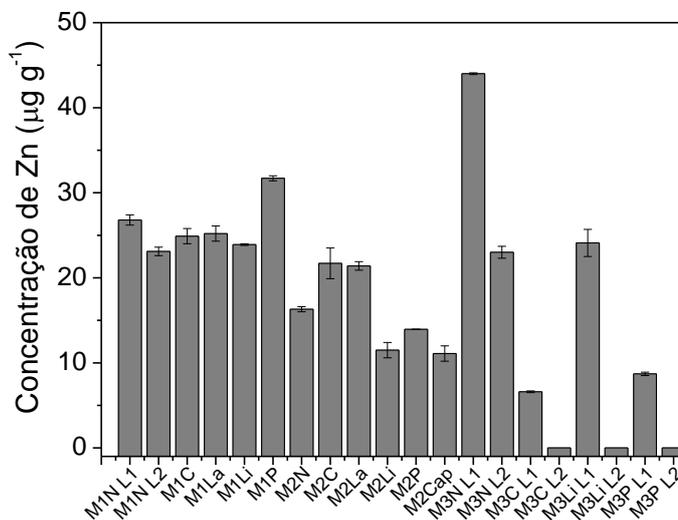
**Figura 4.5.** Concentrações de Al determinadas em decocções de chá-mate empregando FAAS



Para Al, as concentrações variaram de  $23 \pm 1$  a  $95 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para a marca 1 observou-se uma variabilidade significativa entre as amostras, inclusive para a M1N avaliada em dois lotes diferentes. A maior variabilidade ainda ocorreu em amostras da marca 3, sendo que para o chá de mesmo sabor, diferentes lotes apresentaram diferenças significativas. Essa maior variabilidade para esta marca, em relação à concentração de Al, já havia sido observada no estudo realizado anteriormente (Tabela 4.6).

Para Zn, as concentrações encontradas em decocções de chá-mate são apresentadas na Figura 4.6.

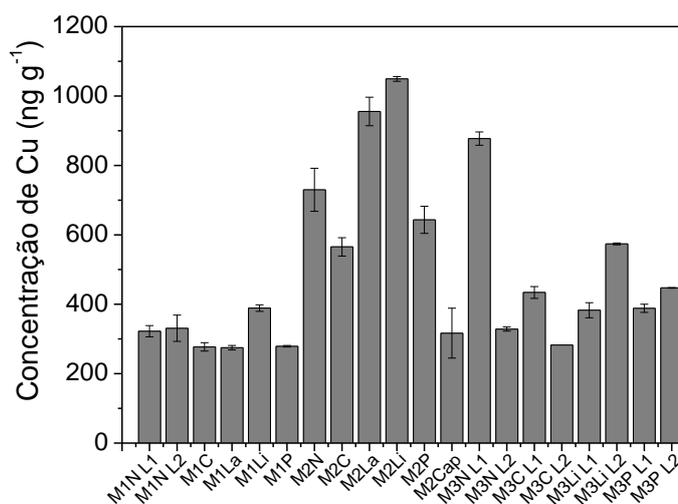
**Figura 4.6.** Concentrações de Zn determinadas em decocções de chá-mate empregando FAAS



Para Zn, as concentrações na bebida variaram de  $< 0,9$  a  $44,0 \pm 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ . De modo geral, as marcas 1 e 2 apresentaram a menor variabilidade entre as amostras em relação à concentração do metal. Para a marca 3, a variabilidade na concentração de Zn das amostras avaliadas foi muito significativa, o que pode indicar algum problema de contaminação industrial ou de origem da erva utilizada no processamento do chá.

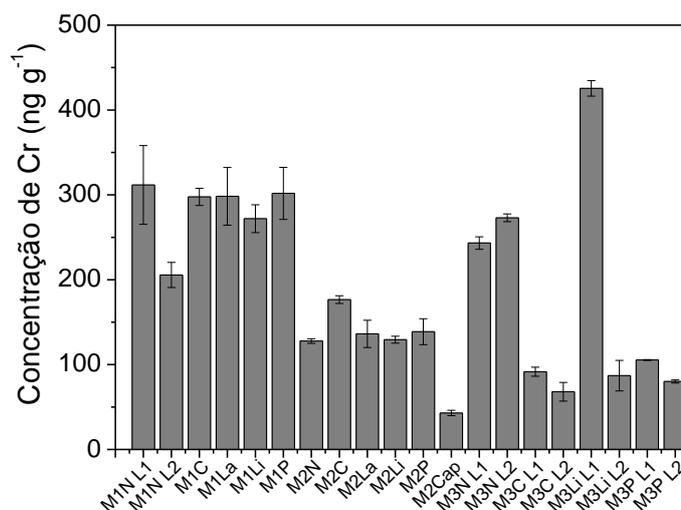
Na Figura 4.7 são mostradas as concentrações de Cu encontradas no chá-mate.

**Figura 4.7.** Concentrações de Cu determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS



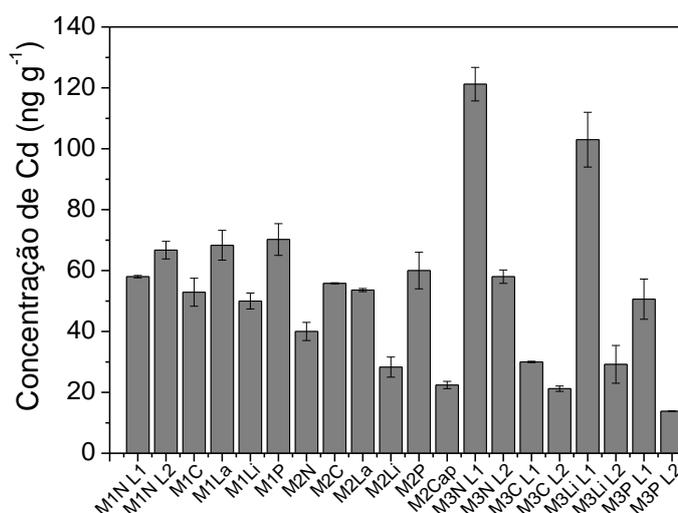
Para Cu, as concentrações variaram de  $275 \pm 6$  a  $1049 \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$ . As concentrações médias para cada marca foram diferentes, onde observou-se menor variabilidade para a marca 1. As maiores diferenças foram observadas para a marca 2, onde algumas amostras apresentaram concentrações elevadas do metal. No estudo realizado anteriormente para esta marca (Tabela 4.6), observou-se que as maiores concentrações de Cu eram apresentadas pelas amostras desta indústria, indicando que isso pode ser uma característica do solo de cultivo da erva-mate utilizada no processamento. Para a marca 3, houve uma grande diferença na concentração de Cu para amostras iguais, mas de lotes diferentes, como vem sendo observado para outros metais nessas amostras.

Para Cr, as concentrações encontradas em decocções de chá-mate são apresentadas na Figura 4.8.

**Figura 4.8.** Concentrações de Cr determinadas em decoções de chá-mate empregando GF AAS

A concentração de Cr nas amostras avaliadas variou de  $43 \pm 3$  a  $426 \pm 9$  ng g<sup>-1</sup>. Novamente a marca 1 foi a que apresentou menor variabilidade entre as amostras. Para a marca 2, com exceção da amostra M2Cap, as concentrações de Cr foram similares entre as amostras. A amostra M2Cap é a única com sabor diferenciado dos outros chás, e apresentou a menor concentração de quase todos os metais avaliados. Para a marca 3, novamente observou-se uma diferença entre as amostras avaliadas, indicando algum problema de controle de qualidade.

As concentrações de metais tóxicos, a exemplo de Cd e Pb, foram significativas em decoções de chá-mate. A Figura 4.9 apresenta as concentrações de Cd encontradas na bebida.

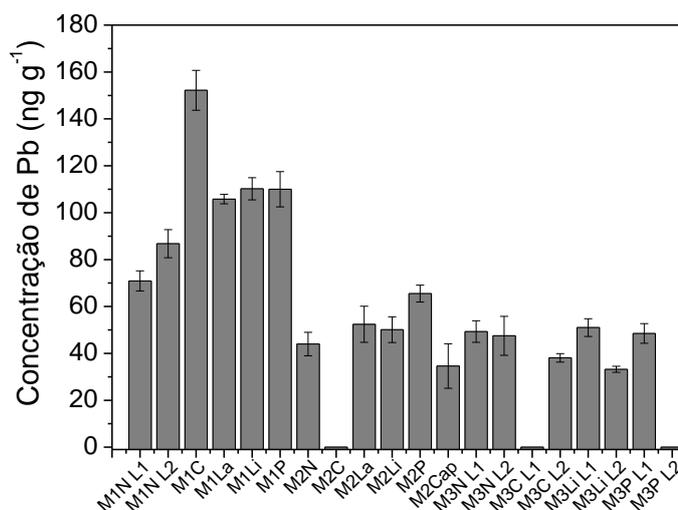
**Figura 4.9.** Concentrações de Cd determinadas em decoções de chá-mate empregando GF AAS

Para Cd, todas as amostras puderam ser quantificadas, e a faixa de concentração encontrada na bebida foi de  $13,8 \pm 0,1$  a  $121 \pm 6$  ng g<sup>-1</sup>. Observou-se também que a diferença

na concentração média do metal para as amostras em relação a marca seguiu a ordem de Marca 1 < Marca 3 < Marca 2. Novamente, a menor variabilidade na concentração de Cd entre as amostras da marca 1 pode ser um indicativo de maior controle de qualidade durante o processamento do chá, diferente do que é observado para a marca 3.

Para Pb, as concentrações encontradas em decocções de chá-mate são apresentadas na Figura 4.10.

**Figura 4.10.** Concentrações de Pb determinadas em decocções de chá-mate empregando GF AAS



Para Pb, quase todas as amostras apresentaram concentrações do metal, sendo que as menores concentrações foram apresentadas pelas amostras da marca 3, apesar de a variabilidade entre as mesmas ser bastante significativa. As concentrações para as amostras avaliadas variaram de <math>28,1</math> a  $152 \pm 6$  ng g<sup>-1</sup>. Para Pb, a menor variabilidade foi apresentada pela marca 2, onde as concentrações também foram baixas. A marca 1 foi a que apresentou maior concentração do metal nas amostras avaliadas (como já observado em estudos anteriores para amostras desta marca – Tabela 4.6). A presença de metais como Cd e Pb, pode estar relacionada a processos de contaminação ambiental, ou até mesmo devido ao processamento industrial do chá.

Os resultados para concentração dos íons metálicos de interesse em decocção de chá-mate estão apresentados na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12.** Quantificação de Al, Zn, Cu, Pb, Cd e Cr em decocção de chá-mate (n=3), empregando AAS

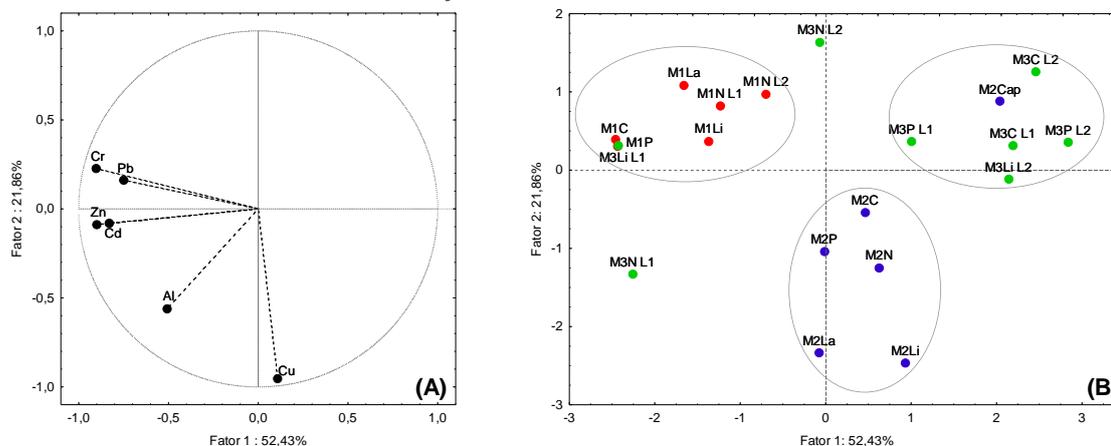
Amostra	Al ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Cr ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Cd ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Pb ( $\text{ng g}^{-1}$ )
M1N L1	59 ± 0,9	26,8 ± 0,6	322 ± 16	312 ± 46	58 ± 0,4	71 ± 4
M1N L2	47 ± 1	23,2 ± 0,5	331 ± 38	206 ± 15	67 ± 3	87 ± 6
M1C	95 ± 2	24,9 ± 0,9	277 ± 12	298 ± 10	53 ± 5	152 ± 9
M1La	58 ± 2	25,2 ± 0,9	275 ± 6	298 ± 34	68 ± 5	106 ± 2
M1Li	71 ± 4	23,9 ± 0,1	389 ± 10	272 ± 16	50 ± 3	110 ± 5
M1P	83 ± 4	32,7 ± 0,3	279 ± 2	302 ± 31	70 ± 5	110 ± 8
Média	69 ± 18	26 ± 4	312 ± 45	281 ± 39	61 ± 9	94 ± 39
M2N	72 ± 1	16,3 ± 0,3	730 ± 62	128 ± 3	40 ± 3	44 ± 5
M2C	61,2 ± 0,1	22 ± 2	565 ± 26	177 ± 5	55,8 ± 0,2	<28,1
M2La	82 ± 1	21,4 ± 0,5	956 ± 41	136 ± 16	53,6 ± 0,5	52 ± 8
M2Li	79 ± 5	11,5 ± 0,9	1049 ± 7	129 ± 4	28 ± 3	50 ± 6
M2P	77 ± 2	13,94 ± 0,02	643 ± 39	139 ± 15	60 ± 6	66 ± 4
M2Cap	41 ± 1	11,1 ± 0,9	317 ± 72	43 ± 3	22 ± 1	35 ± 10
Média	69 ± 15	16 ± 5	710 ± 267	125 ± 44	43 ± 16	41 ± 23
M3N L1	49,6 ± 0,9	44 ± 0,1	877 ± 19	243 ± 7	121 ± 6	49 ± 5
M3N L2	23 ± 1	23 ± 0,7	328 ± 6	273 ± 5	58 ± 2	48 ± 8
M3C L1	46 ± 2	6,6 ± 0,1	434 ± 17	92 ± 5	30 ± 0,2	<28,1
M3C L2	37 ± 1	<0,9	283 ± 0	68 ± 11	21,2 ± 0,9	38 ± 2
M3Li L1	72 ± 1	24 ± 2	383 ± 22	426 ± 9	103 ± 9	51 ± 4
M3Li L2	50 ± 4	<0,9	574 ± 3	87 ± 18	29 ± 6	33 ± 1
M3P L1	55 ± 1	8,7 ± 0,2	388 ± 12	105,5 ± 0,5	51 ± 7	48 ± 4
M3P L2	46 ± 3	<0,9	447,2 ± 0,8	80 ± 2	13,8 ± 0,1	<28,1
Média	47 ± 14	13 ± 16	464 ± 188	172 ± 129	47 ± 34	34 ± 22
Média geral	60 ± 18	18 ± 12	492 ± 241	191 ± 106	50 ± 24	54 ± 38
LOQ	6,3	0,9	16,8	11,7	1,4	28,1

M1N L1 (Marca 1, Natural, Lote 1); M1N L2 (Marca 1, Natural, Lote 2); M1La (Marca 1, laranja); M1C (Marca 1, canela); M1Li (Marca 1, limão); M1P (Marca 1, pêssego); M2La (Marca 2, laranja); M2Li (Marca 2, limão); M2C (Marca 2, canela); M2P (Marca 2, pêssego); M2Cap (Marca 2, Capuccino); M3N (Marca 3, natural); M3P (Marca 3, pêssego); M3L (Marca 3, limão); M3C (Marca 3, canela)

Devido à quantidade significativa de amostras avaliadas, uma análise quimiométrica pode possibilitar uma melhor visualização das semelhanças/diferenças entre as amostras e as concentrações dos metais. Para isso, uma análise de componentes principais foi realizada, sendo que as concentrações de Al, Zn, Cu, Pb, Cd e Cr obtidas para decocção de chá-mate foram utilizadas como variáveis para construção da matriz de dados.

A Figura 4.11 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 4.11.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de decocção de chá-mate



**Legenda:** ● Marca 1; ● Marca 2; ● Marca 3.

Com a PCA, observando-se a Figura 4.11, foi possível obter uma explicação de 74,3% da variabilidade dos dados. Somente a primeira componente foi responsável pela explicação de mais de 50% da variabilidade dos dados. Considerando as diferentes origens do chá-mate e as diferentes características das amostras, essa explicação é adequada.

Pela Figura 4.11A, é possível observar pela PC1 que existe uma correlação entre as variáveis Zn, Cr, Cd, Al e Pb para as decocções de chá-mate, sendo que estas apresentaram coeficientes de correlação significativos ( $> -0,51$ ). Para a segunda componente (PC2) os coeficientes de correlação mais significativos foram observados para as variáveis Al e Cu, sendo de  $-0,56$  e  $-0,95$ , respectivamente.

Avaliando-se a Figura 4.11B nota-se que a primeira componente principal foi responsável pelo agrupamento das amostras de chá em relação às marcas avaliadas. Pela PC1 (eixo X), a direita do gráfico (eixo positivo de X e negativo de Y), verifica-se que as amostras de chá-mate pertencentes à marca 2 foram agrupadas em relação à concentração de Cu, como já havia sido observado em estudos anteriores para as amostras dessa marca. Essa elevada concentração do metal pode estar relacionada com o cultivo da erva-mate, onde o solo pode ser rico nesse nutriente, ou com o processamento do chá. Essas amostras são provenientes da cidade de Guarapuava-PR, sendo que os cultivares da erva-mate também são provenientes da região, que vem se consolidando como uma forte produtora desse tipo de árvore. A única amostra da marca 2 que não foi agrupada com as outras da mesma marca, foi a M2Cap, que apresentou a menor concentração de todos os metais. Essa amostra mostrou-se similar à maioria das amostras da marca 3, que foram agrupadas no quadrante dos eixos positivo de X e Y. Mesmo sendo observada uma similaridade entre as amostras da marca 3, observou-se ainda que as mesmas

apresentaram maior variabilidade, sendo que amostras como M3N L1 e M3Li L1 não pertencem a esse grupo, se destacando em relação às concentrações de metais como Al, Cr e Pb. Outro agrupamento é observado para as amostras da marca 1, localizadas no quadrante dos eixos negativo de X e positivo de Y. Essas amostras se correlacionam fortemente com os teores de Pb, Cr, Cd e Zn. Essas amostras, como já conhecido, são processadas na cidade de Fazenda Rio Grande, na região metropolitana de Curitiba. As informações sobre essa marca, disponíveis no site da empresa, são de que a erva utilizada no processamento do chá é proveniente de diferentes localidades da região Sul do Brasil. A empresa responsável pelo processamento preza por um controle adequado de produção da erva-mate, tendo fornecedores que seguem padrões pré-estabelecidos para poderem vender a sua produção. Talvez os fertilizantes e agroquímicos usados na plantação tenham contribuído na presença de metais traço nessas amostras. Como o padrão de cultivo é similar entre os produtores, sendo acompanhado pela empresa, a variabilidade entre as amostras é menor e as mesmas apresentem concentrações de metais similares.

Como a bebida proveniente do chá-mate é amplamente consumida no Brasil, e em países Sul-americanos, e considerando a presença de espécies metálicas na mesma, torna-se necessário avaliar se o produto é adequado para consumo humano através de cálculos de ingestão diária.

Ao considerar a ingestão diária de chá-mate por seres vivos (1,75 g - 1 sachê), pode-se calcular a quantidade de Al, Zn, Cu, Cr, Cd e Pb que foram ingeridos por uma pessoa de 70 kg. Esses resultados são mostrados na Tabela 4.13. Os valores foram calculados utilizando a média e a faixa de concentração dos metais encontrados em decocção de chá-mate.

**Tabela 4.13.** Estimativa da ingestão humana de Al, Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$  por kg de peso corpóreo) para um adulto (70 kg) que consome chá-mate (1 sachê - 1,75 g por dia)

Frequência de ingestão	Al		Zn		Cu		Cr		Cd		Pb	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
Diária	1,51	0,57 – 2,38	0,45	0 – 1,1	0,012	$6,9 \times 10^{-3}$ – 0,026	$4,8 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$ – 0,01	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-4}$ – $3 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	0 – $3,8 \times 10^{-3}$
Semanal	10,6	4,0 – 16,7	3,2	0 - 7,7	0,086	0,048 – 0,18	0,03	$7,5 \times 10^{-3}$ – 0,07	$8,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$ – 0,021	$9,4 \times 10^{-3}$	0 – 0,03
Mensal	45,3	17,1 – 71,4	13,5	0 - 33	0,37	0,21 – 0,79	0,14	0,03 – 0,3	0,04	0,01 – 0,09	0,04	0 – 0,11

A Tabela 4.13, mostra que o nível de ingestão dos metais por seres humanos seguiu a ordem de  $Al > Zn > Cu > Cr > Pb > Cd$ . Considerando um adulto que consome chá, semanalmente, a ingestão média seria 10,3; 3,2; 0,086; 0,03;  $9,4 \times 10^{-3}$ ; e  $8,8 \times 10^{-3} \mu\text{g kg}^{-1}$ , para Al, Zn, Cu, Cr, Pb e Cd, respectivamente.

Para Zn, se tratando de um micronutriente essencial para a dieta humana, a ingestão diária recomendada (IDR) para adultos varia de 8 a 11  $\text{mg dia}^{-1}$ , para mulheres e homens, respectivamente (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004; BRASIL, 2005). Considerando a concentração média de Zn encontrada em decocção de chá-mate ( $18 \mu\text{g g}^{-1}$ ), a ingestão diária seria 0,032  $\text{mg}$  do metal. Isso corresponde a 0,4% da dose ideal diária de ingestão de Zn para mulheres e 0,3% para homens. Isso mostra que essa bebida parece não ser uma boa fonte nutricional do metal. Em relação à massa corpórea, a concentração permitida é de 1  $\text{mg}$  de Zn por  $\text{kg}$  de peso corpóreo (FAO/WHO, 2014), o que está bem acima dos valores teóricos obtidos neste estudo.

Para Al, Cu e Cd são aceitáveis doses de ingestão semanal de 2  $\text{mg kg}^{-1}$  ( $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  ( $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo, respectivamente (FAO/WHO, 2014). Para Cu, considerando também a sua essencialidade para a dieta humana, o valor de IDR é de 900  $\mu\text{g dia}^{-1}$  para adultos (IOM, 2001; BRASIL, 2005). Em relação à ingestão máxima permitida do metal, o valor é de 10  $\text{mg dia}^{-1}$  para adultos (IOM, 2001). A concentração média de Cu em chá-mate é de 492,4  $\text{ng g}^{-1}$ , o que corresponde a uma ingestão diária de 0,86  $\mu\text{g}$  do metal. Isso indica que a contribuição desta bebida para ingestão de Cu é de 0,1% para adultos, sendo muito baixa.

Para Pb, atualmente não existe dose segura de ingestão. A normativa mais recente considerava aceitável a ingestão semanal de até 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (FAO/WHO, 2014). Para Cr, um limite aceitável para ingestão diária é de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo (ou 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo para ingestão semanal) (BAARS et al., 2001).

De acordo com os dados obtidos na Tabela 4.13, todos os valores de ingestão frequente de metais através do consumo de chá-mate calculados neste estudo, estão abaixo dos valores limites permitidos para cada metal.

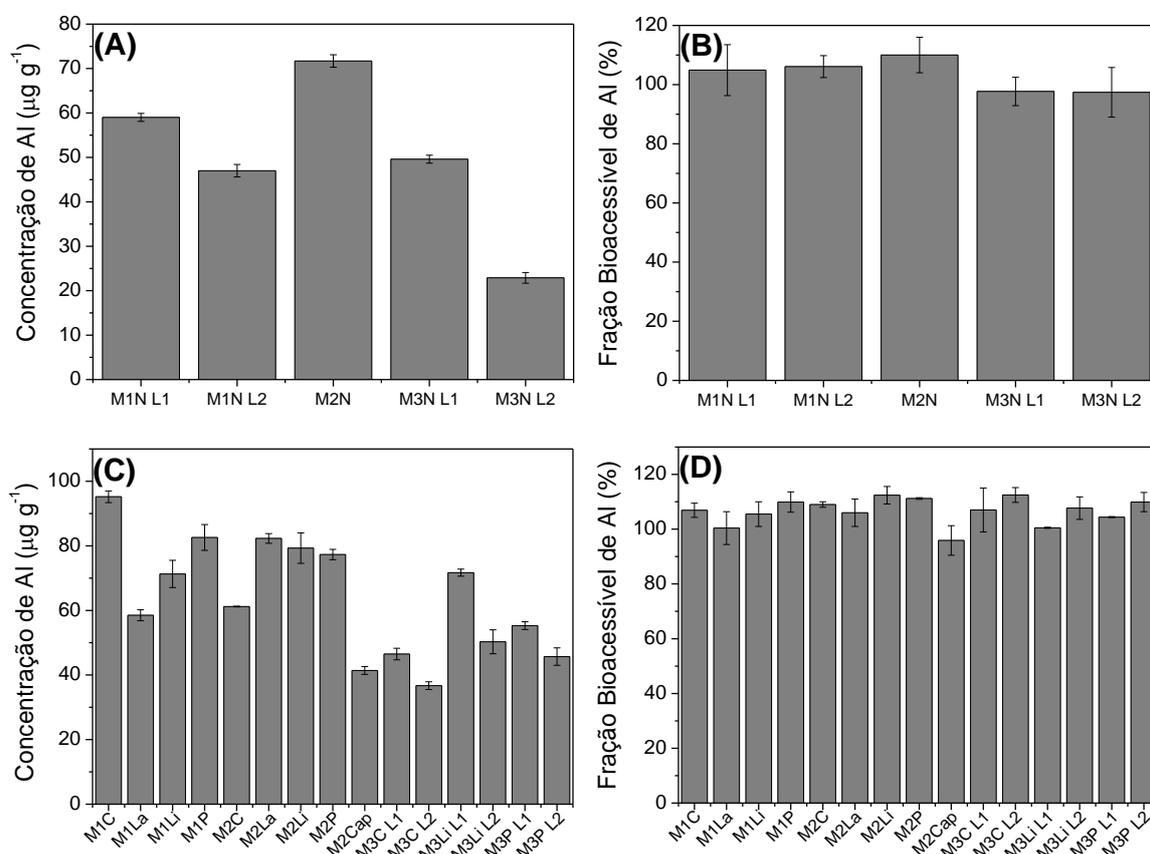
No entanto, esses dados são teóricos, e sabe-se que alguns metais ou seus complexos, após a ingestão, podem ter maior (ou menor) solubilidade e assim serem absorvidos mais (ou menos) facilmente pelo organismo. Desse modo, estudos de simulação *in vitro* podem fornecer resultados importantes com relação à bioacessibilidade de íons metálicos na rota de digestão de alimentos pelos seres vivos.

#### 4.2.4 Determinação da Bioacessibilidade de Íons Metálicos em Decocção de Chá-mate

Considerando os testes *in vitro* discutidos anteriormente, eles foram implementados nas amostras de chá-mate, preparadas na forma de decocção, a fim de verificar se os metais estudados poderiam estar disponíveis para absorção intestinal. As amostras de chá-mate foram separadas em dois grupos: amostras de chá-mate natural (*in natura*) e chá-mate com sabor. Isso foi feito para verificar semelhanças ou diferenças entre amostras de mesma característica física.

A Figura 4.12 apresenta os dados referentes às concentrações totais e frações bioacessíveis de Al a partir da decocção de chá-mate.

**Figura 4.12.** Concentração total e fração bioacessível de Al em decocção de chá-mate determinadas por FAAS



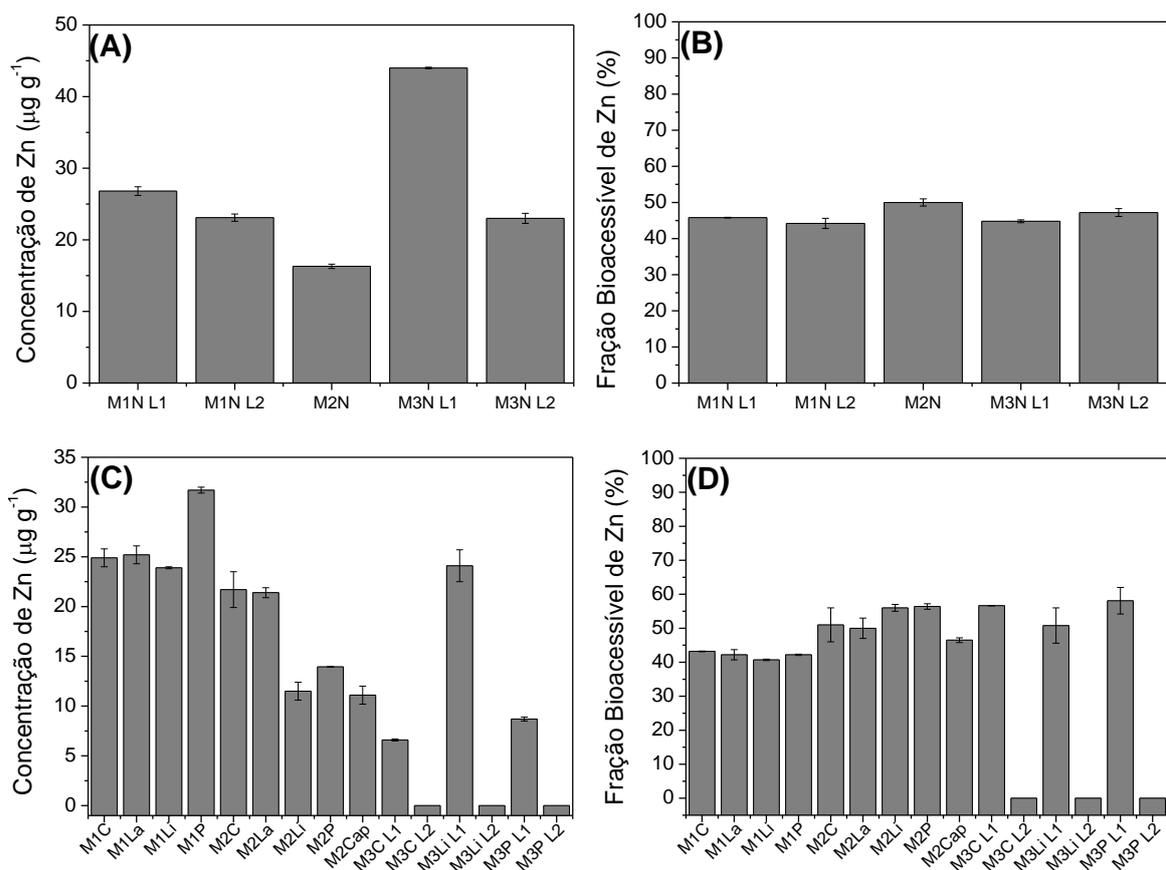
**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Em relação à Figura 4.12A, verifica-se que para uma mesma amostra, existe uma variabilidade na concentração de Al para lotes diferentes, como observado para as marcas 1 e 3 (sendo mais evidenciado nesta última). No entanto, em relação à bioacessibilidade (Figura 4.12B), existe uma similaridade entre as frações, onde nota-se que a possibilidade de absorção intestinal do Al seria total a partir do consumo da bebida. Para os chás com sabor, a

concentração de Al também apresentou variabilidade entre as amostras (Figura 4.12C). Mesmo assim, a bioacessibilidade a partir da bebida foi total (próxima a 100%), indicando que o Al é facilmente extraído na digestão enzimática, tornando-se disponível para absorção intestinal. Apesar de alguns estudos relatarem que a disponibilidade de Al em infusões de chá, de uma forma geral, é baixa (< 10%) (MEHRA e BAKER, 2007), a forma em que se encontra o metal na bebida influencia na absorção do mesmo pelo organismo. Geralmente, as formas orgânicas do Al (especialmente as ligações Al-fenólicos) são mais comuns em chás (inclusive o mate), sugerindo que essa interação pode facilitar a absorção de Al no trato gastrointestinal, se comparado a sua forma livre.

A Figura 4.13 apresenta as concentrações totais e frações bioacessíveis de Zn a partir da decocção de chá-mate.

**Figura 4.13.** Concentração total e fração bioacessível de Zn em decocção de chá-mate determinadas por FAAS



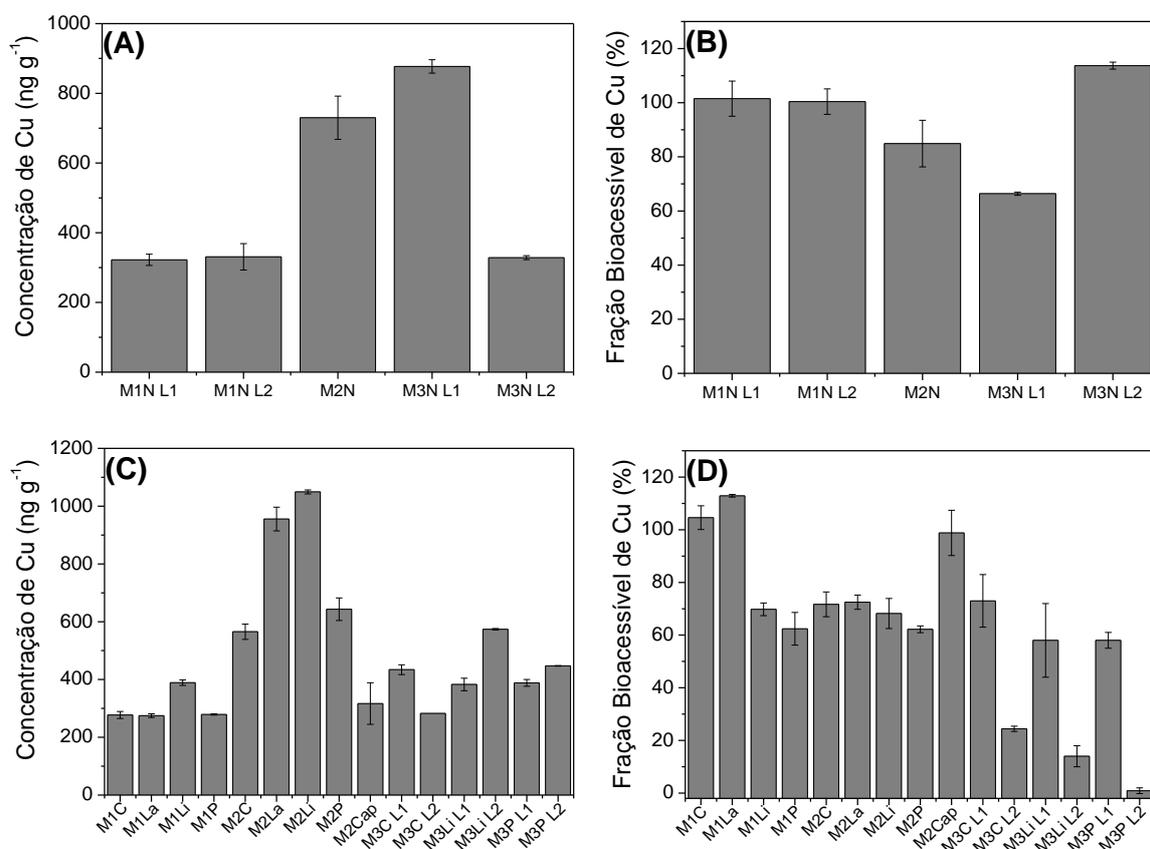
**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Em relação à Figura 4.13A, é possível observar que a menor concentração de Zn foi observada pela amostra M2N, e que na comparação entre diferentes lotes para uma mesma amostra, a maior variabilidade foi apresentada pela marca 3. Do mesmo modo que observado

para o Al, independente da concentração, a bioacessibilidade de Zn para chá-mate natural (Figura 4.13B), foi similar entre as amostras, sendo que as frações variaram de  $44,2 \pm 1,4\%$  a  $50 \pm 1\%$ . Com relação às amostras de chá-mate com sabor (Figura 4.13C), para a mesma marca se observaram diferenças nas concentrações de Zn, sendo que estas foram mais evidentes para a marca 3. A maioria das amostras do lote 2 dessa marca, nem apresentaram concentrações quantificáveis de Zn. Para as frações bioacessíveis (Figura 4.13D) observou-se uma similaridade entre as amostras de uma mesma marca, o que pode indicar que a composição do chá, em relação à adição de aromatizantes ou até mesmo cascas de laranja, limão e canela, pode influenciar na bioacessibilidade do metal a partir do consumo da bebida. Além disso, a presença de ácidos orgânicos no chá-mate pode facilitar a bioacessibilidade de Zn (MAFRA e COZZOLINO, 2004).

Para Cu, os resultados para concentração total e bioacessibilidade são mostradas na Figura 4.14.

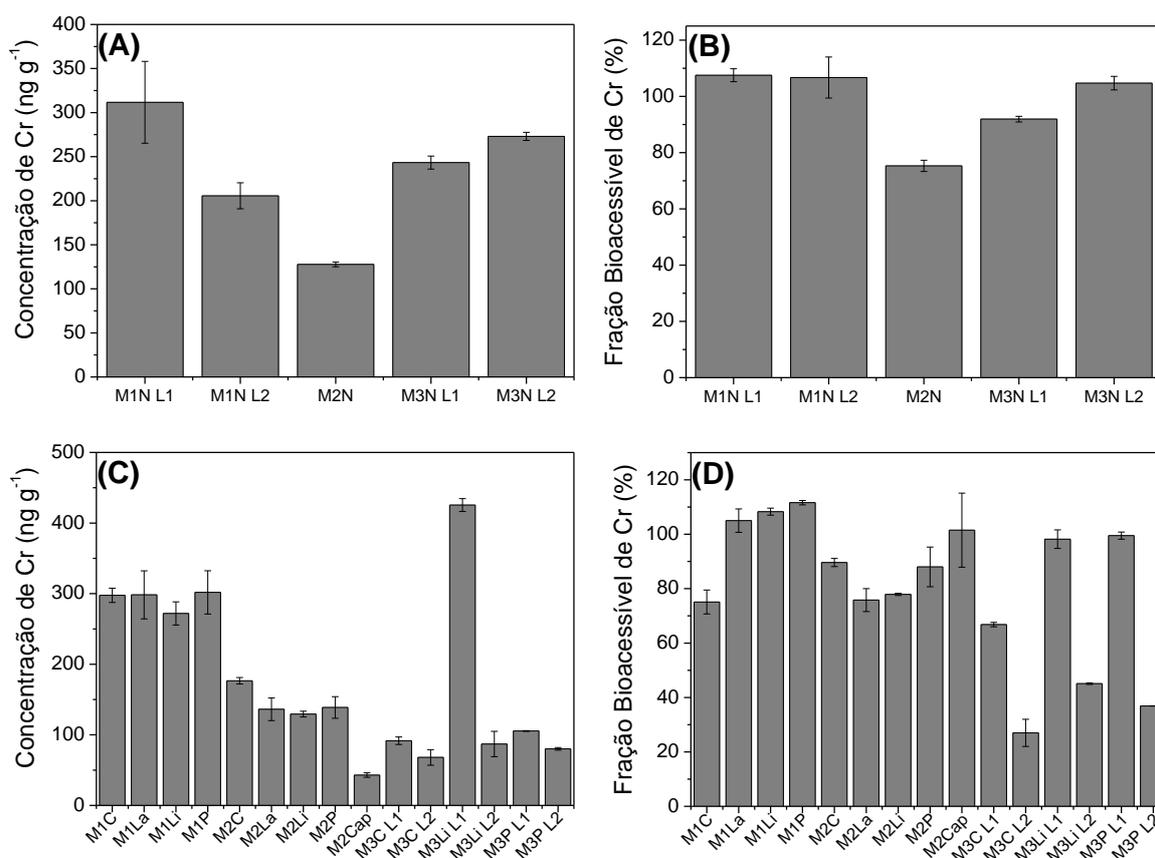
**Figura 4.14.** Concentração total e fração bioacessível de Cu em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS



**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Para as amostras de chá-mate natural (in natura), pela Figura 4.14A, foram constatadas diferenças nas concentrações de Cu entre as marcas avaliadas. No entanto, a marca 1 apresentou para a mesma amostra, mas de lotes diferentes, concentrações similares do metal. Novamente a marca 3 foi a que apresentou maior disparidade entre amostras iguais, mas processadas em diferentes períodos. Para bioacessibilidade destas amostras (Figura 4.14B), as frações variaram de  $66,4 \pm 0,6\%$  a  $114 \pm 1\%$ . Para a marca 1, a bioacessibilidade foi similar entre as amostras avaliadas. No entanto, para as amostras da marca 3, observou-se uma diferença nas frações bioacessíveis para o metal. Essas amostras, como comentado anteriormente, apresentaram um aspecto mais “sujo”, com a presença de material particulado muito fino que não se assemelha à erva-mate. Isso pode influenciar nesses resultados de extração enzimática. Para as amostras com sabor (Figura 4.14C), verifica-se que as amostras da marca 2 se destacam em relação à concentração de Cu. No entanto, em relação à bioacessibilidade (Figura 4.14D), essas amostras foram as que apresentaram as menores frações, com exceção da amostra M2Cap. Para a marca 1, as amostras com canela e laranja apresentaram bioacessibilidade total, enquanto que as amostras com limão e pêsego apresentaram frações menores que 70%. Essa marca adiciona cascas das frutas para conferir sabor ao chá. A presença destas cascas pode influenciar na bioacessibilidade destas amostras. Para a marca 3, da mesma forma como para as amostras de chá natural, observou-se uma variação nas frações de Cu obtidas a partir das amostras de chá com sabor.

Para Cr, os resultados para concentração total e bioacessibilidade em decocção de chá-mate são mostrados na Figura 4.15.

**Figura 4.15.** Concentração total e fração bioacessível de Cr em decoção de chá-mate determinadas por GF AAS

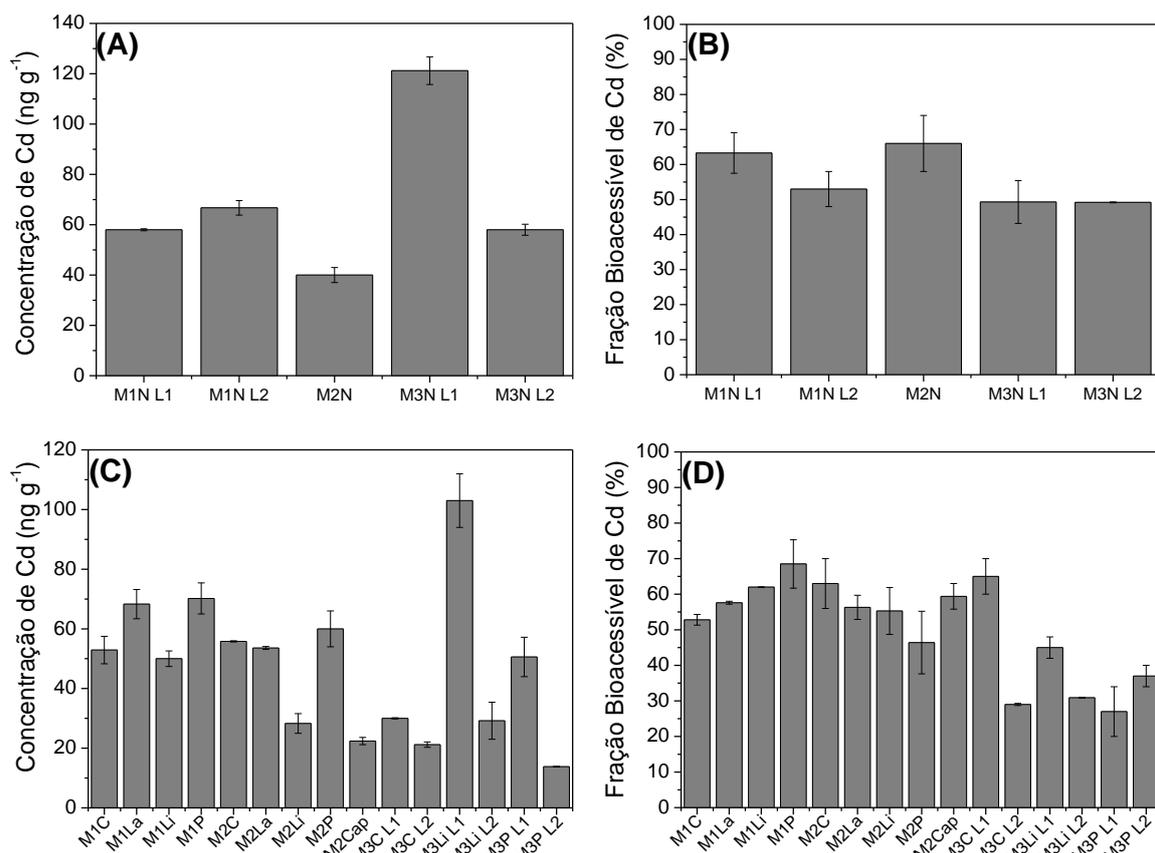
**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Para Cr, as amostras de chá natural, apresentaram concentrações diferenciadas do metal (Figura 4.15A). Neste caso, a maior variabilidade na concentração de Cr foi apresentada pela marca 1. A amostra M2N foi a que apresentou menor concentração do metal na bebida, considerando apenas as amostras naturais. Em relação as frações bioacessíveis (Figura 4.15B), para as marcas 1 e 3, elas foram maiores que 90%. Apenas o chá natural da marca 2 apresentou bioacessibilidade menor que 80%. Para os chás com sabor, verificou-se uma similaridade nas amostras das marcas 1 e 2, sendo que a maior variabilidade foi apresentada pelas amostras da marca 3 (Figura 4.15C). Para bioacessibilidade (Figura 4.15D), as frações variaram de  $27 \pm 5\%$  a  $111,6 \pm 0,8\%$ , sendo que também foi observada maior variabilidade nas amostras da marca 3. Para as marcas 1 e 2, observou-se uma similaridade na bioacessibilidade de Cr, sendo que diferenças tênues podem estar associadas a composição dos chás avaliados, com relação a adição de sabor as mesmas. Assim como observado para iogurte, a presença de compostos orgânicos no chá-mate pode facilitar a absorção de Cr. Isso indica que as baixas frações bioacessíveis dos metais podem estar relacionadas com a composição das amostras, onde

provavelmente a forma inorgânica é majoritária, diminuindo a absorção do metal pelo organismo.

Para Cd, os resultados para concentração total e bioaccessibilidade são mostrados na Figura 4.16.

**Figura 4.16.** Concentração total e fração bioacessível de Cd em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS



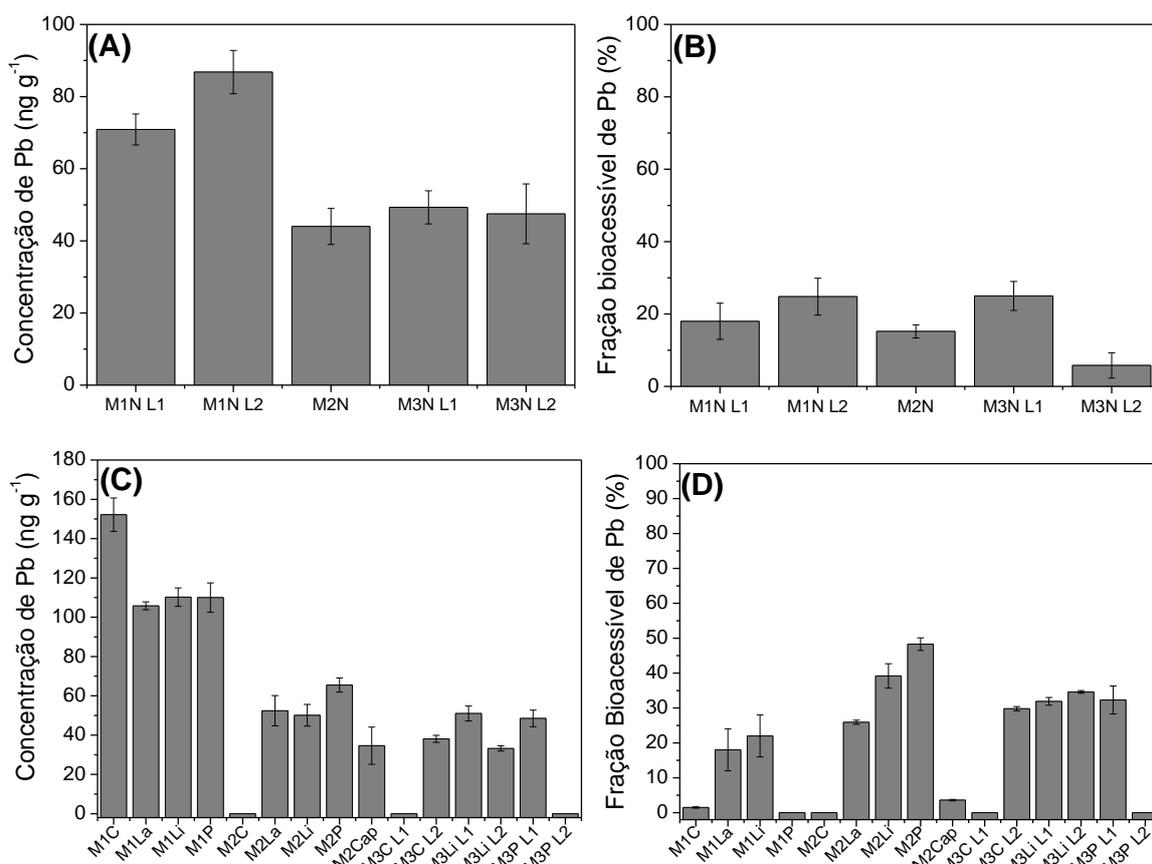
**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Para Cd, nas amostras de chá-mate natural (Figura 4.16A), observou-se novamente que a amostra da marca 2 apresentou menor concentração do metal. As amostras da marca 3 apresentaram a maior concentração média, e também a maior variabilidade entre as amostras de uma mesma marca. No entanto, para a bioaccessibilidade (Figura 4.16B), observou-se uma similaridade entre as frações, sendo que estas variaram de  $49,2 \pm 0,1\%$  a  $66 \pm 8\%$ . Para as amostras com sabor (Figura 4.16C), as concentrações de Cd apresentaram variabilidade entre amostras de uma mesma marca e de marcas diferentes. Para as frações bioacessíveis de Cd, observou-se uma variação entre as amostras analisadas (Figura 4.16D), principalmente para a marca 3. A faixa bioacessível encontrada foi de  $27 \pm 7\%$  a  $68,5 \pm 6,8\%$ . Para Cd, era esperado que a fração bioacessível fosse baixa ( $<5\%$ ), como foi observado para o iogurte. No entanto, é

relatado que formas inorgânicas de Cd são muito mais absorvidas se comparado as formas orgânicas do metal (VÁZQUEZ et al., 2015). Isso sugere que em chá-mate deve prevalecer as formas inorgânicas, as quais podem estar relacionadas com processos de contaminação ambiental, o que acaba facilitando a ingestão e absorção do metal pelo organismo.

Para Pb, as concentrações totais e bioacessíveis em decocção de chá-mate são mostradas na Figura 4.17.

**Figura 4.17.** Concentração total e fração bioacessível de Pb em decocção de chá-mate determinadas por GF AAS



**Legenda:** Concentração total: chá-mate natural (A) e chá-mate com sabor (C);  
Fração bioacessível: chá-mate natural (B) e chá-mate com sabor (D).

Para Pb, as concentrações apresentadas pelas amostras de chá natural das marcas 2 e 3 foram similares, sendo que a maior diferença foi apresentada pelas amostras da marca 1 (Figura 4.17A). Em relação a bioacessibilidade (Figura 4.17B), observou-se uma similaridade entre as amostras das marcas 1 e 2, e uma maior diferença entre as amostras de lotes diferentes da marca 3. Já para as amostras de chá com sabor, as concentrações também foram variadas entre as amostras, sendo que para algumas não foi possível quantificar o metal (Figura 4.17C). Para a bioacessibilidade (Figura 4.17D), as frações variaram 0 a  $48,3 \pm 1,8\%$ . Neste caso, a marca 1 foi a que apresentou menor bioacessibilidade para Pb, e a maior variabilidade foi apresentada

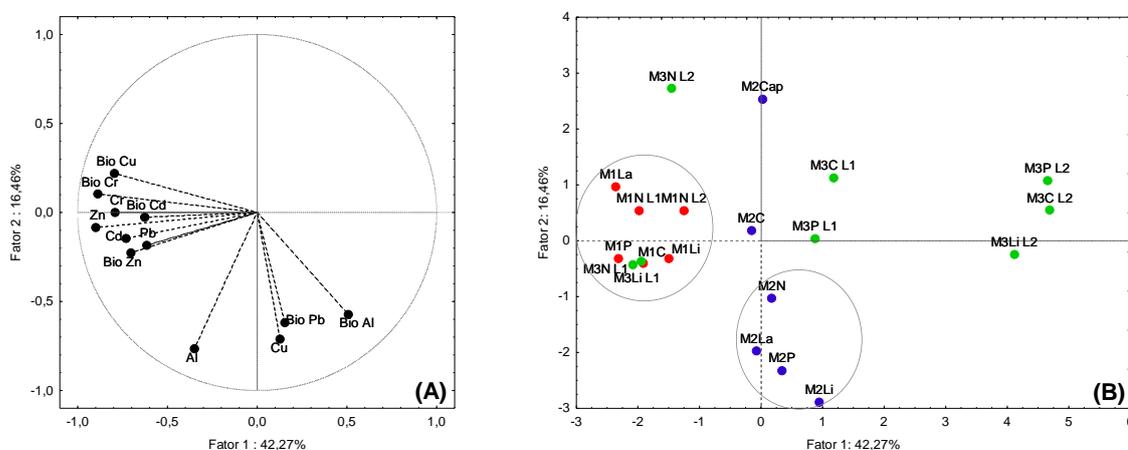
pela marca 2. A marca 3 foi a que apresentou maior similaridade entre as frações bioacessíveis de Pb, sendo que apenas a amostra M3P L2 não apresentou fração quantificável do metal. Em geral, as frações bioacessíveis foram baixas para Pb a partir da decocção de chá-mate. Considerando o potencial cumulativo do metal no organismo, principalmente de crianças, essa baixa fração bioacessível é desejável, diminuindo os riscos de ingestão aguda do metal por seres vivos.

Considerando o significativo número de amostras avaliadas, uma PCA foi construída buscando correlacionar as amostras com os parâmetros de interesse, a exemplo das concentrações totais e porcentagens bioacessíveis dos metais avaliados.

Os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais foram as concentrações totais e porcentagens bioacessíveis de Al, Zn, Cu, Cr, Pb e Cd.

A Figura 4.18 mostra os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

**Figura 4.18.** Gráficos de pesos (A) e de escores (B) para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados de concentração total e fração bioacessível de íons metálicos para decocção de chá-mate



**Legenda:** ● Marca 1; ● Marca 2; ● Marca 3.

Em relação a PCA, pela Figura 4.18, foi possível obter uma explicação de 58,7% da variabilidade dos dados, o que é adequado considerando o grande número de variáveis e as diferentes amostras avaliadas.

Pela Figura 4.18A, é possível observar pela primeira componente principal (PC1) que existe uma forte correlação entre as variáveis Zn, Cr, Cd, Pb, %Bio Zn, %Bio Al, %Bio Cr, %Bio Cu e %Bio Cd, sendo que os coeficientes para as mesmas foram elevados ( $> -0,62$ ). Para a segunda componente (PC2), os coeficientes de correlação com maior significância foram

apresentados pelos parâmetros Al, Cu, %Bio Al e %Bio Pb ( $> -0,57$ ), indicando uma forte correlação entre os mesmos.

Em relação a Figura 4.18B, pela PC1, as amostras de chá-mate (marca 3) localizadas no quadrante positivo em relação ao eixo X e eixo Y, não apresentaram correlação com nenhuma das variáveis estudadas. Já as amostras localizadas no quadrante positivo de X e negativo de Y, apresentam forte correlação com as frações bioacessíveis de Al e Pb, e com as concentrações totais de Al e Cu. Essas amostras pertencem a marca 2, e a correlação das mesmas, mostra uma similaridade na composição e comportamento das amostras. Observando-se o lado esquerdo do gráfico, referente ao eixo negativo de X, verifica-se um agrupamento das amostras da marca 1, sendo estas influenciadas pelas variáveis concentração total de Zn, Cr, Cd, Pb e bioacessibilidade de Zn, Al, Cr, Cu e Cd. Essa similaridade característica das amostras da marca 1, demonstram que existe um padrão na composição das mesmas, o que é indicado pela política de cultivo da erva-mate adotado pela empresa.

Em relação a PC2, pelo eixo negativo de X, observou-se uma separação das amostras da marca 2 em relação a bioacessibilidade de Al e Pb, e pela concentração de Cu.

Ao considerar a ingestão diária de chá-mate por seres vivos (1,75 g - 1 sachê), pode-se calcular a quantidade de Al, Zn, Cu, Cr, Cd e Pb que foram ingeridos por uma pessoa de 70 kg em relação a quantidade dos mesmos que realmente pode ser absorvida pelo organismo. Esses resultados são mostrados na Tabela 4.14. Os valores foram calculados utilizando a média e a faixa de concentração dos metais na bebida.

**Tabela 4.14.** Estimativa da ingestão humana de Al, Zn, Cu, Cd, Pb e Cr ( $\mu\text{g}$  por kg de peso corpóreo), em relação à bioacessibilidade, para um adulto (70 kg) que consome chá-mate (1 sachê - 1,75 g por dia)

Frequência de ingestão	Al		Zn		Cu		Cr		Cd		Pb	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
Diária	1,51	0,57 – 2,38	0,2	0 – 0,5	$8,5 \times 10^{-3}$	$6,9 \times 10^{-3} - 0,02$	$4,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3} - 0,01$	$6,7 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4} - 1,5 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-4}$	$0 - 5,7 \times 10^{-5}$
Semanal	10,6	4,0 – 16,7	1,3	0 – 3,4	0,06	0,048 – 0,12	0,02	$7,5 \times 10^{-3} - 0,07$	$4,6 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-4} - 0,01$	$1,8 \times 10^{-3}$	$0 - 4,5 \times 10^{-4}$
Mensal	45,3	17,1 – 71,4	5,6	0 – 14,8	0,26	0,21 – 0,54	0,12	0,03 – 0,3	0,02	$3,7 \times 10^{-3} - 0,04$	$7,5 \times 10^{-3}$	$0 - 1,7 \times 10^{-3}$

A Tabela 4.14, mostra que o nível de ingestão dos metais por seres humanos seguiu a ordem de  $Al > Zn > Cu > Cr > Cd > Pb$ . Nesse caso, observa-se que considerando as frações bioacessíveis dos metais, a absorção de Cd foi maior que a de Pb, diferente do que foi observado anteriormente quando se considerou a absorção total da quantidade ingerida dos metais. Para um adulto que consome chá, semanalmente, a ingestão média seria 10,3; 1,6; 0,06; 0,02; 4,6 x 10<sup>-3</sup>; e 1,8 x 10<sup>-3</sup>  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para Al, Zn, Cu, Cr, Cd e Pb, respectivamente.

A Tabela 4.15 apresenta os valores de ingestão, com relação à bioacessibilidade, dos metais estudados a partir do consumo de iogurte, comparados aos valores recomendados ou permitidos para cada metal.

**Tabela 4.15.** Porcentagem de ingestão de metais a partir da decocção de chá-mate, com relação a bioacessibilidade, comparados ao valor recomendado ou permitido para cada metal estudado

Metais	Valor de ingestão	Valor de ingestão (bioacessibilidade)	Valor referencial	% Ingestão
Al	0,011 mg kg <sup>-1</sup>	0,011 mg kg <sup>-1</sup>	2 mg kg <sup>-1</sup>	0,6
Zn	0,032 mg dia <sup>-1</sup>	0,013 mg dia <sup>-1</sup>	11 mg dia <sup>-1</sup> (adulto)	0,1
Cu	0,086 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,069 $\mu\text{g kg}^{-1}$	500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,01
Cr	0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$	35 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,09
Cd	0,008 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,005 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,02
Pb	0,009 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,002 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,008

Observando-se a Tabela 4.15, para Zn, a ingestão diária recomendada (IDR) para adultos é de 8 mg dia<sup>-1</sup> para mulheres e 11 mg dia<sup>-1</sup> para homens (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004; BRASIL, 2005). Considerando a concentração média de Zn encontrada em decocção de chá-mate (18  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), e a fração bioacessível média para o metal a partir do chá-mate (41,3%), a ingestão diária seria de 0,013 mg do metal. Isso corresponde a 0,2% da dose diária ideal de ingestão de Zn para mulheres, e 0,1% para homens. Em comparação com o cálculo realizado para a concentração total, a dose de ingestão de Zn bioacessível é 40% menor do que o esperado. Com base nos valores experimentais, pode-se sugerir que essa bebida não é uma boa fonte nutricional do metal.

Para Al, Cu e Cd são aceitáveis dose de ingestão semanal de 2 mg kg<sup>-1</sup> (2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 0,5 mg kg<sup>-1</sup> (500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo, respectivamente (FAO/WHO, 2014). Para chá-mate, a porcentagem de ingestão destes metais, em relação aos valores de referência acima citados, é baixa, variando de 0,6% (Al) a 0,01% (Cu) (Tabela 4.15). Visto que Cu possui essencialidade para a dieta humana, o valor de IDR é de 900  $\mu\text{g dia}^{-1}$  para adultos (IOM, 2001; BRASIL, 2005), sendo que a ingestão máxima permitida do metal por dia é de 10 mg para adultos (IOM, 2001). Considerando a concentração média de Cu em chá-mate (492,4 ng g<sup>-1</sup>), e a bioacessibilidade média do metal a partir da bebida (71%), a ingestão diária de Cu a partir do chá seria de 0,61  $\mu\text{g}$  do metal. Isso corresponde a uma contribuição para ingestão de Cu de

0,07% para adultos. Em relação ao cálculo teórico, a redução na contribuição do chá-mate para ingestão de Cu pode chegar a 70%. Isso indica que, do mesmo modo que para Zn, essa bebida não pode ser considerada uma fonte nutricional para Cu.

Para Pb, a normativa mais recente considerava aceitável a ingestão semanal de até 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (FAO/WHO, 2014), sendo que atualmente, não existe dose segura de ingestão do metal. Para Cr, um limite aceitável para ingestão semanal é de 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo (BAARS et al., 2001). Em relação a estes valores, a porcentagem de ingestão para Pb e Cr a partir do chá-mate foi de 0,008 e 0,09%, respectivamente (Tabela 4.15).

De acordo com os dados obtidos nas Tabelas 4.14 e 4.15, todos os valores de ingestão frequente de metais através do consumo de decocção de chá-mate calculados neste estudo, estão abaixo dos valores limites permitidos para cada metal. Isso é considerado bom em relação a metais como Al, Cd e Pb, que não possuem função biológica, demonstrando que não existe possibilidade de ocorrer ingestão e absorção excessiva destes metais pelo organismo dos seres vivos. No entanto, para metais com bioatividade como Zn, Cu e Cr (se na forma trivalente), a contribuição nutricional destes elementos para a dieta humana, a partir do consumo de chá-mate, é muito baixa.

### 4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível verificar que as decocções de chá-mate (*Ilex paraguarienses*) apresentam quantidades significativas de íons metálicos. Dentre estes se destaca o Al, que por apresentar toxicidade aos seres vivos, necessita de monitoramento, principalmente em alimentos e bebidas de elevado consumo como o chá-mate. A grande variabilidade de Pb, Cd e Cr em amostras de chá de uma mesma marca, demonstra que pode existir algum processo de contaminação industrial ou ambiental, que pode ser responsável pelo aumento na concentração destes metais na matriz de interesse. Com o uso da Análise de Componentes Principais (PCA), considerando as duas etapas de quantificação de elementos em decocções de chá-mate, verificou-se que existe uma separação das amostras de chá em relação à marca, fato evidenciado principalmente para as marcas 1 e 2. Isso pode demonstrar uma maior uniformidade no processo industrial, ou até mesmo uma diferença mineral na origem das plantas de erva-mate, ocasionando esses agrupamentos distintos. A marca 3, avaliada em diferentes sabores e lotes, mostrou a maior variabilidade na concentração de metais na bebida. Isso pode estar relacionado com algum problema durante o processamento do chá, ou até mesmo nos cultivares da erva-mate utilizada na produção.

Com relação à bioacessibilidade, metais como Al, Cu e Cr demonstraram ter elevada absorção intestinal nos testes *in vitro* a partir do chá-mate (frações bioacessíveis médias acima de 71%). Considerando a toxicidade de Al, por exemplo, isso é preocupante devido às várias fontes de exposição ao metal para os seres vivos. Zn e Cd apresentaram frações bioacessíveis intermediárias (entre 41 e 52%), sendo que se esperava baixa absorção de Cd pelo organismo dos seres vivos. No entanto, as formas inorgânicas do metal, as quais podem estar relacionadas com problemas de contaminação, podem ter contribuído para a sua maior bioacessibilidade. As frações bioacessíveis de Pb foram as menores na bebida (em média 19%), e considerando a toxicidade do metal, esse resultado torna-se importante. Ao realizar-se cálculos de ingestão diária, apesar de alguns metais apresentarem uma bioacessibilidade elevada, observou-se que para chá-mate, nenhum dos metais apresentou potencial nutricional ou tóxico com o consumo frequente da bebida. Isso pode ser observado através das porcentagens de ingestão dos metais, com relação a valores máximos permitidos ou recomendados, sendo que estas foram menores que 0,6%. Com a realização de uma PCA, buscando uma relação entre as concentrações totais e frações bioacessíveis de íons metálicos a partir da decocção de chá-mate, observou-se uma correlação entre os fatores, sendo que estas correlações levaram a uma separação das amostras avaliadas. Isso pode ser melhor evidenciado para as marcas 1 e 2, como já havia sido observado anteriormente apenas para as concentrações totais.

## CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, de modo geral, foi possível verificar diferenças na quantificação das concentrações totais e bioacessíveis de iogurte e decocções de chá-mate.

Com relação ao iogurte, foi possível estabelecer um procedimento de determinação rápida de metais traço na matriz, utilizando amostragem em suspensão aliada a Espectrometria de absorção atômica. Com o método otimizado e validado, demonstrando ser preciso e exato, foi possível quantificar Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em 25 diferentes amostras de iogurte. Como esperado, Zn e Cu foram os metais encontrados em maiores concentrações nas amostras, sendo que ambos foram quantificados em todas as amostras avaliadas. Já para Pb, Cd e Cr, nem todas as amostras apresentaram concentrações quantificáveis destes metais. No entanto a presença dos mesmos, principalmente Pb e Cd, pode estar condicionada a processos de contaminação ambiental ou industrial do produto. Nos ensaios de bioacessibilidade *in vitro*, alguns procedimentos foram testados e modificados, a fim de se implementar um método adequado para avaliação das frações bioacessíveis dos elementos de interesse a partir do iogurte. Para as amostras avaliadas, foram observadas diferentes frações bioacessíveis entre os metais, e entre as amostras para um mesmo metal. Para iogurte, a bioacessibilidade de Cr e Cu foi mais elevada, o que pode estar relacionada com a forma do metal presente na matriz. Para Zn, no entanto, as frações bioacessíveis foram baixas, o que também pode estar relacionada com a composição do alimento, e com as possíveis interações de Zn com outros componentes da matriz alimentar. Já para Pb e Cd, a bioacessibilidade foi baixa, ou até mesmo nula, o que é desejável, considerando a toxicidade apresentada por essas espécies para os seres vivos.

Para decocção de chá-mate, primeiramente, foi possível avaliar a presença de Al, Zn, Cu, Cr, Cd e Pb em amostras comerciais de diferentes marcas e sabores. De modo geral, as concentrações de metais na bebida seguiram a ordem de Al>Zn>Cu>Cr>Pb>Cd. Considerando a toxicidade de Al, avaliar a concentração deste elemento neste tipo de bebida torna-se importante, visto que dentre os metais avaliados, os níveis de Al foram os mais elevados na decocção de chá-mate. A presença desses elementos neste tipo de bebida pode estar relacionada com os cultivares da erva-mate, devido à composição do solo ou uso de fertilizantes e agrotóxicos; condições ambientais que podem levar a processos de contaminação; ou processos industriais que podem contribuir para a concentração de elementos tóxicos como Al, Pb e Cd no chá-mate. Foi possível verificar também que algumas marcas, neste caso as marcas 1 e 2, apresentaram maior similaridade entre as diferentes amostras, mostrando um maior controle de qualidade para o produto. Em relação à bioacessibilidade, elevadas frações bioacessíveis foram

observadas para Al, Cu e Cr a partir do chá-mate. Assim, como para iogurte, essa elevada bioacessibilidade pode estar relacionada com a forma na qual o elemento está presente na matriz. Para Zn e Cd, as frações bioacessíveis foram intermediárias, sendo que, ao serem comparadas com o iogurte, essas frações foram maiores na bebida. Para Zn, considerando sua essencialidade, esse aumento é importante. No entanto, para Cd, uma bioacessibilidade significativa não é desejada devido ao seu potencial tóxico. Isso também pode indicar um processo de contaminação das amostras, visto que as formas inorgânicas de Cd são mais bioacessíveis que as orgânicas. Para Pb, a bioacessibilidade média das amostras foi baixa, o que é considerado interessante em relação a segurança alimentar.

Levando-se em consideração os dados de bioacessibilidade para iogurte e chá-mate, os cálculos de ingestão de metais com o consumo frequente de ambas matrizes, demonstram que a quantidade ingerida dos metais é muito baixa, sugerindo que nem o iogurte e nem o chá-mate podem ser considerados fontes nutricionais de elementos essenciais, como Zn, Cu e Cr(III), e nem alimentos/bebidas que apresentem risco à saúde devido à presença de metais não essenciais como Pb, Cd e/ou Al.

Tendo como base todos os resultados obtidos neste estudo, verifica-se a importância em avaliar as concentrações totais e, principalmente, as frações bioacessíveis de íons metálicos em alimentos de amplo consumo como o iogurte, e em bebidas típicas em diversos países, como o chá-mate, mostrando que ambos podem apresentar concentrações indesejáveis de metais tóxicos como Al, Pb e Cd. Além disso, esses metais podem apresentar elevado potencial de absorção pelo organismo, o que pode causar algum prejuízo aos seres vivos, principalmente em relação à quantidade ingerida das matrizes de interesse. Esse estudo sugere também a necessidade de melhor avaliar as interações entre os alimentos ou adição de diferentes componentes ou ingredientes a estes alimentos, a fim de verificar se a bioacessibilidade dos metais pode ser alterada em diferentes condições de consumo dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKHALIQ, A.; SWAILEH, K. M.; HUSSEIN, R. M.; MATANI, M. Levels of metals (Cd, Pb, Cu and Fe) in cow's milk, dairy products and hen's eggs from the West Bank, Palestine. **International Food Research Journal**, n. 3, v. 19, p. 1089–1094. 2012.
- ABOLLINO, O.; GIACOMINO, A.; PAPARELLA, G.; MAGI, E.; CONCA, E.; MALANDRINO, M. Potentially toxic elements in ayurvedic formulations: Total and bioaccessible content. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 236–243. 2018.
- ACTION, free software, version 2.7, 2014.
- AJTONY, Z.; BENCS, L.; HARASZI, R.; SZIGETI, J.; SZOBOSZLAI, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, p. 683–690. 2007.
- AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K.; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. **Talanta**, v. 76, p. 627–634. 2008.
- ALVES, F. L.; JARDIM, W. F.; CADORE, S.; ARRUDA, M. A. Z.; SMICHOWSKI, P.; MARRERO, J. Emprego da amostragem de suspensão na determinação de Cu e Zn em lapa antártica e Ni em sedimentos de rio por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p.756-760. 2001.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos funcionais. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 11/11/17.
- AOAC, Association of official analytical chemists. Appendix F: Official Methods of Analysis of AOAC International – Guidelines for Standard Method Performance Requirements, p. 7-9, 13-14. 2012.
- ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 277, p. 2224-2234. 2009.
- BAARS, A. J; THEELEN R. M. C; JANSSEN, P. J. C. M; HESSE, J. M; VAN APELDOORN, M. E; MEIJERINK, M. C. M; VERDAM, L.; ZEILMAKER, M. J; Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. **RIVM report 711701 025**. p. 43–46. 2001.
- BAKER, S. A.; MILLER-IHLI, N. J. Atomic Spectroscopy in Food Analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. DOI: 10.1002/9780470027318.a1003. 2016.
- BANDMANN, O.; WEISS, K. H.; KALER, S. G. Wilson's disease and other neurological copper disorders. **Lancet Neurology**, v. 14, p. 103–113. 2015.
- BÁRCENA-PADILLA, D. A; BERNAL-GONZÁLEZ, M.; PANIZZA-DE-LEÓN, A.; GARCÍA-GÓMEZ, R. S.; DURÁN-DOMÍNGUEZ-DE-BAZÚA, C. Aluminum Contents in

Dry Leaves and Infusions of Commercial Black and Green Tea Leaves: Effects of Sucrose and Ascorbic Acid Added to Infusions. **Natural Resources**, v. 2, p. 141-145. 2011.

BARIN, J. S.; BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; NÓBREGA, J. A.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. cap. 9.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria**. 3. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. p. 263-290.

BENDICHO, C.; DE LA CALLE, I.; PENA, F.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-51. 2012.

BATISTA, B.L.; DA SILVA, L.R.S.; ROCHA, B.A.; RODRIGUES, J.L.; BERRETTA-SILVA, A.A.; BONATES, T.O.; GOMES, V.S.D.; BARBOSA, R.M.; BARBOSA, F. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. **Food Research International**, v. 49, p. 209–215. 2012.

BATLEY, G. E.; APTE, S. C.; STAUBER, J. L. Speciation and Bioavailability of trace metals in water: Progress since, 1982. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, p. 903. 2004.

BERMEJO, P.; PENA, E. M.; DOMINGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHOB, J. A.; FRAGA, J. M. Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an in vitro method. **Food Chemistry**, v. 77, p. 361–369. 2002.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. In: ASCHNER, M.; COSTA, L. G. **Environmental Factors in Neurodegenerative Diseases**. Cambridge: Elsevier, 2017. cap. 5.

BORGES, A. R.; BECKER, E. M.; DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 92, p. 1-7. 2014.

BORGES, A. R.; BAZANELLA, D. N.; DUARTE, A. T.; ZMOZINSKI, A. V.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Development of a method for the sequential determination of cádmium and chromium from the same sample aliquot of yerba mate using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, 116–120. 2017.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: Revisão. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 394-400. 2008.

BOSSU, C. M. **Fracionamento de Zinco em amostras de leite**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384. 2011.

BRAGANÇA, V. L. C.; MELNIKOV, P.; ZANONI, L. Z. Trace Elements in Different Brands of Yerba Mate Tea. **Biological Trace Element Research**, v. 144, p. 1197-1204. 2011.

BRANDÃO, G. C.; JESUS, R. M.; 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**, v. 81, p. 1357-1359. 2010.

BRANDÃO, G. C.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 231-233. 2011.

BRANDON, E. F. A.; OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; VERSANTVOORT, C. H. M.; VAN ENGELEN, J. G. M.; SIPS, A. J. A. M. Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 161-171. 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “**Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10/05/17.

BRASIL. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Aprova o “**Regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos**”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de agosto de 2013. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10/05/17.

CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; DE MENA, C.; LOPEZ, M. C. Chromium, copper, iron, manganese, selenium and zinc levels in dairy products: in vitro study of absorbable fractions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 47, 331-339. 1996.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, p. 808-813. 2002.

CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 155-156. 2014.

CARR, H.; LOMBI, E.; KÜPPER, H.; MCGRATH, S.; WONG, M. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie**, EDP Sciences, v. 23, n. 8, p.705-710. 2003.

CHAKRABARTI, C. L.; WAN, C. C.; HAMED, H. A.; BERTELS, P. C. Matrix Interferences in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry by Capacitive Discharge Heating. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 450-455. 1981.

CHEN, S.; ZHU, S.; HE, Y.; LU, D. Speciation of chromium and its distribution in tea leaves and tea infusion using titanium dioxide nanotubes packed microcolumn coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 150, p. 254–259. 2014.

CHRYSSANTHOPOULOS, C.; MARIDAKI, M. Nutritional Aspects of Yogurt and Functional Dairy Products. In: YILDIZ, F. **Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products**. New York: Taylor & Francis Group, 2010. cap. 9.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos Funcionais: Histórico, Conceitos e Atributos. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 3-7.

CHERFI, A.; ABDOUN, S.; GACI, O. Food survey: Levels and potential health risks of chromium, lead, zinc and copper content in fruits and vegetables consumed in Algeria. **Food and Chemical Toxicology**, 70, p. 48–50. 2014.

DA COSTA, A. M. G.; NOGAMI, E. M.; VISENTAINER, J. V.; DE SOUZA, N. E.; GARCIA, E. E. Fractionation of Aluminum in Commercial Green and Roasted Yerba Mate Samples (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and in Their Infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 196–200. 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DA SILVA, A. G. H.; COZZOLINO, S. M. F. Cromo. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 32.

DA SILVA, E. N.; LEME, A. B. P.; CIDADE, M.; CADORE, S. Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. **Talanta**, v. 117, p. 184-188. 2013.

DA SILVA, E. N.; HEERDT, G.; CIDADE, M.; PEREIRA, C. D.; MORGON, N. H.; CADORE, S. Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 152-158. 2015.

DAMIN, I. C. F. **Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traço em carne *in natura* e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. p. 2-21.

DE ANDRADE, C. K. **Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica para a determinação direta de Pb, Cd e Cr em amostras de mel utilizando Espectrometria de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica em Forno de Grafite**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013. p. 2-21.

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**, v. 146, p. 166-173. 2014.

DE ANDRADE, C. K.; DE BRITO, P. M. K.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Determination of Cu, Cd, Pb and Cr in yogurt by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry: A case study for Brazilian yogurt. **Food Chemistry**, v. 240, p. 268-274. 2018.

DE CAMPOS, B. K. **Avaliação da labilidade do Alumínio em infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) empregando voltametria adsortiva de redissolução catódica**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

DE CAMPOS, B. K.; DOS PRAZERES, J. P.; TORRES, Y. R.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Avaliação da labilidade de Alumínio em infusões de Erva-Mate empregando voltametria adsortiva de redissolução catódica. **Química Nova**, v.37, p. 1479-1486. 2014.

DEMIREL, S.; TUZEN, M.; SARACOGLU, S.; SOYLAK, M. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1020–1026. 2008.

DE MORAES, D. P.; BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Preparo de amostras assistido por radiação micro-ondas. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. cap. 10.

DE MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320. 2009.

DE OLIVEIRA, E. P.; TOREZAN, G. A.; GONÇALVES, L. S.; CORRENTE, J. E.; MCLELLAN, C. C. P.; BURINI, R. C. O consumo agudo de erva mate aumenta o gasto energético de homens jovens saudáveis: um estudo piloto. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, n. 59, v. 10, p. 242-249. 2016.

DE PAULA, C. E. R.; BRUM, D. M.; CALDAS, L. F. S.; CASSELLA, R. J. Avaliação de métodos de extração para a determinação de Cromo e Níquel em formulações farmacêuticas e em matérias-primas usadas na fabricação de medicamentos à base de Cefalexina e Ciprofloxacino. **Química Nova**, v. 35, p. 1858-1864. 2012.

DISILVESTRO, R. A.; DY, E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 120–124. 2007.

DOBROWOLSKI, R.; PAWLOWSKA-KAPUSTA, I.; DOBRZYNSKA, J. Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. **Food Chemistry**, v. 132, p. 597–602. 2012.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; Bermejo-Barrera, P. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. **Talanta**, v. 82, p. 1668–1673. 2010.

DOS ANJOS, V. E. **Especiação de cobre e arsênio no complexo estuarino da baía de Paranaguá**. 2006. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. p. 20-61.

DOS SANTOS, M. M. A. **Avaliação da biodisponibilidade de Cu, Fe e Zn em feijão - fava (*Phaseolus lunatus L.*)**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

EFSA – European Food Safety Agency. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). Safety of aluminum from dietary intake. **The EFSA Journal**, v. 754, p. 1–34. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2008.754/epdf>>. Acesso em: 05/09/17.

EFSA – European Food Safety Agency. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. **The EFSA Journal**, 12(3):3595, p. 62-69. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3595/epdf>>. Acesso em: 29/10/17.

ELLINGSEN, D. G.; HORN, N.; AASETH, J. Copper. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3. ed. Oxford: Academic Press Inc., 2007. P. 529-543.

ER, C., SENKAL, B. F., YAMAN, M. Determination of lead in milk and yoghurt samples by solid phase extraction using a novel aminothioazole-polymeric resin. **Food Chemistry**, v. 137, p. 55–61. 2013.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2. ed. Thailand: WHO Library, 2004. p. 235-240.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO food standards program: Codex committee on contaminants in foods. **Report of the sixth session of the codex committee on contaminants in foods**. Rome, Italy, 2-7 July. 2012.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO food standards program: Codex committee on contaminants in foods. **Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF**. Eighth session, The Hague, Netherlands, 31 March-4 April. 2014.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for industry: A food labeling guide**. 14. Appendix F: Calculate the percent daily value for appropriate nutrients. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov.br>>. Acesso em: 21/10/2015.

FILHO, I. K.; BUTIK, M.; JASKI, A. C.; QUINÁIA, S. P. Fast method to determine the elements in maize flour: reduction in preparation time and reagent consumption. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2017091. 2018.

FIOROTO, A. M.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Avaliação da disponibilidade de Fe, Cu e Zn em leite integral em pó na presença de mesocarpo de babaçu. In: Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA, 17., 2013, Belo Horizonte. **Anais Eletrônicos...** Belo Horizonte: UFMG, 2013.

FLORES, E. M. M.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. cap. 11.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. Londres: Springer, 2015.

GAHRUIE, H. H.; ESKANDARI, M. H.; MESBAHI, G.; HANIFPOUR, M. A. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, p. 1–8. 2015.

GARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; FREIRE, M. R. S.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Comparison of Palladium-magnesium Nitrate and Ammonium Dihydrogenphosphate Modifiers for Cadmium Determination in Honey Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Talanta**, v. 61, p. 509-517. 2003.

GARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Comparison of Palladium-magnesium Nitrate and Ammonium Dihydrogenphosphate Modifiers for Lead Determination in Honey by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Food Chemistry**, v. 91, p. 435-442. 2005a.

GARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. Direct and combined methods for the determination of chromium, copper, and nickel in honey by electrothermal atomic absorption spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6616-6623. 2005b.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 119-132. 2017.

GNUMERIC, Free statistics, versão 1.12, 2012.

DE GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RIBANI, R. H.; DOS SANTOS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, p. 801–807. 2013.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, p. 1995-1998. 2010.

GUERRA, A.; ETUENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, n. 11, v. 30, p. 591-593. 2012.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, v. 24, p. 13–38. 2014.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, n. 9, v. 72, p.138-147. 2007.

HEKMAT, S., MCMAHON, D. J. Manufacture and Quality of Iron-Fortified Yogurt. **Journal of Dairy Science**, n. 12, v. 80, p. 3114-3122. 1997.

HENDERSON, R. G.; VEROUGSTRAETE, V.; ANDERSON, K.; ARBILDUA, J. J.; BROCK, T. O.; BROUWERS, T.; CAPPELLINI, D.; DELBEKE, K.; HERTING, G.; HIXON, G.; WALLINDER, I. O.; RODRIGUEZ, P. H.; ASSCHE, F. V.; WILRICH, P.; OLLER, A. R. Inter-laboratory validation of bioaccessibility testing for metals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, p. 170–181. 2014.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; NAVARRO-BLASCO, I. Survey of total mercury and arsenic content in infant cereals marketed in Spain and estimated dietary intake. **Food Control**, v. 30, p. 423–424. 2013.

HERRERA-AGUDELO, M. A.; MIRÓ, M.; ARRUDA, M. A. Z. *In vitro* oral bioaccessibility and total content of Cu, Fe, Mn and Zn from transgenic (through *cp4* EPSPS gene) and nontransgenic precursor/successor soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 225, p. 125–131. 2017.

HEVIA, K.; ARANCIBIA, V.; ROJAS-ROMO, C. Levels of copper in sweeteners, sugar, tea, coffee and mate infusions. Determination by adsorptive stripping voltammetry in the presence of  $\alpha$ -lipoic acid. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 11–16. 2015.

HU, J.; WU, F.; WU, S.; CAO, Z.; LIN, X.; WONG, M. H. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model. **Chemosphere**, v. 91, p. 455–456. 2013.

IMAI, S.; ICHINOSEKI, M.; NISHIYAMA, Y.; HAYASHI, Y. Effect of Chloride Ion on Lead signal appearance in the co-existence of Iron in electrothermal graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, p. 901-907. 1991.

INTAWONGSE, M; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 876–885. 2006.

IOM – Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Food and Nutrition Board. Washington D.C.: National Academic Press, 2001. p. 237-251, 466-487.

JAIN A. V.; ARNOLD B. Basic concepts of analytical toxicology. In: GUPTA, R. C. **Veterinary toxicology: basic and clinical principles**. New York: Elsevier, 2007. p. 1067-1069.

JENZER, H.; BÜSSER, S.; SILVA, M.; SADEGHI, L. Functional Foods. **BAOJ Nutrition**, v. 2, p. 1-3. 2016.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 374, p. 1-2. 2016.

JOOYANDEH, H. Soy Products as Healthy and Functional Foods. **Middle-East Journal of Scientific Research**, n. 1, v. 7, p. 71-80. 2011.

JUNIOR, J. B. P.; DANTAS, K. G. F. Avaliação da bioacessibilidade de selênio em *Uncaria tomentosa*. In: Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA, 17., 2013, Belo Horizonte. **Anais Eletrônicos...** Belo Horizonte: UFMG, 2013. CD-ROM.

JUNIOR, A. C. G.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, n. 2, v. 23, p. 173-176. 2000.

KARAK, T.; BHAGAT, R.M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**, v. 43, p. 2234–2252. 2010.

KAYA, G.; AKDENIZ, I.; YAMAN, M. Determination of Cu, Mn, and Pb in yogurt samples by flame atomic absorption spectrometry using dry, wet, and microwave ashing methods. **Atomic Spectroscopy**, n. 3, v. 29, p. 99–105. 2008.

KHAN, N.; JEONG, I. S.; HWANG, I. M.; KIM, J. S.; CHOI, S. H.; NHO, E. Y.; CHOI, J. Y.; PARK, K. S.; KIM, K. S. Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry**, v. 147, p. 220–224. 2014.

KHOUZAM, R. B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v. 86, p. 425-428. 2011.

KORN, M. G. A.; DA BOA MORTE, E. S.; DOS SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; DOS SANTOS, W. P. C.; DOS SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67–92. 2008.

KORN, M.; JÚNIOR, D. S.; SANTANA, R. M. M.; KRUG, F. J. Ultrassons para o preparo de amostras. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. cap. 6.

KRAWCZYK, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 377-384. 2014.

LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**. 2. ed. Cambridge, UK: RSC - The Royal Society of Chemistry, 2004. p. 109-154.

LANZETTI, M.; PIRES, K. M. P.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L.; BORGES, R. M.; DA SILVA, A. J. R.; PORTO, L. C.; BENJAMINA, C. F.; VALENCA, S. S. Ready-to-drink

Matte® tea (diet and regular) increased life span and pulmonary health in aged mice. **Food Research International**, v. 54, p. 675–682. 2013.

LAZARTE, C. E.; CARLSSON, N.; ALMGREN, A.; SANDBERG, A.; GRANFELDT, Y. Phytate, zinc, iron and calcium content of common Bolivian food, and implications for mineral bioavailability. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 39, p. 111–119. 2015.

LINCK, V.; DE SÁ, I. M.; ELISABETSKY, E. Yerba Mate or Paraguay Tea. **Chinese Herbal Medicines**, n. 3, v. 6, p. 253-254. 2014.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; DE CÓRDOVA, M. L. F.; RUIZ-MEDINA, A.; ORTEGA-BARRALES, P. Analysis of 20 trace and minor elements in soy and dairy yogurts by ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 102, p. 23–27. 2012.

LÖNNERDAL, B. Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 130, 1378S—1383S. 2000.

LUIS, G.; RUBIO, C.; REVERT, C.; ESPINOSA, A.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; GUTIÉRREZ, A. J.; HARDISSON, A. Dietary intake of metals from yogurts analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 39, p. 48-54. 2015.

MACHADO, I., CESIO, M. V., PISTÓN, M. *In vitro* bioaccessibility study of As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn from raw edible artichoke heads (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 663–668. 2017.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, n. 1, v. 17, p. 79-87. 2004.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, n. 21, v. 4, p. 459-466. 1998.

MAIHARA, V. A.; FÁVARO, D. I. T. Elementos Tóxicos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 34.

MARCHI, G.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A.; GONÇALVES, V. C. **Elementos-traço e sua relação com qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícolas e resíduos orgânicos no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

MARTIN, A. F. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas**. 2002. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, n. 6, v. 5, p. 209-223. 2015.

MATSUMOTO, R. L. T. **Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MEHRA, A.; BAKER, C. L. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1456–1463. 2007.

MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N. S.; CADORE, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 168-176. 2006.

MILANI, R. F.; MORGANO, M. A.; CADORE, S. Trace elements in *Camellia sinensis* marketed in southeastern Brazil: Extraction from tea leaves to beverages and dietary exposure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 491-498. 2016.

MIRZA, A.; KING, A.; TROAKES, C.; EXLEY, C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 40, p. 30–36. 2017.

MODANÊSI, P. V. G.; MERCER, N. S.; BERNARDI, J. F. B. Efeitos do uso de probióticos na hipercolesterolemia. **Revista de Pesquisa da Saúde**, n. 1, v. 17, p. 47-50. 2016.

MOLLOY, D. W.; STANDISH, T. I.; NIEBOER, E.; TURNBULL, J. D.; SMITH, S. D.; DUBOIS, S. Effects of Acute Exposure to Aluminum on Cognition in Humans Cognitive Effects of Aluminum. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, p. 2011–2019. 2007.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, n. 2, v. 3, p. 110-119. 2006.

NACKE, H.; JR GONÇALVES, A. C.; SCHWANTES, D.; NAVA, I. A.; STREY, L.; COELHO, G. F. Availability of Heavy Metals (Cd, Pb, and Cr) in Agriculture from Commercial Fertilizers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 537–544. 2013.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. p. 54-57. Disponível em: < <http://www.nepa.unicamp.br/taco>>. Acesso em 25/02/18.

NOMURA, C. S.; JUNIOR, D. S.; NUNES, L. C.; GUERRA, M. B. B.; DE CARVALHO, G. G. A.; OLIVEIRA, P. V.; KRUG, F. J. Análise direta de sólidos e suspensões. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. cap. 5.

OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. V.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M.; WIJNEN, J. H. V. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 15, p. 3326 3334. 2002.

PAES, L. C. **Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. p. 3-12.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Cobre. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 26.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 63–77. 2003.

PELLERANO, R. G.; UÑATES, M. A.; CANTARELLI, M. A.; CAMIÑA, J. M.; MARCHEVSKY, E. Analysis of trace elements in multiflora Argentine honeys and their classification according to provenance. **Food Chemistry**, v. 134, p. 578-582. 2012.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 117-128. 2009.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct determination of the total concentrations of copper, iron and manganese and their fractionation forms in freshly ripened honeys by means of flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 168, p. 9-15. 2010.

POHL, P.; STECKA, H.; SERGIEL, I.; JAMROZ, P. Different aspects of the elemental analysis of honey by Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry: A Review. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 740. 2012a.

POHL, P.; STECKA, H.; GREDA, K.; JAMROZ, P. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, p. 392–396. 2012b.

PYRZYŃTSKA, K. Determination of chromium by ETA-AAS using different furnace materials. **Analytical Letters**, v. 22, p. 2847-2859. 1989.

QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Determinação direta de cromo em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química nova**, v. 23, n. 2, p. 185-190. 2000.

QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of chromium in gelatine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 64, p. 429-433. 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, n. 5, v. 27, p. 777-778. 2004.

RIBEIRO, M. A.; COZZOLINO, S. M. F. Metodologias para a estimativa da biodisponibilidade de nutrientes. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 38.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 726–740. 2010.

RUBY, M. V.; DAVIS, A.; SCHOOF, R.; EBERLE, S.; SELLSTONE, C. M. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. **Environmental Science & Technology**, n. 2, v. 30, p. 422-430. 1996.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R.; Análise de metais em amostras comerciais de Erva-Mate do sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n.2, p. 259-265. 2010.

SANDSTEAD, H. H.; AU, W. Zinc. In NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. United States: Academic Press Inc., 2007. p. 928–930.

SANTELLI, R. E.; BEZERRA, M. A.; DE SANTANA, O. D.; CASSELLA, R. J.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focussed microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS. **Talanta**, v. 68, p. 1083–1084. 2006.

SARACOGLU, S., SAYGI, K. O., ULUOZLU, O. D., TUZEN, M., & SOYLAK, M. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 280-285. 2007.

SARDANS, J.; MONTES, F.; PEÑUELAS, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, p. 97–112. 2010.

SCHERZ, H.; KIRCHHOFF, E. Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods—A comparison of data originating from different geographical regions of the world. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 420–433. 2006.

SCHIFER, T. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Infarma**, v.17, n. 5-6, p. 67-72. 2005.

SCHULZKI, G.; NÜBLEIN, B.; SIEVERS, H. Transition rates of selected metals determined in various types of teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and herbal/fruit infusions. **Food Chemistry**, v. 215, p. 22–30. 2017.

SKERFVING, S.; BERGDAHL, I. A. Lead. In NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. United States: Academic Press Inc., 2007. p. 599–635.

SOUZA, L. A. **Determinação e avaliação da bioacessibilidade de minerais em amostras de linhaça e gergelim por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

SOUZA, L. A.; SOUZA, T. L.; SANTANA, F. B.; ARAUJO, R. G. O.; TEIXEIRA, L. S. G.; SANTOS, D. S. M. B.; KORN, M. G. A. Determination and *in vitro* bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame. **Microchemical Journal**, v. 137, 8–14. 2018.

STELMACH, E., POHL, P., SZYMCZYCHA-MADEJA, A. Evaluation of the Bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in Ground Coffee Infusions by *in vitro* Gastrointestinal Digestion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1993-1999. 2014.

STRINGHETA, P. C.; DE AQUINO, A. M.; VILELA, M. A. P. Legislação Brasileira sobre Alimentos “Funcionais”. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 9-10.

STURION, J. A.; DE RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. p. 15-18, 41-48.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 165-180. 2012.

SUTUROVIC´, Z.; KRAVIC´, S.; MILANOVIC´, S.; DUROVIC´, A.; BREZO, T. Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step. **Food Chemistry**, v. 155, p. 120–125. 2014.

TOKALIOĞLU, S.; CLOUGH, R.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v. 150, p. 321-327. 2014.

VÁZQUEZ, M.; CALATAYUD, M.; JADÁN PIEDRA, C.; CHIOCCHETTI, G. M.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. Toxic trace elements at gastrointestinal level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 163–175. 2015.

VEDAMUTHU, E. R. Starter cultures for yogurt and fermented milks. In: CHANDAN, R. C.; WHITE, C. H.; KILARA, A.; HUI, Y. H. (Eds). **Manufacturing yogurt and fermented milks**. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2006. p. 99.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 31-40. 2005.

VIÑAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 121–130. 2000.

VULCANO, I. R. C.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 425-431. 2008.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, p. 107–120. 2003.

WANG, H.; LIVINGSTON, K. A.; FOX, C. S.; MEIGS, J. B.; JACQUES, P. F. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. **Nutrition Research**, v. 33, p. 18-26. 2013.

WATZKE, H. J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 320-327. 1998.

WEI, Z.; WANG, J.; WANG, Y. Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 469–479. 2010.

WILDMAN, R. E. C.; KELLEY, M. Nutraceuticals and Functional Foods. In: WILDMAN, R. E. C. (Ed). **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. 2. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 2-3.

WILSON, D. W.; NASH, P.; BUTTAR, H. S.; GRIFFITHS, K.; SINGH, R.; DE MEESTER, F.; HORIUCHI, R.; TAKAHASHI, T. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. **Antioxidants**, n. 6, v. 81, p. 2-12. 2017.

WRÓBEL, K.; WRÓBEL, K.; URBINA, E. M. C. Determination of Total Aluminum, Chromium, Copper, Iron, Manganese, and Nickel and Their Fractions Leached to the Infusions of Black Tea, Green Tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (Mate) by ETA-AAS. **Biological Trace Element Research**, v. 78, p. 272-277. 2000.

YANG, Y.; LIN, H.; SU, K.; CHEN, C.; YU, Y.; LIN, C.; YU, S.; YAN, H.; SU, K.; CHEN, Y. S. Rutin, a Flavonoid That Is a Main Component of *Saussurea involucreata*, Attenuates the Senescence Effect in D-Galactose Aging Mouse Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 2. 2012.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 135, p. 170–178. 2012.

YUYAMA, L. K. O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J. P. L.; RODRIGUES, M. L. C. F.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 27.

ZENEON, O., PASCUET, N. S., TIGLEA, P. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, Cap. 23. 2008.