

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química

Náira da Silva Campos

**SOLUBILIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS VISANDO A DETERMINAÇÃO
DE CHUMBO E FERRO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Juiz de Fora
2016

Náira da Silva Campos

**SOLUBILIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS VISANDO A DETERMINAÇÃO
DE CHUMBO E FERRO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Dissertação apresentada ao departamento de
Química da Universidade Federal de Juiz de Fora
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

Coorientadora: Profa. Dra. Celly Mieko Shinohara Izumi

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva Campos, Náira.
SOLUBILIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS VISANDO A DETERMINAÇÃO DE CHUMBO E FERRO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA / Náira da Silva Campos. -- 2016.
83 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa
Coorientadora: Celly Mieko Shinohara Izumi
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

1. Espectrometria de Absorção Atômica. 2. Chumbo. 3. Ferro. 4. Carne de frango. 5. Espectroscopia Raman. I. Arromba de Sousa, Rafael, orient. II. Mieko Shinohara Izumi, Celly, coorient. III. Título.

Dedico aos meus pais, Hércules e Marlene, pelo incentivo e compreensão, ao meu irmão Natherson e ao meu noivo Pedro pelo apoio incondicional.

*“Onde não falta vontade
existe sempre um caminho.”*

*“Tudo o que temos que decidir é o
que fazer com o tempo que nos é dado.”*

J.R.R.Tolkien

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida.

À minha família, meus pais Hércules e Marlene e meu irmão Natherson por serem meu porto seguro.

Ao meu noivo Pedro, que sempre me apoiou e me incentivou a perseguir meus sonhos.

Aos professores Rafael Sousa e Celly Izumi pela amizade, orientação, paciência e ensinamentos recebidos.

Aos professores Céphora Sabarense e Marcone Oliveira pelas sugestões e colaborações durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Antonio Carlos Sant'Ana e Júlio Silva pelas importantes sugestões durante a qualificação.

Ao Professor Anderson Ribeiro (UFPEl) por ceder o material de referência certificado.

Às colegas Flávia Alvarenga e Michelle Nascimento do departamento de Nutrição (UFJF) pela contribuição com as cocções das amostras.

Aos meus amigos do LabNano (UFJF), Aline Filgueiras e Prof. Gustavo Andrade pela ajuda com secagem das amostras.

Aos colegas João Pablo Pereira (Nutrição UFJF), Guilherme Millen e prof. Nathan Barros (Laboratório de Ecologia Aquática UFJF) pela contribuição com a liofilização das amostras.

À minha amiga Doutoranda Ângela Lourdes pela grande ajuda com o procedimento de bioacessibilidade.

Aos meus amigos Ângela, Bruno, Kamila e Mayara pela amizade sincera e apoio recebidos.

Aos amigos do Grupo Baccan, em especial, Ângela, Antônio, Aparecida, Jemima, Joseane, Lílian, Mayara, Thalles e Valéria pelos bons momentos compartilhados. Aos amigos do GQAQ, Arina, Brenda, Karina, Lucas, Paula, Pedro Coutinho, Rafael Marques e Renatinha pelas sugestões e apoio. Aos amigos do Nupis, Fausto, Fernanda, Gustavo, Mellina, Rafaela, Raiane e Taimara pelo apoio.

Aos professores do departamento de química da UFJF que em muito contribuíram para a minha formação. Muito obrigada!

À UFJF, FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Este trabalho descreve a determinação dos teores totais de chumbo e ferro em amostras de carne de frango comercializadas na cidade de Juiz de Fora, Brasil. Além do teor total, determinado nos cortes coração, coxa, fígado, moela, peito e sobrecoxa, os teores bioacessíveis de ferro nos cortes de fígado e peito após cocção em panela de ferro também foram determinados. Os teores dos analitos foram determinados por espectrometria de absorção atômica. Os teores de chumbo total foram determinados por atomização em forno de grafite após dois métodos de preparo de amostra: mineralização ácida assistida por microondas empregando soluções diluídas de ácido e solubilização em meio alcalino utilizando o reagente TMAH[®]. Em ambos os métodos de preparo não foi possível quantificar o analito, pois os teores encontrados estavam abaixo do limite de quantificação. Todavia, os sinais de absorbância integrada, os limites de detecção (Meio ácido: 0,097 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Meio alcalino: 0,099 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e quantificação (Meio ácido: 0,32 e Meio alcalino: 0,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e a massa característica (Meio ácido: 10 e Meio alcalino: 13 pg) obtidos para o chumbo após os dois preparos apresentaram a mesma ordem de grandeza. Assim, o preparo em meio alcalino apresenta-se como uma boa alternativa às digestões ácidas por apresentar maior frequência analítica e se adequar a análises de rotina. Ambos os métodos para o chumbo foram avaliados em termos de precisão, com desvios menores que 15 %, em termos de exatidão por meio de ensaios de adição e recuperação, apresentando faixas entre 83 e 110 % de recuperação. Os teores de ferro total e bioacessível foram determinados por atomização em chama após mineralização ácida e simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, respectivamente. Os cortes de vísceras cruas apresentaram um teor total de ferro maior que os das amostras de músculo, com uma diferença de até 87 %. A exatidão e precisão do método foram avaliadas por ensaios de adição e recuperação e análise de material de referência certificado, com valores entre 91 e 110 % de recuperação e desvios menores que 5 %. As frações bioacessíveis em peito e fígado, após cocção em panela de ferro, foram de 23 e 56 %, respectivamente, indicando que o fígado é uma boa fonte de ferro. A Espectroscopia Raman foi utilizada para o monitoramento dos mecanismos de solubilização dos cortes de frango crus em meio alcalino. Os resultados indicam que o TMAH[®] atua na decomposição de compostos como aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas, devido a mudanças do perfil espectral das amostras antes e após o tratamento. Estes dados indicam que este tipo de preparo pode ser empregado para extração de metais ligados exclusivamente a estes compostos.

Palavras-chave: chumbo, espectrometria de absorção atômica, espectroscopia Raman, ferro, frango.

ABSTRACT

This study describes the determination of total content of lead and iron in chicken meat samples commercialized in the city of Juiz de Fora, Brazil. In addition to the total content, determined in heart cuts, thigh, liver, gizzard, breast and drumstick, iron bioaccessible fraction in breast and liver cuts was determined after cooking in iron pot. The analytes levels were determined by atomic absorption spectrometry. The total lead content was determined by graphite furnace atomization after two sample preparation methods: microwave-assisted acid digestion, using dilute acid solutions and solubilization in an alkaline medium, using TMAH[®] reagent. In both preparation methods, it was not possible to quantify the analyte because the levels found were below the limit of quantification. However, the signals of integrated absorbance, limits of detection (Acid medium: 0.097 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and Alkaline medium: 0.099 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and quantification (Acid medium: 0.32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and Alkaline medium: 0.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and characteristic mass (Acid medium: 10 pg and Alkaline medium: 13 pg) obtained for the lead after two sample preparations showed the same order of magnitude, demonstrating that the sample preparation in alkaline medium is a good alternative to acid digestion due to its higher analytical frequency and also it suits the routine analysis. Both methods for lead were evaluated in terms of accuracy, with deviations smaller than 15%, and through addition to recovery tests, with ranges between 83 and 110%. The total and bioaccessible iron fractions were determined by flame atomization after acid mineralization and *in vitro* gastrointestinal digestion simulation method, respectively. The raw viscera cuts had total iron content larger than those of muscle samples with differences up to 87%. The accuracy and precision of the method were evaluated through recovery tests and analysis of certified reference material, with range between 91-110% of recovery and deviations less than 5%. The iron bioaccessible fractions in breast and liver after cooking in iron pot were 23% and 56%, respectively, which indicates that liver is a good source of iron. The Raman spectroscopy was used to monitor the mechanisms of solubilization of raw chicken cuts in alkaline medium. The results indicate that TMAH[®] acts in the decomposition of some compounds such as amino acids, carbohydrates, lipids and proteins, due to changes in the spectral profile of the samples before and after the treatment. These data indicate that this type of preparation can be used for the extraction of metals bound exclusively to these compounds.

Keywords: atomic absorption spectroscopy, chicken, iron, lead, Raman spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exportações brasileiras de carne de frango por produto em 2014.....	1
Figura 2- Curvas de Pirólise para solução padrão Pb 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em Meio Ácido (0,2 % v/v HNO ₃) e Alcalino (1,75 % v/v TMAH) (Temperatura usada para atomização: 1200°C).....	22
Figura 3-Curvas de Atomização para solução padrão Pb 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em Meio Ácido (0,2 % v/v HNO ₃) e Alcalino (1,75 % v/v TMAH)	24
Figura 4- Curva Analítica para Pb em meio ácido (HNO ₃ 1 % v/v).....	25
Figura 5-Curva Analítica para Fe em meio ácido (HNO ₃ 1 % v/v)	29
Figura 6-Teores totais de Fe nos cortes de frango crus e após cocção em panela de ferro obtidos por F AAS	33
Figura 7-Superfície de Resposta Obtida no DCCR para o teor de Pb em fígado de cobaias em função do volume de TMAH (mL) e do tempo de solubilização (h)	37
Figura 8-Extratos das amostras de carne de frango após solubilização alcalina com TMAH	38
Figura 9-Curva Analítica para Pb em meio alcalino (TMAH 1,75 % v/v)	38
Figura 10-Superfície de Resposta obtida em função da massa de amostra (m) e da concentração de pepsina (P)	45
Figura 11-Teores totais e bioacessíveis de Fe nos cortes de frango após cocção em panela de ferro	46
Figura 12-Quantidade de fígado e peito de frango cozidos em panela de ferro que devem ser ingeridas diariamente de acordo com as recomendações da ANVISA.....	48
Figura 13-Espectros FT-Raman obtidos para os cortes de frango crus e secos antes do tratamento de solubilização alcalina.....	49
Figura 14- Espectros FT-Raman obtidos para coração de frango antes e após a solubilização alcalina.....	48
Figura 15-Espectros FT-Raman da amostra de fígado de frango antes e após a solubilização alcalina.....	51
Figura 16- Espectros FT-Raman obtidos para moela de frango antes e após a solubilização alcalina.....	49
Figura 17-Espectros FT-Raman obtidos para coxa de frango antes e após a solubilização alcalina.....	52

Figura 18-Espectros FT-Raman obtidos para peito de frango antes e após a solubilização alcalina.....	54
Figura 19-Espectros FT-Raman obtidos para sobrecoxa de frango antes e após a solubilização alcalina.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Programa de aquecimento da digestão das amostras de frango assistida por microondas	16
Tabela 2- Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial 3 ²	17
Tabela 3-Parâmetros instrumentais para determinação de Fe e Pb por AAS.....	18
Tabela 4-Programa de aquecimento utilizado para a determinação de Pb em carne de frango após digestão ácida ou solubilização alcalina	25
Tabela 5-Figuras de mérito obtidas para Pb em meio ácido na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico (Faixa de Trabalho 5,0 a 40 µg L ⁻¹).....	27
Tabela 6-Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Pb nos cortes de frango crus após digestão ácida obtidos por GF AAS (N=3)	28
Tabela 7-Teores totais de ferro encontrados nos cortes de frango crus e cozidos em panela de ferro após digestão ácida por F AAS (N=3).....	30
Tabela 8-Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Fe nos cortes de frango crus após digestão ácida por F AAS (N=3).....	31
Tabela 9-Resultados obtidos para o material de referência certificado para ferro analisado por F AAS. (N=3).....	31
Tabela 10-Figuras de mérito avaliadas para o Fe por F AAS	32
Tabela 11-Variáveis independentes e seus níveis avaliados no DCCR para a solubilização alcalina com os teores de Pb obtidos por GF AAS	35
Tabela 12-Valores dos coeficientes, desvio-padrão, teste- t e p-valor do planejamento DCCR 2 ²	36
Tabela 13-Figuras de mérito obtidas para o chumbo em meio alcalino na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico por GF AAS na.....	39
Tabela 14-Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Pb nos cortes de frango crus após solubilização alcalina obtidos por GF AAS (N=3).....	38
Tabela 15-Figuras de mérito obtidas para Pb na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico por GF AAS (Faixa de Trabalho 5,0 a 40 µg L ⁻¹)	42
Tabela 16-Variáveis independentes e seus níveis avaliados no planejamento 3 ² para determinar por FAAS o teor bioacessível de Fe em peito de frango cozido em panela de ferro	43
Tabela 17-Valores dos coeficientes, desvio-padrão, teste-t e p-valor do planejamento 3 ² para o procedimento de bioacessibilidade	44

Tabela 18-Figuras de mérito do procedimento de bioacessibilidade para Fe em cortes de frango. Detecção por F AAS e calibração por adição de padrão.....	47
Tabela 19- Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados para os cortes de frango antes e após a solubilização alcalina	56

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Reação do ácido nítrico com a matéria orgânica.....	8
Equação 2- Reação de transformação de óxido nítrico (NO) em dióxido de nitrogênio (NO ₂)	9
Equação 3- Reação de desproporcionamento de dióxido de nitrogênio (NO ₂) e formação de ácidos nítrico (HNO ₃) e nitroso (HNO ₂).	9
Equação 4- Reação de decomposição de ácido nitroso (HNO ₂).em óxido nítrico (NO). 9	
Equação 5- Expressão utilizada para calcular a fração bioacessível de ferro	18
Equação 6- Expressão usada para calcular a recuperação dos analitos.....	19
Equação 7- Expressão usada para calcular o limite de detecção.....	19
Equação 8- Expressão usada para calcular o limite de quantificação	20
Equação 9- Expressão usada para calcular o limite de detecção do método de bioacessibilidade.....	20
Equação 10- Expressão usada para calcular o limite de quantificação do método de bioacessibilidade	20
Equação 11- Mecanismo de atomização para o chumbo.....	24
Equação 12- Equação que descreve um modelo quadrático.....	35
Equação 13- Equação da superfície de resposta construída para o teor de Pb em fígado de cobaias como função do volume de TMAH (V) e do tempo de solubilização (t).	
Equação 14- Equação da superfície de resposta construída para o teor bioacessível de Fe em função da massa de amostra (m) e da concentração de pepsina (P).	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCCR	Delineamento composto central rotacional
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
c_0	Concentração característica
m_0	Massa característica
λ	Comprimento de onda
α	Coefficiente angular da reta
S_m	Desvio padrão do coeficiente linear
R^2	Coefficiente de determinação
IDR	Ingestão diária recomendada
pH	Potencial hidrogeniônico
R (%)	Porcentagem de recuperação
ν	Estiramento
ν_{ass}	Estiramento anti simétrico
ν_{sym}	Estiramento simétrico
δ	Torção

SUMÁRIO

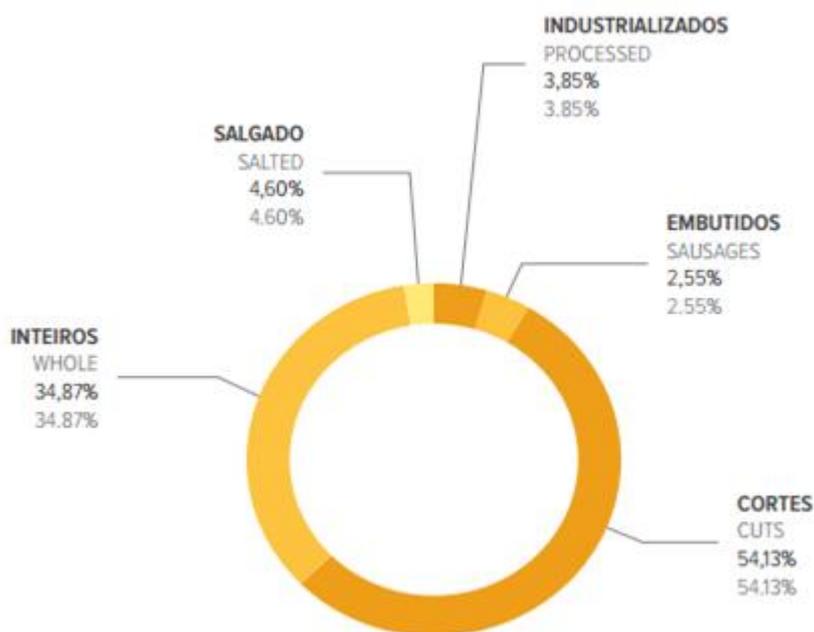
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ANALITOS DE INTERESSE NESTE ESTUDO	2
1.1.1	Ferro	2
1.1.2	Chumbo	3
1.2	BIOACCESSIBILIDADE.....	4
1.3	PROCESSAMENTOS TÉRMICOS NA CARNE.....	6
1.4	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	7
1.5	PREPAROS DE AMOSTRA	8
1.6	ESPECTROSCOPIA RAMAN	10
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	OBJETIVOS GERAIS	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4	METODOLOGIA	13
4.1	VIDRARIAS E UTENSÍLIOS	13
4.2	REAGENTES	13
4.3	EQUIPAMENTOS	13
4.4	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	14
4.4.1	Simulação da Cocção Doméstica	14
4.4.2	Preparo empregando Digestão Ácida	15
4.4.3	Preparo empregando Solubilização Alcalina (método desenvolvido)	16
4.4.4	Ensaio de Bioacessibilidade	16
4.5	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS	18
4.6	FIGURAS DE MÉRITO	19
4.7	ESPECTROSCOPIA RAMAN	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS	22
5.1.1	Programa de Aquecimento GF AAS para o Chumbo	22
5.2	PREPARO EMPREGANDO DIGESTÃO ÁCIDA.....	25
5.2.1	Determinação de chumbo nas amostras comestíveis de carne de frango	25
5.2.2	Determinação de ferro nas amostras comestíveis de carne de frango	28
5.2.2.1	<i>Aspectos da cocção</i>	32

5.3	PREPARO EMPREGANDO SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA	34
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE DIGESTÃO ÁCIDA E SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM CORTES DE FRANGO	40
5.5	ENSAIO DE BIOACESSIBILIDADE PARA O FERRO	42
5.6	ESPECTROSCOPIA RAMAN	48
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO I - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta intensa atividade agrícola e se destaca no mercado internacional no que tange à produção e exportação de produtos avícolas. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, ABPA, em 2014 a produção brasileira de carne de frango foi de 12,69 milhões de toneladas, sendo 32,3 % desta quantidade destinada à exportação. Os principais estados exportadores são Paraná e Santa Catarina, que respondem por 32,21 e 24,45 %, respectivamente, do volume exportado sendo Minas Gerais o 5º estado no ranking de exportações, com uma fatia de 4,74 %. Outro dado interessante é mostrado na Figura 1, que apresenta as exportações de carne de frango por produto em 2014. Os cortes lideram as frações exportadas com 54,13 % do volume, seguido do frango inteiro e dos demais cortes.

Figura 1-Exportações brasileiras de carne de frango por produto em 2014



Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), 2015.

Ainda de acordo com a ABPA, o volume de exportações brasileiras de produtos de frango em 2014 ultrapassou as exportações de países como os Estados Unidos, China e Comunidade Europeia. Tendo em vista a importância econômica deste produto para a economia do Brasil, mostra-se a relevância de estudos que permitam o monitoramento da qualidade e segurança alimentar deste tipo de produto, inclusive em função de

constituintes inorgânicos, essenciais como o ferro ou tóxicos como o chumbo (ABPA, 2015).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho consiste no desenvolvimento de métodos analíticos que permitam o monitoramento dos teores de elementos como Fe e Pb em cortes de frango comercializados na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

1.1 ANALITOS DE INTERESSE NESTE ESTUDO

Através do processo de digestão dos alimentos obtém-se os chamados nutrientes, substâncias fundamentais para o bom funcionamento do organismo. Estas substâncias se dividem em macronutrientes, que envolvem proteínas, gorduras e carboidratos e, em micronutrientes, tais como vitaminas e *minerais* (BETTELHEIM *et al*, 2012). Minerais como Cu, Fe, Mn e Zn são micronutrientes essenciais para a conservação e renovação dos tecidos, para o bom funcionamento das células nervosas e por participarem de muitas reações que ocorrem no organismo. Apesar da sua essencialidade, os micronutrientes minerais podem tornar-se tóxicos quando presentes em concentrações elevadas e representar riscos para a saúde (MACÊDO, 2002). Entretanto, elementos como As, Cd e Pb, que não são nutrientes, são “contaminantes importantes” da água e alimentos pois mesmo em baixas concentrações causam impactos ambientais e apresentam efeitos nocivos à saúde de plantas e animais, incluindo seres humanos. Estes elementos são capazes de substituir elementos essenciais em enzimas e macromoléculas conferindo elevada toxicidade e, por isso, são classificados como contaminantes (MANAHAN, 1993).

1.1.1 Ferro

Dentre os micronutrientes minerais, o ferro se destaca devido à sua elevada importância na nutrição em geral. Este elemento essencial é encontrado nas células vegetais e animais e distribuído em vários tipos de alimentos, dentre os quais se destacam os músculos, as vísceras e as leguminosas (GERMANO *et al*, 2002). Existem duas formas químicas para o ferro nos alimentos: o ferro heme ou Fe(II) e o ferro não-heme ou Fe(III). O ferro heme está presente no músculo bovino, em peixes, aves e vísceras e apresenta maior biodisponibilidade que o ferro não-heme, visto que é melhor absorvido pelo intestino, pois não interage com fatores inibidores de sua absorção. Já o

ferro não-heme, principal forma do nutriente nas dietas, tem potencial de absorção limitado por outros componentes da alimentação (FANTINI *et al*, 2008).

A essencialidade deste mineral deve-se à sua associação a proteínas e enzimas. Muitos processos biológicos são intermediados por enzimas que requerem o ferro como cofator, como a síntese de DNA e na cadeia respiratória. Além disso, a maior parte do ferro encontra-se ligado à hemoglobina, que é responsável pelo transporte de oxigênio nos tecidos (AZEVEDO *et al*, 2003).

Os valores diários recomendados para ingestão de ferro variam de acordo com a idade e o sexo do indivíduo. Crianças de 1 a 6 anos necessitam de 6 mg de Fe/dia, enquanto crianças na faixa etária de 7-10 anos precisam ingerir 9 mg/dia. Para adultos a ingestão diária recomendada é de 14 mg/dia Fe, enquanto gestantes e lactantes necessitam de valores maiores, iguais a 27 e 15 mg Fe/dia (ANVISA, 2005).

De acordo com a literatura (TACO, 2011) os teores de ferro em músculo de frango variam de 3 a 8 mg/100g e em vísceras de frango variam de 41 a 95 mg/100g, ou seja, até 12 vezes a mais. Entretanto, vale ressaltar que diversos fatores podem influenciar a composição de um alimento, inclusive nos teores de minerais como o ferro, tais como raça, sexo, idade e nutrição do animal (OLIVIO, 2008).

Alguns autores ressaltam que apesar da ingestão média de ferro presente na dieta de diversas regiões encontrar-se acima das recomendações diárias, a anemia ainda é um dos principais problemas de saúde pública no país e no mundo. A anemia ferropriva ocorre quando a quantidade efetivamente absorvida deste elemento é inferior à quantidade recomendada, o que causa alteração nos níveis de hemoglobina sanguínea. Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lípidos e DNA (BIANCHI *et al*, 1992).

1.1.2 Chumbo

Dentre os contaminantes inorgânicos, o chumbo é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como um dos elementos químicos mais perigosos para a saúde. Além de não existirem evidências de que este elemento seja essencial para os seres vivos, o chumbo é excretado pela urina e pelas fezes e tende a se acumular nos ossos causando uma série de alterações bioquímicas (WHO, 1978). Muitas destas alterações são consideradas irreversíveis e acarretam sintomas como problemas cognitivos em

crianças, diminuição da fertilidade em homens, redução das funções renais, dentre outros efeitos deletérios, incluindo o câncer (WHO, 1978; SCHIFER, 2005).

De acordo com a literatura, a intoxicação por chumbo ocorre principalmente devido à contaminação ambiental, por partículas no ar e pela ingestão de alimentos e bebidas contaminados (SCHIFER, 2005; De CAPITANI, 2009). No Brasil, a competência para determinação dos limites de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal é da ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Através da Portaria nº 42 de 29/08/2013, (BRASIL, 2013) são estabelecidos os limites máximos de tolerância para o chumbo em alguns alimentos. Os teores adotados para chumbo em vísceras e músculo de frango são $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, e são os mesmos regulamentados pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2006) e pelo MERCOSUL (MERCOSUL, 2011).

A taxa de absorção do chumbo, quando ingerido associado às refeições, varia de 2 a 16 % e pode chegar a 80 % se ingerido em jejum. Crianças e gestantes podem absorvê-lo da dieta numa taxa que varia de 45 a 50 %, valores bastante elevados dada a toxicidade deste elemento. A absorção do chumbo ocorre principalmente no duodeno, mas pode ser transportado por transporte ativo ou difusão para outros órgãos. Quando um indivíduo segue uma dieta pobre em elementos como Ca, Fe, P e aminoácidos ocorre um aumento da absorção de contaminantes inorgânicos como o Pb, pois há uma competição pelo mesmo sítio de absorção (De CAPITANI, 2009; GUYTON *et al*, 2011).

1.2 BIOACESSIBILIDADE

Um termo amplamente utilizado pela área da nutrição é a bioacessibilidade, que se refere à fração de um composto que é solúvel no trato gastrointestinal e é, por conseguinte, disponível para a absorção (GUYTON *et al*, 2011).

Em relação aos minerais, a sua absorção é influenciada por propriedades bioquímicas e físicas, tais como a sua solubilidade no organismo. Geralmente estes elementos estão ligados a grandes moléculas nos alimentos, como fragmentos peptídicos de elevada massa molecular. Entretanto, para que sejam absorvidos, estes minerais devem estar ligados a compostos de baixa massa molecular, como aminoácidos, quelatos ou como íons livres (GUYTON *et al*, 2011; JOHNSON, 2006).

A absorção dos minerais presentes num alimento ocorre no intestino delgado, onde são normalmente pouco solúveis (meio neutro ou alcalino). Esta absorção pode ocorrer por transporte ativo ou passivo. No primeiro caso, os íons metálicos dependem de proteínas transportadoras causando um gasto energético, cuja energia provém da transformação de moléculas de ATP (adenosina trifosfato) em moléculas de ADP (adenosina difosfato) e fosfato. Geralmente elementos como cálcio e ferro são absorvidos via transporte ativo. Em contrapartida, o transporte passivo ocorre pela passagem de íons metálicos pela membrana celular ou pelos espaços intermoleculares sem gasto energético (em termos de ATP) e sem a necessidade de proteínas carreadoras. Normalmente este tipo de transporte ocorre quando há uma diferença de concentração dos elementos entre os meios intra e extracelular (JUNQUEIRA, *et al* 2012).

Estudos para determinar frações bioacessíveis de um elemento são normalmente realizados *in vitro* nos quais se deve simular todas as condições fisiológicas de um organismo assim como a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão do alimento. Fatores como temperatura, movimentos peristálticos e composição enzimática dos sucos gástrico, biliar e duodenal são extremamente importantes para que o estudo *in vitro* reproduza as condições que ocorrem *in vivo*. Os extratos obtidos após estas simulações podem ser denominados digeridos e contêm os minerais solúveis no meio (fração bioacessível) a serem absorvidos, de fato, pela mucosa intestinal (fração biodisponível) (HUR *et al*, 2011).

A literatura fornece uma série de trabalhos que permitem determinar *in vitro* as frações bioacessíveis de diversos elementos em matrizes cárneas (LUTEN *et al*, 1996; CÁMARA *et al*, 2005; PURCHAS *et al*, 2006; MENEZES, 2010; RAMOS *et al*, 2012; TEIXEIRAS, 2014). Todavia, não existe uma padronização do procedimento, especialmente em relação à concentração de pepsina, enzima que participa da digestão estomacal. Em 1981, Miller e colaboradores (MILLER *et al*, 1981) propuseram um método *in vitro* para determinar a bioacessibilidade de Fe em matrizes cárneas e é o trabalho mais citado sobre o assunto.

Neste contexto, buscou-se no presente projeto uma padronização em termos de massa de amostra e concentração de pepsina, bem como a otimização de um procedimento robusto e exato para os ensaios de bioacessibilidade. Para isso, recorreu-se ao planejamento fatorial mas tomando como referência o estudo desenvolvido por Miller.

1.3 PROCESSAMENTOS TÉRMICOS NA CARNE

A qualidade da proteína da carne bem como o seu valor nutricional como um todo podem ser afetados pelos tratamentos térmicos que são aplicados, seja para conservação do produto, como os congelamentos, ou para o consumo através do cozimento. Os principais objetivos da cocção dos alimentos são o aumento da digestibilidade e palatabilidade, melhoramento do valor nutritivo e inibição do crescimento de organismos patogênicos, bem como da formação de substâncias prejudiciais ao organismo. A cocção de uma matriz proteica pode gerar alterações nas estruturas das proteínas, no pH e na sua capacidade de reter água. Uma forma de cocção consiste na aplicação do calor úmido para cocção do alimento em água. Quando esta forma de cozimento é aplicada, normalmente ocorrem perdas por dissolução de componentes hidrossolúveis. Todavia, está é uma das formas de cocção mais utilizadas para matrizes cárneas, seja em ensopados ou em cozidos (PHILIPPI, 2003).

Durante o cozimento, o alimento permanece por algum tempo em contato com o interior do recipiente em que é cozido e com os utensílios utilizados, podendo haver migração dos elementos que constituem estes materiais para a matriz alimentícia (PARK *et al*, 2000). A migração de metais presentes nestes utensílios pode ser interessante quando há carência dos mesmos na alimentação do indivíduo ou preocupante quando há migração de elementos essenciais ou tóxicos em concentrações nocivas à saúde (QUINTAES *et al*, 2004).

Um tipo de panela muito utilizada no estado de Minas Gerais é a panela de ferro fundido, que está associada à prevenção da anemia ferropriva devido à possível migração deste elemento para o alimento em preparação. A migração de minerais do material da panela depende principalmente de fatores como o pH do alimento, o tempo de contato, a temperatura e a quantidade de água usada na preparação (QUINTAES *et al*, 2004).

Assim, neste trabalho optou-se por reproduzir, em laboratório, uma cocção por calor úmido doméstica de cortes de carne de frango utilizando uma panela de ferro fundido artesanal para avaliar se há migração deste elemento para o alimento e, assim, avaliar o seu potencial no combate à anemia ferropriva.

1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Segundo o *CODEX Alimentarius* (CODEX, 1999) os métodos espectroanalíticos são recomendados para a determinação de contaminantes inorgânicos e micronutrientes minerais essenciais em produtos alimentícios. Para chumbo e ferro, os métodos recomendados se baseiam no uso da técnica de espectrometria de absorção atômica.

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica bem estabelecida e de vasta aplicação para a determinação de metais em diversos tipos de amostras. Baseia-se na capacidade de átomos livres, no estado fundamental e gasoso absorverem energia radiante, a qual é emitida por uma fonte de luz. A quantidade de radiação absorvida relaciona-se à quantidade de átomos, que é proporcional à concentração do elemento. O processo de atomização do elemento pode ser obtido, por exemplo, através de uma chama (F AAS) ou por atomização eletrotérmica, geralmente em forno de grafite (GF AAS) (CORREIA *et al*, 2003).

Apesar de amplamente aplicada, a técnica de F AAS apresenta algumas limitações, como o fato de não tolerar amostras com alto teor de sólidos dissolvidos, apresentar limites de detecção instrumental na faixa de miligramas por litro e apresentar elevado consumo de amostra (usualmente 3,0 mL). Além disso, a fração da solução de amostra que atinge a cela de atomização é normalmente inferior à 10 %, mostrando uma baixa eficiência da nebulização. Em contrapartida, a GF AAS é uma técnica que possui elevada detectabilidade e todo o volume de amostra inserido no interior do tubo é, de fato, utilizado. Além disto, apresenta limites de detecção da ordem de microgramas por litro, além da vantagem de necessitar de pequenas quantidades de amostra (usualmente 20 µL) e ser compatível com amostras na forma de suspensão/emulsão e até mesmo sólidas (SLAVIN *et al*, 1981). Porém, apresenta efeitos de matriz mais severos e menor frequência analítica do que a F AAS, além de apresentar maiores custos especialmente em relação aos gases.

Ao longo dos anos diversos avanços instrumentais tornaram os equipamentos de AAS mais robustos. Na década de 1980, surgiu o conceito de STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) (SLAVIN *et al*, 1981), que consiste em um conjunto de requisitos instrumentais e operacionais que permitem melhorias nas condições de análise, obtendo métodos mais sensíveis e com menor interferência. Dentre as condições STPF, pode-se citar a utilização de tubos de grafite com revestimento pirolítico e plataforma L'vov e a utilização de modificadores químicos, que possuem a

finalidade de diminuir a produção de diversos compostos térmicos de íons interferentes e/ou dificultar a volatilização do analito durante a pirólise da matriz (BORGES *et al*, 2005).

1.5 PREPAROS DE AMOSTRA

Para a determinação do teor de metais por AAS em amostras sólidas normalmente é necessário uma etapa prévia de dissolução ou decomposição da matriz, o que normalmente é realizado por digestão utilizando ácidos minerais concentrados (como HNO₃, H₂SO₄, HClO₄, HF e HCl) sob aquecimento, seja em sistema aberto (chapas e blocos de aquecimento) ou em sistema fechado (digestão assistida por microondas). Além da utilização de soluções de ácido concentradas, existe ainda a possibilidade de se empregar soluções diluídas destes mesmos ácidos, especialmente quando a digestão é realizada em sistema fechado/ assistido por radiação microondas, gerando uma redução dos resíduos, diminuição da periculosidade e menores valores de branco analítico.

Diversos trabalhos mostram a aplicabilidade destas soluções diluídas para a decomposição de matrizes diversas e complexas como tecidos vegetais (ARAÚJO *et al*, 2002), soja e carne bovina (GONZALEZ *et al*, 2009), café (CASTRO *et al*, 2009), alimentos em geral (NARDI *et al*, 2009) e amostras com alto teor de matéria orgânica (NOBREGA *et al*, 2012).

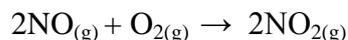
A utilização de soluções ácidas diluídas apresenta algumas vantagens tais como a redução dos resíduos, diminuição dos custos bem como a obtenção de menores valores para o branco analítico (GONZALEZ *et al*, 2009).

Para aperfeiçoar o desempenho deste tipo de digestão empregando soluções diluídas de ácido nítrico a literatura propõe que a digestão seja realizada em frascos fechados sob elevadas pressões e temperaturas, extinguindo assim a necessidade de utilização de outros reagentes sem comprometer a eficiência do processo. A eficiência deste tipo de digestão é baseada no ciclo de regeneração do ácido nítrico no frasco reacional, como mostrado pelas equações 1 a 4 (CASTRO *et al*, 2009):

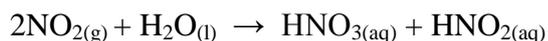
Equação 1- Reação do ácido nítrico com a matéria orgânica



Equação 2- Reação de transformação de óxido nítrico (NO) em dióxido de nitrogênio (NO₂)



Equação 3- Reação de desproporcionamento de dióxido de nitrogênio (NO₂) e formação de ácidos nítrico (HNO₃) e nitroso (HNO₂).



Equação 4- Reação de decomposição de ácido nitroso (HNO₂) em óxido nítrico (NO).



Neste processo o ácido nítrico diluído reage com a matéria orgânica da amostra gerando óxido nítrico (NO) (Equação 1) que, em seguida, reage com o oxigênio presente na fase gasosa, gerando dióxido de nitrogênio (NO₂) (Equação 2). Este sofre uma reação de desproporcionamento em meio aquoso gerando ácidos nítrico (HNO₃) e nitroso (HNO₂) (Equação 3). Este último se decompõe em óxido nítrico (NO) (Equação 4), que reage com o oxigênio da fase gasosa (Equação 2), formando assim mais ácido nítrico no meio reacional.

Ainda segundo Castro e colaboradores, a eficiência do processo de digestão depende das reações que ocorrem entre as fases líquida e gasosa além da formação de NO e sua conversão a NO₂. A ocorrência destas reações e eficácia deste tipo de digestão em frascos fechados com aquecimento assistido por radiação microondas relaciona-se ao gradiente de temperatura formado no interior do frasco de digestão.

Apesar de convencionais e amplamente utilizados em rotinas, estes procedimentos são longos e exaustivos, visto que demandam tempo e atenção total do analista e são mais suscetíveis à contaminação, especialmente quando se trata da determinação de “elementos traço” (KRUG, 2010). Neste sentido, existe uma busca por procedimentos de preparo que envolvam manipulação mínima da amostra e menor tempo, reduzindo perdas ou contaminação. Uma alternativa às digestões ácidas que se destaca na literatura consiste na extração e/ou solubilização de alguns tipos de amostra em meio alcalino, por exemplo através da utilização do Hidróxido de tetrametilamônio (TMAH[®]). Este reagente, que apresenta fórmula molecular (CH₃)₄NOH, é comercializado na forma de

uma solução alcalina (pH 13,4-14,7) a 25 % m/v em água ou metanol (NOBREGA *et al*, 2006). A utilização deste reagente é reportada como alternativa principal às digestões ácidas para o preparo de amostras proteicas, originalmente pouco solúveis em meio aquoso. Existem estudos em que o TMAH foi aplicado para o preparo de amostras biológicas tais como cabelo, unhas, sangue e tecidos biológicos. Estes trabalhos demonstraram que o emprego da solubilização alcalina com TMAH promove uma redução do tempo de preparo, com boa estabilidade da solução/suspensão de amostra obtida e dissolução completa ou parcial da matriz em meio aquoso (TAN *et al*, 1996, MURTHY *et al*, 1973, SOUSA *et al*, 2013). Entretanto, os mecanismos químicos de atuação deste reagente ainda são pouco estudados, assim como as condições ideais para a sua utilização.

1.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman baseia-se no espalhamento inelástico da radiação eletromagnética que interage com as moléculas, sendo a radiação espalhada com uma frequência diferente da incidida. Essa variação de frequência corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais da molécula (ALMEIDA, 2012).

Além de ser uma técnica versátil e rápida, possibilita determinar mais de um componente ao mesmo tempo, as amostras não precisam passar por um pré-tratamento e não gera subprodutos tóxicos. Desta forma, a espectroscopia Raman oferece oportunidades analíticas para muitas áreas de produção e controle de qualidade, inclusive de alimentos (ALMEIDA *et al*, 2011; REID *et al*, 2006). Lopez-Diez *et al* empregaram a Espectroscopia Raman combinada com métodos quimiométricos para detectar adulterações em azeites e outros óleos comestíveis, bem como Goodacre *et al* para diferenciação de amostras de mel em função da sua origem geográfica e botânica. Outro estudo bastante interessante, desenvolvido por Almeida *et al*, comprovou a adulteração de leite em pó, comercializado no Brasil, por adição de amido, estudo que também empregou ferramentas estatísticas aliadas à Espectroscopia Raman.

Neste trabalho, a Espectroscopia Raman foi utilizada como uma técnica investigativa, considerando as características citadas anteriormente e a necessidade de se entender melhor os mecanismos de atuação do TMAH®.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos relevantes em diversos países como China (ZHUANG *et al*, 1999; DERMIBAS *et al*, 1999), Turquia (YILMAZ *et al*, 2011; KURNAZ *et al*, 2011), Índia (KUMAR *et al*, 2007), República Checa (ZRALY *et al*, 2008), Arábia Saudita (HUSSEIN *et al*, 2011), Finlândia (TAHVONEN *et al*, 1994) e Eslovênia (DOGANOC *et al*, 1996) demonstraram que o teor de chumbo em músculo e tecidos de frango é algumas vezes significativo. No Brasil, entretanto, existem poucos estudos sobre a monitoração deste elemento em carne de frango, sendo a pesquisa de Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES *et al*, 2009) um exemplo. O teor de chumbo foi monitorado em carne mecanicamente separada, que é na verdade uma mistura de partes comestíveis de carne de frango. As amostras foram obtidas e os resultados encontrados ficaram dentro do limite estabelecido pela Legislação Brasileira. Logo, a prospecção de mais amostras é desejável e, principalmente, avaliando separadamente as diversas partes comestíveis do frango. Além disso, este tipo de avaliação precisa ser feita de tempos em tempos para que se tenha acesso a dados sempre atualizados.

Em relação ao micronutriente mineral Fe, a sua determinação é de extrema importância visto que este é um elemento essencial para várias funções vitais do organismo humano e sua carência vem provocando um dos problemas de saúde mais relatados no mundo. Além disso, no Brasil existem poucos estudos sobre a determinação e biodisponibilidade deste elemento em produtos de frango e assim a obtenção de informações confiáveis e atualizadas será útil para a área da nutrição.

Quanto ao uso da espectroscopia Raman, o fato de ser uma técnica versátil e que não necessita de preparo de amostra permitiu que a mesma fosse adequada para melhor estudar e entender o método de solubilização alcalina que se empregou. Além disso, a água presente nos extratos das amostras solubilizadas não interfere nas análises, diferentemente do que se observa com a espectroscopia no infravermelho convencional. Todavia, não existem estudos nos quais essa técnica seja utilizada no monitoramento de métodos de preparo de amostras. Logo, neste trabalho pretende-se também avaliar o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta para o monitoramento do preparo das amostras através da obtenção de espectros antes e após os tratamentos de solubilização em meio alcalino.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

1. Desenvolver estratégias para o preparo de amostras de partes comestíveis de carne de frango (músculo, fígado, coração e moela) visando à determinação de chumbo e ferro por espectrometria de absorção atômica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer um método analítico para preparo de amostras de partes comestíveis de carne de frango empregando digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para determinar os teores totais de chumbo e ferro;
2. Estabelecer um método analítico para preparo de amostras de partes comestíveis de carne de frango empregando solubilização alcalina com TMAH para determinar os teores totais de chumbo;
3. Utilizar a espectroscopia Raman como ferramenta para investigação da solubilização alcalina com TMAH.
4. Simular, em laboratório, a cocção doméstica das amostras de partes comestíveis de carne de frango, em panela de ferro, para verificar se ocorre lixiviação deste metal para as amostras.
5. Desenvolver e aplicar um método *in vitro* para estimar a bioacessibilidade de chumbo e ferro nos cortes de frango cozidos.
6. Avaliar os teores totais e bioacessíveis dos analitos após cocção em panela de ferro e caracterizar o potencial nutricional dos cortes analisados como fonte de ferro;

4 METODOLOGIA

4.1 VIDRARIAS E UTENSÍLIOS

Utilizou-se béqueres de 50 mL, balões volumétricos de 25,00 mL, tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL, micropipetas de volume variável (20-200 μL e 200-1000 μL), almofariz e pistilo de ágata, seringas descartáveis de 10 mL (Descarpack Slip, Joinville, Santa Catarina), papel indicador de pH (J. Prolab), filtro com membrana PTFE modificada 0,45 μm (Millex LCR, Merck), fogão doméstico (Atlas, Instruterm), gás de cozinha (Supergasbras, modelo P13), Termômetro digital infravermelho (INSTRUTHERM, TI 860), alho (Oishii), sal de cozinha (Cisne), óleo de soja (Soya) e, panela de ferro artesanal e colher de pau, adquiridos no comércio local.

Todos os materiais e vidrarias utilizadas neste trabalho foram lavados com água e sabão neutro e descontaminadas em ácido nítrico (HNO_3) 10 % v/v por 24 h e lavados com água deionizada.

4.2 REAGENTES

Utilizou-se soluções padrão de Fe e Pb 1000 mg L^{-1} (Qhemis High Purity, Jundiaí, SP, Brasil), soluções de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (PerkinElmer, São Paulo, SP, Brasil), TMAH 25% m/v P.A. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), HCl 38 % P.A., H_2O_2 30% m/v, HNO_3 65% m/v P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.), água deionizada (Millipore, Bedford, MA, USA), NaHCO_3 (Isofar, Duque de Caxias, Brasil), NaOH (Vetec, São Paulo, Brasil), Pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Pancreatina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Bile (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Utilizou-se, ainda, um material de referência certificado que consiste numa mistura de carnes de frango e suína (Meat Homogenate- NIST 1546) para avaliar a exatidão do método proposto para o analito Ferro.

4.3 EQUIPAMENTOS

Utilizou-se balança analítica (AND HR 120), banho ultrassônico (Unique UltraSonic Cleaner, modelo USC 2800), banho termostaticado (SOLAB, modelo Dubnoff SL-157/22), digestor de amostras por energia Microondas (Berghof, modelo

SpeedWave Four), Espectrômetro de Absorção Atômica nos modos forno e chama (Thermo Scientific, SOLAAR M5), Espectrômetro RFS 100 FT-Raman (BRUKER, laser Nd:YAG 1064 nm), liofilizador (Terroni, LS 3000) dessecador à vácuo (SOLAB, modelo SL-175/60) e centrífuga (Hettich Technology, modelo universal 320).

4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras comestíveis de frango (músculo e vísceras) foram adquiridas (aproximadamente 500 g) no comércio local da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os cortes de carne de frango escolhidos para este estudo foram *Coração, Coxa, Fígado, Moela, Peito e Sobrecoxa*. Os cortes de músculo tiveram as peles, ossos e gorduras visíveis retirados com atenção para não descaracterizar as amostras, foram lavados e particionados em pequenos cubos de aproximadamente 1 cm³, enquanto os cortes de vísceras foram apenas lavados. Todos os cortes foram divididos, de maneira aleatória, em duas partes de aproximadamente 250 g, sendo uma analisada crua e outra após cocção em panela de ferro. Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos sob congelamento (-50 °C) no Laboratório de Técnica Dietética e Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora até o momento da secagem e posterior análise.

Os cortes crus e cozidos foram macerados em mixer comercial e, após, levados para secagem em estufa a vácuo à (70 ± 1) °C por 72 h. Em seguida, foram novamente macerados e acondicionados em frascos plásticos previamente descontaminados em banho ácido (HNO₃ 10% v/v) e armazenados à temperatura ambiente até o momento da análise.

4.4.1 Simulação da Cocção Doméstica

Para avaliar a influência da cocção nos teores dos analitos selecionados, procedeu-se com a cocção dos cortes de frango em panela de ferro simulando uma cocção doméstica. A panela de ferro, adquirida exclusivamente para este estudo, foi inicialmente lavada com água e detergente neutros. Para a “cura” da mesma, passou-se óleo vegetal no interior e no exterior da panela que foi levada ao forno (pré-aquecido por 10 min) à 180 °C por 15 minutos, sendo este procedimento realizado por uma

semana. Após este período, a panela foi lavada novamente com água e detergente neutros, adicionou-se cerca de 1,5 L de água de torneira e levou-se para fervura por 15 minutos, procedimento realizado por 11 dias. Após estes procedimentos, com a panela seca, realizaram-se as cocções das amostras.

Aproximadamente 200 g de cada corte foi temperado com cerca de 4 g de sal de cozinha e 3 g de alho picado. Adicionou-se na panela de ferro aproximadamente 10 g de óleo de soja e aqueceu-se a mesma em fogão doméstico até a temperatura de 250 °C, aferida com termômetro digital infravermelho. Em seguida, adicionou-se a massa de corte cru (temperado) e procedeu-se com a cocção das amostras por 15 minutos, com duas adições de água de torneira, totalizando 140 mL. Após esta etapa, os cortes cozidos bem como líquidos residuais da cocção foram transferidos, sem raspagem do interior da panela, para um mixer doméstico e processados. Em seguida, foram armazenados em frascos plásticos descontaminados e congelados até o momento da secagem para posterior determinação dos analitos por espectrometria de absorção atômica após mineralização em meio ácido.

Um branco da cocção foi preparado utilizando as mesmas quantidades de todos os ingredientes utilizados para a cocção das amostras e foi submetido às mesmas condições de estocagem, secagem, preparo e análise.

4.4.2 Preparo empregando Digestão Ácida

Para a digestão dos cortes crus e cozidos em meio ácido, alíquotas de aproximadamente 250 mg de tecido seco foram pesadas em frascos de PTFE e misturadas à 6,00 mL de uma solução 7,00 mol L⁻¹ de HNO₃ destilado. Em seguida, os frascos foram fechados e as amostras foram levadas para digestão assistida por microondas seguindo o programa de aquecimento apresentado na Tabela 1, conforme sugerido pelo fabricante do digestor. (BERGHOF, 2013) O extrato obtido foi diluído para 25,00 mL em água deionizada.

Tabela 1-Programa de aquecimento da digestão das amostras de frango assistida por microondas

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Potência (%)
1	200	46	80
2	50	1	0

Fonte: Manual de Métodos Berghof

4.4.3 Preparo empregando Solubilização Alcalina (método desenvolvido)

Para solubilização em meio alcalino, adicionou-se 1,0 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% m/v a aproximadamente 250 mg de amostra seca. Essa mistura foi agitada por 3 minutos e deixada em repouso, *overnight*. Em seguida, o preparado foi diluído para 25,00 mL com água deionizada. Nestas análises foram avaliados qualitativamente a presença do analito e características deste solubilizado em relação à homogeneidade e estabilidade. Obtiveram-se soluções amarronzadas e/ou amareladas sem a presença de partículas visíveis.

Este tipo de preparo foi aplicado exclusivamente para determinação dos teores de Pb por espectrometria atômica por atomização eletrotérmica em forno de grafite.

4.4.4 Ensaio de Bioacessibilidade

Como não existe um método padrão para determinação dos teores bioacessíveis de metais em alimentos, avaliou-se neste trabalho como as variáveis massa de amostra e concentração de pepsina afetam os teores bioacessíveis de ferro em carne de frango. Para encontrar as condições ótimas para o procedimento de bioacessibilidade, fixou-se a concentração de bile e pancreatina (2,5 e 0,4 % m/v, respectivamente) e variou-se a massa de amostra (X_1) e a concentração de pepsina (X_2), conforme mostrado na Tabela 2. Esta otimização foi feita utilizando-se um planejamento fatorial do tipo 3^2 . Dessa forma foram realizados 11 experimentos, com triplicatas no ponto central para avaliar o erro experimental e a significância estatística dos efeitos. Os níveis avaliados foram baseados no método desenvolvido por Miller (ponto central), trabalho mais citado sobre

o assunto, e em outros trabalhos que empregaram 6 % m/v (TEIXEIRAS, 2014; TOGNON, 2012) e 26 % m/v de pepsina (PURCHÁS *et al*, 2006), níveis baixo (-1) e alto (+1), respectivamente.

Tabela 2- Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial 3²

Níveis	X ₁ , Massa (g)	X ₂ , Pepsina (%m/v)
-1	2,5	6
0	5,0	16
1	7,5	26

Fonte: Autoria Própria

Para a otimização multivariada, utilizou-se uma amostra de peito de frango resultante dos testes iniciais de cocção, conforme procedimento descrito no item 4.4.1.

Para isto, pesou-se diferentes quantidades desta amostra (2,5; 5 e 7,5g), adicionou-se 25 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹, ajustou-se o pH para 2,0 com uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ e adicionou-se 3,2 mL de pepsina em diferentes concentrações (6, 16 e 26% m/v). A mistura foi incubada em banho metabólico com agitação (Nível 5) durante 2 horas à temperatura de 37 °C. Em seguida, ajustou-se o pH para 7 com adição de solução de NaOH 5 mol L⁻¹ e adicionou-se 5,0 mL de uma solução mistura de Bile (2,5 %m/v) e Pancreatina (0,4% m/v). A mistura foi incubada novamente por mais 2 horas nas mesmas condições de agitação e temperatura. Após esse procedimento os extratos obtidos foram resfriados à temperatura ambiente para inibir a ação enzimática e filtrados em papel de filtro comum. Em seguida foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos e filtrados em filtros de 0,45 µm. Os teores dos analitos destes extratos foram determinados em seguida por espectrometria de absorção atômica. A condição otimizada obtida através deste planejamento foi aplicada para outra amostra de peito e de fígado de frangos também cozidos em panela de ferro, simulando cocção doméstica descrita anteriormente.

A fração percentual bioacessível de ferro nos cortes foi calculada pela razão entre o teor de ferro obtido no procedimento de bioacessibilidade pelo teor total obtido na digestão ácida, de acordo com a equação 5.

Equação 5- Expressão utilizada para calcular a fração bioacessível de ferro

$$\% \text{ Bioacessível} = \frac{\text{Teor Fe mg kg}^{-1} \text{ bioacessibilidade}}{\text{Teor Fe mg kg}^{-1} \text{ total}} \times 100$$

4.5 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

Os teores de Fe e Pb nas amostras de músculo e tecidos de frango foram determinados por espectrometria de absorção atômica utilizando-se o espectrômetro SOLAAR M5, modelo Thermo Scientific. Os parâmetros instrumentais, como temperaturas de pirólise e atomização para o Pb (determinados por GF AAS), e condições da chama para o Fe foram otimizados para os diferentes preparos de amostras e, após estabelecer as condições adequadas, as amostras coletadas foram analisadas.

Para as determinações de Fe, a altura do queimador e o fluxo de gás (C₂H₂) foram otimizadas utilizando uma solução padrão 5 mg L⁻¹ Fe utilizando as funções disponíveis pelo software do equipamento. A Tabela 3 apresenta as condições instrumentais utilizadas para as determinações de Fe e Pb, tais como abertura da fenda, comprimento de onda, entre outros.

Tabela 3-Parâmetros instrumentais para determinação de Fe e Pb por AAS.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Fenda espectral (nm)	Corrente da Lâmpada (mA)	Altura do queimador (cm)	Gases	Vazão do gás (L min ⁻¹)
Pb*	217,0	0,5	4	-	-	-
Fe**	248,3	0,2	10	7,0	ar/ C ₂ H ₂	1,2

*Determinado por GF AAS

**Determinado por F AAS

Fonte: Autoria Própria

4.6 FIGURAS DE MÉRITO

Foram realizados estudos de adição e recuperação de analitos por F AAS e GF AAS. Para o Pb, este estudo foi realizado nos níveis de concentração 5,0 µg L⁻¹ (nível baixo) e 30 µg L⁻¹ (nível alto) e para o Fe nos níveis de concentração: 2,0 mg L⁻¹ (nível baixo) e 4,0 mg L⁻¹ (nível alto), adicionados logo após a pesagem das amostras e passando assim por todas as etapas da digestão e/ou solubilização (PANTUZZO *et al*, 2009). O valor da recuperação, R (%), foi calculado utilizando a equação 6, na qual C₁ é a concentração do analito na amostra com o padrão adicionado, C₂ é a concentração do analito na amostra, C₃ é a concentração referente à adição do padrão à amostra, na solução de leitura.

Equação 6- Expressão usada para calcular a recuperação dos analitos

$$R (\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

Utilizou-se ainda um material de referência certificado que consiste numa mistura de carnes de frango e suína (Meat Homogenate- NIST 1546) para avaliar a exatidão do método proposto para o analito Ferro.

O branco foi utilizado (N = 10) para os cálculos dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos utilizando o desvio padrão (S) das medidas do branco e o coeficiente angular (α) da curva analítica, conforme as equações 7 e 8. Para o procedimento de bioacessibilidade, estes limites foram calculados de acordo com as equações 9 e 10, utilizando o desvio padrão do coeficiente linear (S_m) e o coeficiente angular (α) da curva analítica. Para calcular os valores de LOD e LOQ dos métodos propostos, utilizou-se um fator de correção considerando a massa de amostra utilizada no método e o volume final da amostra digerida, ou seja, levou-se em consideração o fator de diluição da amostra (HARRIS, 2005).

Equação 7- Expressão usada para calcular o limite de detecção

$$LOD = \frac{3 \times S}{\alpha}$$

Equação 8- Expressão usada para calcular o limite de quantificação

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S}{\alpha}$$

Equação 9- Expressão usada para calcular o limite de detecção do método de bioacessibilidade

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_m}{\alpha}$$

Equação 10- Expressão usada para calcular o limite de quantificação do método de bioacessibilidade

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_m}{\alpha}$$

A sensibilidade nas condições dadas foi avaliada através do cálculo da concentração característica (c_0) e da massa característica (m_0) para as técnicas F AAS e GF AAS, respectivamente. Os valores foram calculados pela divisão do valor 0,0044 pelo coeficiente angular da curva analítica. Para a massa característica este resultado foi também multiplicado pelo volume de amostra introduzido no tubo (30 μL) (WELZ, 1999; SLAVIN, 1984). A precisão foi avaliada por meio do monitoramento do valor do desvio padrão relativo (RSD).

4.7 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para compreender os mecanismos de solubilização do reagente alcalino TMAH para carne de frango crua coletou-se os espectros FT-Raman antes e após este preparo. Após o preparo descrito no item 4.4.3, os extratos sem diluição final foram congelados em temperatura -80°C por 24 horas e liofilizados por 48 h, até massa constante. Em seguida, coletou-se espectros FT-Raman de cada um dos cortes de frango crus (e após secagem) tanto antes como após a solubilização alcalina. Assim as alterações na composição puderam ser identificadas.

A potência do laser de excitação, a resolução espectral e o número de acumulações do sinal foram ajustados para se obter a melhor relação sinal-ruído mas de

forma que não houvesse degradação das amostras. Para as amostras antes do preparo, as condições otimizadas para obtenção dos espectros foram: potência do laser 100 mW, resolução de 4 cm^{-1} e 1024 acumulações. Já para os extratos solubilizados, obtidos após a liofilização, as condições otimizadas foram: potência do laser 10 mW, resolução de 4 cm^{-1} e 100 acumulações, sendo cada um dos espectros coletados 5 vezes. Em todos os espectros, utilizou-se os softwares GRAMS AI32 e Origin Pro 8 para o tratamento dos dados instrumentais. Especificamente foram usados a correção da linha base, soma e normalização do espectro pela banda de maior intensidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

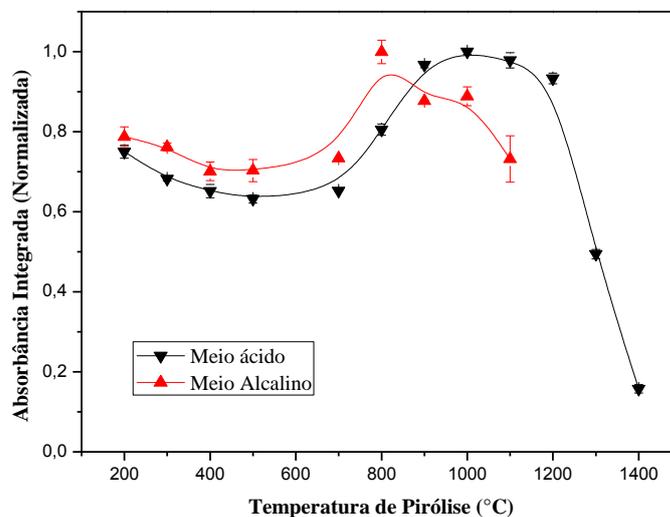
5.1 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

5.1.1 Programa de Aquecimento GF AAS para o Chumbo

Para a otimização do programa de aquecimento empregado para determinação deste analito, preparou-se duas soluções padrão de Pb $25 \mu\text{g L}^{-1}$ simulando os diferentes meios, 0,2 % (v/v) HNO_3 ou 1,75 % (v/v) TMAH). Utilizou-se como modificador químico $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 % (v/v) como sugerido na literatura (SOUSA *et al*, 2013; Perkin Elmer). Durante a construção das curvas de pirólise e atomização foram obtidos RSD < 10% para todos os casos. Não se observou formação de resíduos carbonáceos no tubo, em nenhum dos casos estudados, o que pode estar relacionado à baixa quantidade de matéria orgânica residual no caso do meio alcalino (TMAH[®]).

Para a determinação da temperatura adequada de pirólise, fixou-se a temperatura de atomização em $1200 \text{ }^\circ\text{C}$, como proposto pelo fabricante do equipamento, variou-se a temperatura de pirólise e coletou-se os sinais de absorvância integrada a cada $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 2 apresenta as curvas de pirólise obtidas para o analito. As temperaturas selecionadas para pirólise do Pb foram de $800 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ para os meios alcalino e ácido, respectivamente, pois estas temperaturas forneceram os maiores sinais analíticos, indicando a separação térmica do analito dos concomitantes. Além disto, após estas temperaturas houve uma queda do sinal analítico, indicando a formação dos precursores atômicos adequados para a atomização do analito (CORREIA *et al*, 2003). Esta diferença de temperaturas evidencia um comportamento diferente para o analito nos dois diferentes meios.

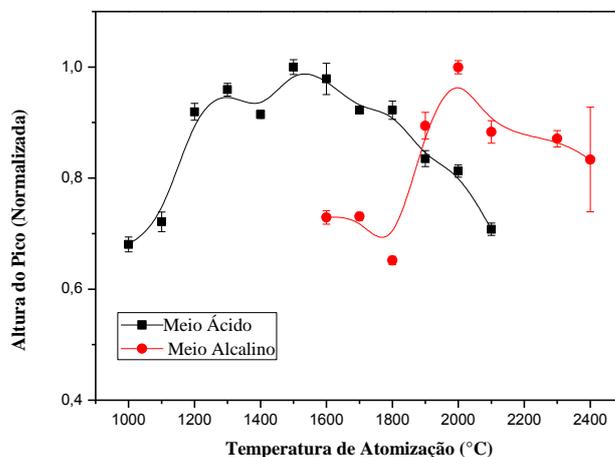
Figura 2-Curvas de Pirólise para solução padrão Pb 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em Meio Ácido (0,2 % v/v HNO_3) e Alcalino (1,75 % v/v TMAH) (Temperatura usada para atomização: 1200°C)



Fonte: Autoria Própria

Para determinar as temperaturas de atomização, para cada um dos meios, as temperaturas de pirólise selecionadas como ótimas foram fixadas e as temperaturas de atomização foram variadas. Como apresentado na Figura 3, as temperaturas selecionadas para atomização do Pb foram de 2000 °C e 1500 °C para os meios alcalino e ácido, respectivamente. Estas temperaturas foram selecionadas por serem as menores temperaturas a fornecerem os maiores sinais analíticos. Assim, obtêm-se uma boa sensibilidade analítica evitando temperaturas excessivamente elevadas que gerariam uma degradação precoce das paredes do tubo de grafite (CORREIA *et al*, 2003). Esta diferença sugere que o meio afeta o mecanismo de atomização do analito no interior do tubo de grafite. Entretanto, a literatura carece de informações que possam elucidar como estes mecanismos ocorrem, o que foge aos objetivos deste trabalho.

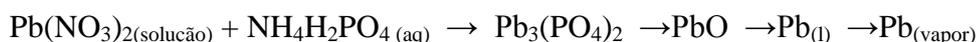
Figura 3-Curvas de Atomização para solução padrão Pb 25 µg L⁻¹ em Meio Ácido (0,2 % v/v HNO₃) e Alcalino (1,75 % v/v TMAH) (Temperatura de Pirólise: Meio Ácido: 1500°C e Meio Alcalino: 800°C)



Fonte: Autoria Própria

De acordo com a literatura (HASSEL *et al*, 1991; VOLYNSKII 2003), modificadores químicos do grupos dos fosfatos de amônio são indicados para as determinações de elementos como Cd, Pb, Sn e Zn. Este tipo de composto geralmente promove um aumento da temperatura de atomização do analito bem como atua na remoção dos interferentes mais voláteis da matriz durante o tratamento térmico. Para elucidar os mecanismos de atuação deste grupo de modificadores na atomização do Pb, Wendl e Muller-Vogt utilizaram difração de raios-X para identificar os produtos gerados durante o tratamento térmico de uma solução de nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂). A equação 11 elucidada as reações observadas neste estudo. Num outro estudo, Bass e Holcombe observaram a formação de fosfatos de chumbo por medidas de Espectrometria de Massas.

Equação 11- Mecanismo de atomização para o chumbo



A Tabela 4 apresenta o programa de aquecimento otimizado para o Pb nos diferentes meios de preparo.

Tabela 4-Programa de aquecimento utilizado para a determinação de Pb em carne de frango após digestão ácida ou solubilização alcalina

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s⁻¹)	Tempo (s)	Fluxo de Ar (mL min⁻¹)
Secagem	100	10	30	200
Pirólise	800 ^a /1000 ^b	150	20	200
Atomização	1500 ^b /2000 ^a	0	3	0
Limpeza	2500	0	3	200

^aMeio Alcalino, ^bMeio Ácido; Modificador Químico: 1% (v/v) NH₄H₂PO₄

Fonte: A autoria Própria

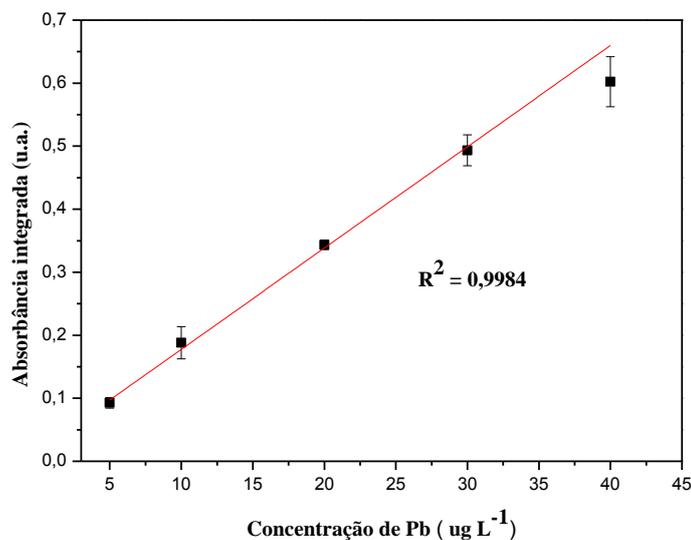
5.2 PREPARO EMPREGANDO DIGESTÃO ÁCIDA

A utilização de preparos de amostra que utilizam quantidades mínimas de reagentes e geram pequenos volumes de resíduos são compatíveis com os conceitos da Química Verde. Neste trabalho, adequou-se o método descrito por Sousa *et al*, que empregou HNO₃ 7,00 mol L⁻¹ para digestão de tecidos de ratos Wistar, para mineralização dos cortes de frango selecionados.

5.2.1 Determinação de chumbo nas amostras comestíveis de carne de frango

A curva analítica obtida para este analito em meio ácido empregando tubo de grafite convencional é apresentada na Figura 4. Observa-se boa linearidade (R² = 0,9984) na faixa de trabalho estudada, 5,0 a 40 µg L⁻¹. Todas as medidas realizadas apresentaram desvios menores que 15 %.

Figura 4-Curva Analítica para Pb em meio ácido (HNO₃ 1 % v/v)



Fonte: Autoria Própria

Para avaliar os desempenhos dos tubos de grafite convencional e pirolítico, procedeu-se com a construção de curvas analíticas para avaliar figuras de mérito como linearidade e sensibilidade, empregando o programa de aquecimento apresentado na Tabela 4. Como apresentado na Tabela 5, o tubo convencional apresentou maior sensibilidade em termos da massa característica, cujo valor foi de 10 pg, e menores LOD e LOQ, valores iguais a 0,097 e 0,32 µg g⁻¹, em comparação àqueles encontrados para o tubo revestido piroliticamente para as análises de Pb em meio ácido. Assim, optou-se por utilizar este tipo de tubo para as análises seguintes, nas quais todas as condições experimentais estudadas e otimizadas até aqui seriam aplicadas nas amostras coletadas. Note que o LOQ do método em questão é maior que o limite máximo estabelecido pela ANVISA para o teor de chumbo em músculo de frango (0,1 µg g⁻¹) e, neste caso, o mesmo não poderia ser utilizado para análises de rotina deste tipo de amostra. Todavia, estes resultados podem ser utilizados como estimativas.

Tabela 5-Figuras de mérito obtidas para Pb em meio ácido na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico (Faixa de Trabalho 5,0 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Tubo de Grafite	Equação da Reta	Coeficiente de Determinação (R^2)	m_0^c (pg)	LOD e	LOD e
				LOQ Instrumentais ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^d Método ($\mu\text{g g}^{-1}$)
C	$y = 0,0136 x + 0,1077$	0,9984	10	0,97 e 3,2	0,097 e 0,32
P	$y = 0,0114 x + 0,1040$	0,9942	12	1,0 e 3,4	0,10 e 0,34

^aC = Convencional

^bP = Pirolítico

^c m_0 = massa característica

^dFator de correção para unidade final em massa = 0,1 (0,25 g amostra/ 25,00 mL solução)

Fonte: Autoria Própria

Empregando o tubo convencional e as condições previamente otimizadas, o conjunto de amostras foi analisado a fim de se avaliar se as mesmas apresentavam o analito em níveis aceitáveis ou não, de acordo com a legislação (BRASIL, 2013). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6. Os teores encontrados para o Pb nos cortes de frango cru estão abaixo do limite de quantificação do método proposto e, portanto, não poderiam ser determinados nos cortes após cocção em panela de ferro. Por outro lado, considerando-se a relevância do método, a exatidão do mesmo foi avaliada. Para isto, realizaram-se ensaios de adição e recuperação conforme o item 4.6, visto que em GF AAS toda a matriz da amostra é eliminada durante a etapa de pirólise, não interferindo na determinação do analito. As recuperações médias, também apresentadas na Tabela 6, variaram de (90 ± 1) a (106 ± 1) % no nível baixo para as amostras de coração e coxa, respectivamente, e, no nível alto, de (90 ± 2) a (105 ± 1) % para as amostras de peito e moela, respectivamente. Todos os valores obtidos são coerentes para esta figura de mérito com aqueles sugeridos pela literatura no nível da concentração do analito nas amostras (BRITO *et al*, 2003).

Tabela 6- Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Pb nos cortes de frango crus após digestão ácida obtidos por GF AAS (N=3)

Amostra	Teor de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor de Pb adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)		R (%)
		5,0	30	
Coração	<0,32	5,0		90 \pm 1
		30		91 \pm 1
Coxa	<0,32*	5,0		106 \pm 1
		30		101 \pm 2
Fígado	<0,32	5,0		98 \pm 1
		30		100 \pm 1
Moela	<0,32	5,0		93 \pm 1
		30		105 \pm 1
Peito	<0,32*	5,0		102 \pm 1
		30		90 \pm 2
Sobrecoxa	<0,32*	5,0		102 \pm 1
		30		99 \pm 1

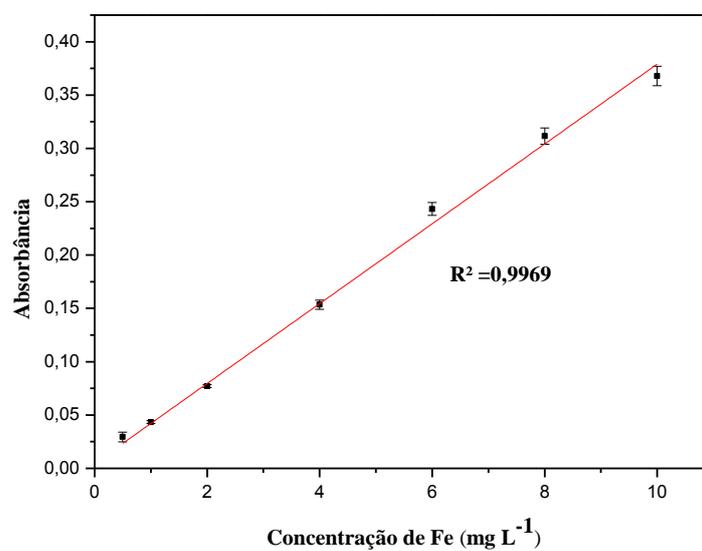
*Valor estimado

Fonte: Autoria Própria

5.2.2 Determinação de ferro nas amostras comestíveis de carne de frango

A curva analítica obtida para este analito em meio ácido é apresentada na Figura 5. Observa-se boa linearidade ($R^2 = 0,9969$) na faixa de trabalho estudada, 0,50 a 10 mg L⁻¹. Além disso, todas as medidas realizadas apresentaram desvios menores que 5 %.

Figura 5-Curva Analítica para Fe em meio ácido (HNO₃ 1 % v/v)



Fonte: Autoria Própria

Os teores totais de ferro encontrados nos cortes crus e após a cocção em panela de ferro são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7-Teores totais de ferro encontrados nos cortes de frango crus e cozidos em panela de ferro após digestão ácida por F AAS (N=3)

Amostra	Teor de Fe (mg kg ⁻¹)	
	Corte Cru	Corte Cozido
Sobrecoxa	45 ± 4	49 ± 2
Coxa	61 ± 4	26 ± 1
Peito	62 ± 10	23 ± 3
Coração	120 ± 8	115 ± 1
Moela	141 ± 11	115 ± 6
Fígado	338 ± 15	365 ± 10

Fonte: Autoria Própria

Os teores totais encontrados de Fe nos cortes crus variaram de (45 ± 4) mg kg⁻¹ a (338 ± 15) mg kg⁻¹ para as amostras de sobrecoxa e fígado, respectivamente. Estes resultados estão coerentes com a literatura (TACO, 2011). Todavia, não existem valores de referência para o teor total de Fe em amostras de moela de frango, o que mostra a relevância e contribuição desta determinação para a área nutricional. Já para os cortes após cocção em panela de ferro, os teores variaram de (23 ± 1) mg kg⁻¹ a (365 ± 10) mg kg⁻¹ para as amostras de peito e fígado, respectivamente.

Para avaliar a exatidão do método de digestão ácida para as determinações de ferro, foram realizados testes de adição e recuperação de analitos (cortes crus) bem como analisado um material de referência certificado. A faixa de recuperação encontrada foi de (91 ± 1) a (109 ± 1) % para o nível alto e de (92 ± 1) a (110 ± 1) % para o nível baixo, Tabela 8. De acordo com a literatura (BRITO *et al*, 2003), estes valores de recuperação são aceitáveis para o nível de concentração estudado.

Tabela 8-Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Fe nos cortes de frango crus após digestão ácida por F AAS (N=3)

Amostra	Teor de Fe (mg Kg⁻¹)	Teor de Fe adicionado (mg L⁻¹)	R (%)
Sobrecoxa	45 ± 4	2,0	93 ± 3
		4,0	91 ± 6
Coxa	61 ± 4	2,0	110 ± 1
		4,0	109 ± 1
Peito	62 ± 10	2,0	107 ± 1
		4,0	106 ± 1
Coração	120 ± 8	2,0	97 ± 2
		4,0	93 ± 4
Moela	141 ± 11	2,0	103 ± 3
		4,0	91 ± 1
Fígado	338 ± 15	2,0	92 ± 1
		4,0	94 ± 1

Fonte: Autoria Própria

A recuperação média obtida para o CRM foi de (103 ± 2) % e o valor encontrado é estatisticamente comparável ao valor certificado a 95% de confiança ($t_{\text{cal}} (N=3, \alpha=0,05) = 2,36$; $t_{\text{tab}} (N=3; \alpha=0,05) = 2,76$), resultados apresentados na Tabela 9. As altas recuperações encontradas indicam boa exatidão do método proposto.

Tabela 9-Resultados obtidos para o material de referência certificado para ferro analisado por F AAS. (N=3)

<i>Meat Homogenate NIST 1546</i>		
Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	R (%)
10,1 ± 0,7	10,4 ± 0,3	103 ± 2

Fonte: Autoria Própria

Outras figuras de mérito avaliadas para este analito estão compiladas na Tabela 10. A concentração característica obtida para o Fe foi de 0,12 mg L⁻¹, valor maior que aquele reportado pela literatura (0,07 mg L⁻¹) (WELZ, 1999).

Tabela 10-Figuras de mérito avaliadas para o Fe por F AAS

Equação da Reta	Coefficiente de Determinação (R ²)	LOD e LOQ Instrumentais (mg L ⁻¹)	LOD e LOQ ^a Método (mg kg ⁻¹)	Concentração Característica C ₀ (mg L ⁻¹)
y = 0,0373 x + 0,0069	0,9969	0,011 e 0,035	1,0 e 3,5	0,12

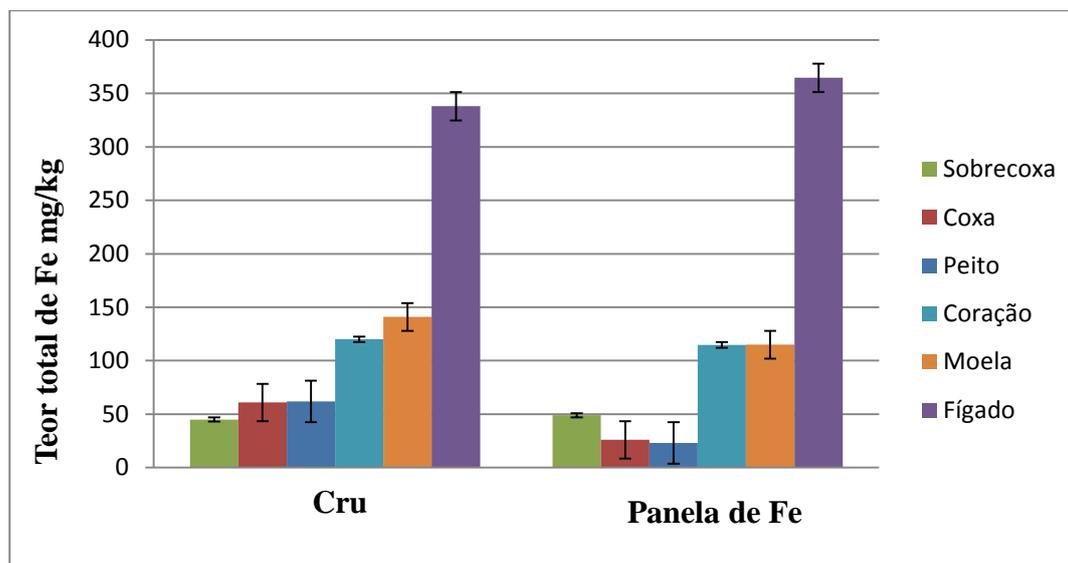
^aFator de correção para unidade final em massa = 0,1 (0,25 g amostra/ 25,00 mL solução)

Fonte: Autoria Própria

5.2.2.1 Aspectos da cocção

Observando o gráfico de barras apresentado na Figura 6, nota-se que o processo de cocção promoveu uma redução dos teores de ferro total nos cortes de coração, coxa, moela e peito, com uma variação de 4 % (coração) a 63 % (peito). Entretanto, para os cortes de fígado e sobrecoxa obteve-se um aumento do teor de ferro total de cerca de 8%. Considerando esta uma pequena diferença, aplicou-se um teste t de Student no nível de 95 % de confiança para comparar estes teores. Para os dois cortes, não se observou diferença significativa entre os teores obtidos nas amostras cruas e cozidas, visto que os valores de t calculados foram menores que o valor tabelado. (fígado: t_{calc} = 2,46; sobrecoxa: t_{calc} = 1,07; t_{tab} (N=3; α=0,05) = 2,76)

Figura 6-Teores totais de Fe nos cortes de frango cru e após cocção em panela de ferro obtidos por F AAS



Fonte: Autoria Própria

Durante a cocção ocorrem diversas reações que promovem alterações físico-químicas, trocas químicas e estruturais nas matrizes dos alimentos. Diferentes métodos de cozimento, as formas de transferência de calor, a temperatura, a duração do processo e o meio de cocção causam alterações químicas e físicas que podem modificar o valor nutricional dos alimentos, principalmente devido a perdas de vitaminas e minerais (ROSA *et al*, 2006). Quando o cozimento ocorre em água, ou seja, quando o calor úmido é aplicado, pode ocorrer perdas por dissolução ou lixiviação de componentes hidrossolúveis. Em 2009, Gerber e colaboradores avaliaram o efeito da cocção nos teores de minerais, vitaminas e ácidos graxos em carnes bovina e suína. Neste estudo, as amostras foram grelhadas e cozidas em água sem adição de temperos. Os autores observaram um aumento de até 16 % dos teores totais de ferro nos cortes de carne bovina mas não observaram diferenças significativas entre os teores deste mineral encontrados nas amostras de origem suína cruas e após os métodos de cocção.

Teixeira, em 2014, avaliou os teores totais e bioacessíveis de ferro em uma série de alimentos, tais como verduras, legumes e fígado bovino. A amostra de fígado bovino foi grelhada em diferentes temperaturas por 10 minutos e os teores totais de ferro obtidos na amostra cozida foram menores que aqueles obtidos na amostra crua, assim como os teores bioacessíveis deste elemento.

Menezes em 2010 também avaliou o efeito de processamentos térmicos em cortes de carne bovina, suína e de frango nos teores bioacessíveis de minerais incluindo o Fe. As amostras passaram por diferentes tratamentos térmicos, como cozimento em água, em forno microondas, em forno convencional e grelhadas. Para os cortes de peito de frango cozidos em água, o autor observou uma diminuição dos teores totais e bioacessíveis de ferro em relação aos cortes crus, justificada como perdas por lixiviação.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os dados apresentados pela literatura, todavia vale salientar que são poucos os trabalhos que avaliam o efeito da cocção nos teores minerais em carne de frango, sendo que não foram encontrados trabalhos em que a cocção deste tipo de amostra foi realizada em panela de ferro.

5.3 PREPARO EMPREGANDO SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA

Como mencionado anteriormente, este método de solubilização foi aplicado exclusivamente para as determinações de Pb. Como o analito não foi detectado nas amostras após os testes iniciais descritos no item 4.4.3, otimizou-se o método de extração realizando-se um planejamento de experimentos do tipo Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR), ou seja, um planejamento fatorial de dois níveis incluindo 4 experimentos em condições axiais e 3 repetições no ponto central (RODRIGUES *et al*, 2009; BEZERRA *et al*, 2008). Para isto, utilizou-se uma amostra de fígado de cobaias, *Wistar Hanover*, que continha o analito (material ex-vivo). Esta amostra é proveniente de um estudo (SOUSA *et al*, 2013) sobre toxicologia de chumbo em ratos desenvolvido anteriormente, num outro grupo de pesquisa e, naturalmente, com a aprovação de um Comitê de Ética (Protocolo 1600-1).

Para isto, a massa de amostra foi fixada em 250 mg e as variáveis independentes avaliadas foram o volume de TMAH (concentração fixa = 25 % m/v), x_1 (mL) e o tempo de solubilização, x_2 (h). Um total de 11 ensaios foram realizados de forma aleatória (por sorteio) e os dados gerados foram processados utilizando-se o Software Microsoft Excel. A matriz codificada contendo os níveis selecionados, assim como os valores de resposta obtidos (teor de Pb em $\mu\text{g g}^{-1}$) estão compilados na Tabela 11. Usando um modelo quadrático (equação 12), uma análise de regressão da superfície de resposta com unidades codificadas foi realizada para cada fator de resposta.

Equação 12- Equação que descreve um modelo quadrático

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \hat{\beta}_{ij} x_i x_j + r_i \quad i < j$$

Tabela 11- Variáveis independentes e seus níveis avaliados no DCCR para a solubilização alcalina com os teores de Pb obtidos por GF AAS

Ensaio	Volume de TMAH	Tempo h (x ₂)	Teor de Pb (µg g ⁻¹)
	mL (x ₁)		
1	-1 (1,25)	-1 (6)	39
2	1 (2,25)	-1 (6)	29
3	-1 (1,25)	1 (10)	30
4	1 (2,25)	1 (10)	39
5	0 (1,75)	0 (8)	51
6	0 (1,75)	0 (8)	66
7	0 (1,75)	0 (8)	50
8	-2 (0,75)	0 (8)	32
9	0 (1,75)	2 (12)	27
10	2 (2,75)	0 (8)	49
11	0 (1,75)	-2 (4)	33

Fonte: Autoria Própria

A Tabela 12 mostra os valores calculados para os coeficientes e os valores de p (p-valor é a probabilidade da hipótese nula). Usando $\alpha = 0,05$, um fator afeta a resposta se os coeficientes diferem significativamente de zero e $p < 0,05$. Neste estudo, os valores de p calculados indicam que as duas variáveis, volume de TMAH e tempo, não têm um efeito estatisticamente significativo na resposta (valor de $p > 0,05$) dentro do intervalo de níveis investigados. Além disso, o ajuste do modelo foi avaliado (ANOVA) e o resultado não indicou evidências de falta de ajuste no intervalo de confiança de 95% ($F_{\text{calc}} = 9,68$ e $F_{\text{tab}(3,3)} = 19,16$).

Tabela 12-Valores dos coeficientes, desvio-padrão, teste- t e p-valor do planejamento DCCR 2²

Coeficientes	Valor dos Coeficientes	Erro-padrão	t (2)	p-valor
b ₀	51,3	4,5	11,30	0,01
b ₁	2,8	2,6	1,11	0,38
b ₂	-0,9	2,6	-0,34	0,76
b ₁₁	-3,6	2,0	-1,79	0,22
b ₂₂	-6,2	2,0	-3,08	0,09
b ₁₂	4,8	4,4	1,08	0,39

Fonte: Autoria Própria

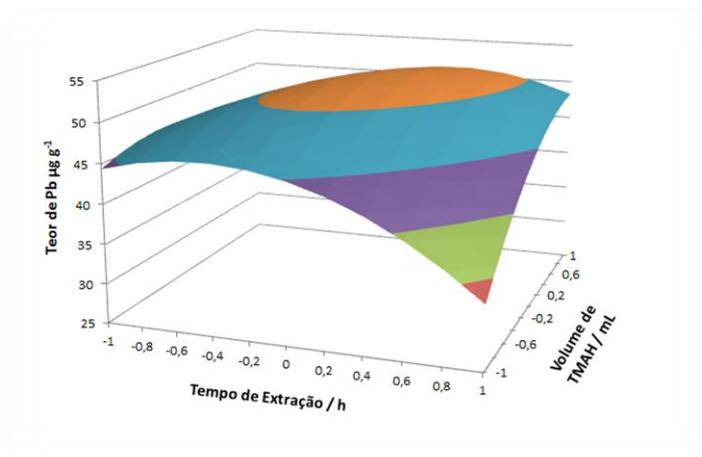
Após o tempo de solubilização requerido para cada ensaio da Tabela 11, os extratos foram transferidos quantitativamente para tubos de polipropileno graduados, diluídos para 25 mL com água deionizada e armazenados em temperatura ambiente. Os teores de Pb foram determinados após 12 h usando as condições instrumentais otimizadas apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

A relação matemática obtida entre as variáveis avaliadas no DCCR é descrita pela Equação 13. A Figura 7 apresenta a superfície de resposta construída para o teor de Pb em fígado de cobaias como função do volume de TMAH (V) e do tempo de solubilização (t).

Equação 13- Equação da superfície de resposta construída para o teor de Pb em fígado de cobaias como função do volume de TMAH (V) e do tempo de solubilização (t).

$$\text{Teor Pb } (\mu\text{g g}^{-1}) = (51,3 \pm 4,5) + (2,8 \pm 2,6) V + (-0,9 \pm 2,6) t + (-3,6 \pm 2,0) V^2 + (-6,2 \pm 2,0) t^2 + (4,8 \pm 4,4) Vt$$

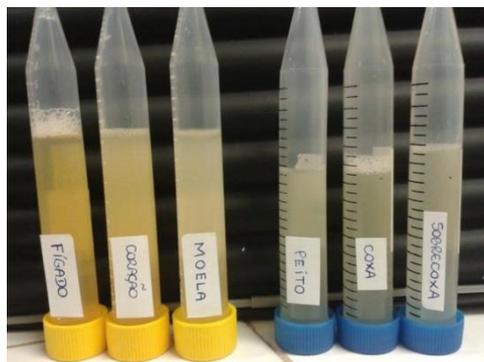
Figura 7-Superfície de Resposta Obtida no DCCR para o teor de Pb em fígado de cobaias em função do volume de TMAH (mL) e do tempo de solubilização (h)



Fonte: Autoria Própria

Apesar das variáveis avaliadas não serem estatisticamente significativas para a extração de Pb em fígado de cobaias nos níveis estudados, a resolução da equação 13 indica que o teor máximo de Pb nesta amostra foi extraído quando se empregou 1,75 mL de TMAH (25 % m/v) e 8 h de solubilização, condições dos ensaios do ponto central. Como o teor médio de chumbo encontrado nesta amostra (56 ± 10) $\mu\text{g g}^{-1}$ é compatível com o valor encontrado para a mesma no estudo anteriormente mencionado (57 ± 2) $\mu\text{g g}^{-1}$) (SOUSA *et al*, 2013) e, considerando-se a proximidade das matrizes, ambas de fígado animal, esta condição ótima foi aplicada para determinar os teores de Pb nos cortes de frango crus. Como apresentado na Figura 8, as soluções das amostras de frango após a aplicação desta condição de solubilização apresentaram coloração amarelada ou amarronzada sem a presença de material particulado visível, com formação de espuma após agitação, mas que desaparecia por completo após alguns minutos (aproximadamente 3 minutos), assim como descrito por Sousa *et al*.

Figura 8-Extratos das amostras de carne de frango após solubilização alcalina com TMAH

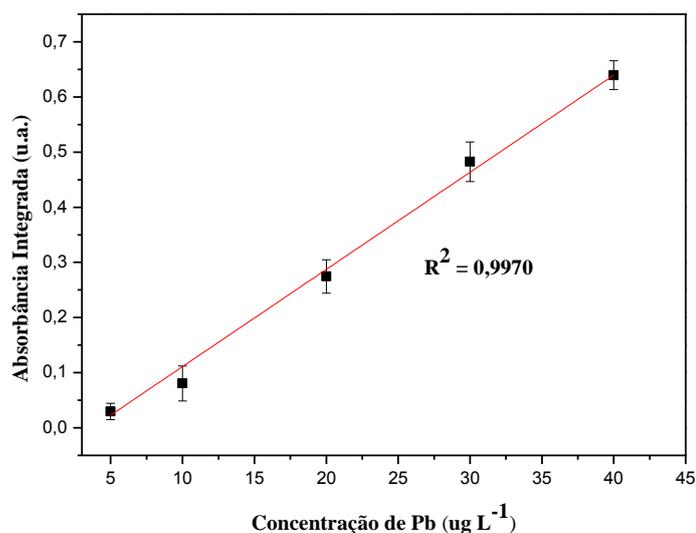


Fonte: Autoria Própria

Para validar o método de solubilização alcalina, avaliou-se as mesmas figuras de mérito mencionadas para o método de digestão em meio ácido para compará-los, tomando como referência este último.

A curva analítica obtida para o Pb em meio alcalino empregando tubo de grafite convencional é apresentada na Figura 9. Obteve-se boa linearidade ($R^2 = 0,9970$) na faixa de trabalho estudada, 5,0 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como para o meio ácido, sem perdas de sensibilidade de calibração. Todas as medidas realizadas apresentaram desvios menores que 15 %.

Figura 9-Curva Analítica para Pb em meio alcalino (TMAH 1,75 % v/v)



Fonte: Autoria Própria

Assim como realizado para o meio ácido, avaliou-se o desempenho dos tubos de grafite convencional e pirolítico através da avaliação das mesmas figuras de mérito. O comportamento observado para o analito dos diferentes tubos em meio alcalino foi compatível com o observado para o meio ácido, como mostrado na Tabela 13. O tubo convencional apresentou maior sensibilidade em termos da massa característica, cujo valor foi de 13 pg, e menores LOD e LOQ, valores iguais a 0,099 e 0,33 $\mu\text{g g}^{-1}$, em comparação àqueles encontrados para o tubo revestido piroliticamente para as análises de Pb em meio alcalino. Assim, optou-se por utilizar este tipo de tubo para as análises seguintes. Novamente, nota-se que o LOQ do método desenvolvido é maior que o limite máximo estabelecido pela ANVISA para o teor de chumbo em músculo de frango (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) e, neste caso, o mesmo também não poderia ser utilizado para análises de rotina deste tipo de amostra. Todavia, estes resultados podem ser utilizados como estimativas.

Tabela 13-Figuras de mérito obtidas para o chumbo em meio alcalino na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico por GF AAS na faixa de trabalho 5,0 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tubo de Grafite	Equação da Reta	Coeficiente de Determinação (R^2)	m_0^c (pg)	LOD e	LOD e
				LOQ Instrumentais ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^d Método ($\mu\text{g g}^{-1}$)
C ^a	$y = 0,0181x + 0,0783$	0,9970	13	0,99 e 3,3	0,099 e 0,33
P ^b	$y = 0,0054 x + 0,0440$	0,9925	15	2,1 e 6,9	0,21 e 0,69

^aC = Convencional

^bP = Pirolítico

^c m_0 = massa característica

^dFator de correção para unidade final em massa =0,1 (0,25 g amostra/ 25,00 mL solução)

Fonte: Autoria Própria

Assim como observado para o meio ácido, os teores encontrados para Pb nos cortes de frango crus por preparo via solubilização alcalina foram menores que o limite de quantificação deste método. A exatidão foi avaliada, assim como em meio ácido, por

ensaios de adição e recuperação descritos no item 4.6. Para o nível baixo, as recuperações médias, apresentadas na Tabela 14, variaram de $(88 \pm 2) \%$ para a amostra de peito à $(94 \pm 1) \%$ para as amostras de coração e moela. No nível alto, as recuperações médias variaram de (83 ± 1) a $(100 \pm 1) \%$ para as amostras de peito e coxa, respectivamente. Todos os valores obtidos são coerentes com aqueles sugeridos pela literatura em termos da concentração do analito nas amostras (BRITO *et al*, 2003). Os resultados indicam uma boa exatidão no método de preparo em meio alcalino.

Tabela 14-Teores totais e resultados dos ensaios de adição e recuperação de Pb nos cortes de frango crus após solubilização alcalina obtidos por GF AAS (N=3)

Amostra	Teor de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor de Pb adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)
Coração	<0,33	5,0	94 ± 1
		30	95 ± 3
Coxa	<0,33*	5,0	93 ± 1
		30	100 ± 1
Fígado	<0,33	5,0	91 ± 1
		30	95 ± 1
Moela	<0,33	5,0	94 ± 1
		30	90 ± 2
Peito	<0,33*	5,0	88 ± 2
		30	83 ± 1
Sobrecoxa	<0,33*	5,0	90 ± 1
		30	87 ± 1

*Valor estimado

Fonte: Autoria Própria

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE DIGESTÃO ÁCIDA E SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM CORTES DE FRANGO

Avaliando criticamente os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a solubilização alcalina é uma alternativa potencial ao preparo de amostras de carne de

frango para determinação de metais em baixa concentração, como o chumbo, especialmente em análises de rotina. Este tipo de preparo apresenta uma maior frequência analítica, sendo possível o preparo de várias amostras simultaneamente, em frasco único, o que reduz perdas por contaminação. Além de não requerer fontes de energia e utilizar quantidades diminutas de reagente, permite a análise de amostras em batelada.

No caso da digestão ácida assistida por radiação microondas, a frequência analítica é reduzida visto que a capacidade do rotor do equipamento utilizado é de apenas 12 frascos, sendo possível o preparo de no máximo 4 amostras por rodada, considerando o preparo em triplicatas. Além disso, o ácido utilizado neste estudo foi destilado, gerando custos de energia que são somados aos custos de energia necessária para o funcionamento do digestor bem como aos custos do próprio ácido.

Foi possível obter uma boa relação linear para o analito nos dois meios de calibração, na mesma faixa de concentração, bem como avaliar a exatidão de cada um dos métodos propostos. Apesar dos teores encontrados nos dois métodos serem menores que os limites de quantificação dos mesmos, os sinais obtidos apresentavam a mesma ordem de grandeza. Observou-se uma detectabilidade semelhante para o analito em ambos os meios utilizando dois tipos de tubos de grafite, convencional e revestido piroliticamente. A Tabela 15 apresenta em resumo uma comparação de desempenho analítico para os dois tubos estudados nas determinações do analito.

Tabela 15-Figuras de mérito obtidas para Pb na comparação entre os tubos de grafite convencional e pirolítico por GF AAS (Faixa de Trabalho 5,0 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Meio	Tubo de Grafite	Equação da Reta	m_0^c (pg)	LOD e	LOD e LOQ ^d Método ($\mu\text{g g}^{-1}$)
				LOQ Instrumentais ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Ácido	C ^a	$y = 0,0136 x + 0,1077$	10	0,97 e 3,2	0,097 e 0,32
	P ^b	$y = 0,0114 x + 0,1040$	12	1,0 e 3,3	0,10 e 0,33
Alcalino	C	$y = 0,0181x + 0,0783$	13	0,99 e 3,3	0,099 e 0,33
	P	$y = 0,0054 x + 0,0440$	15	2,1 e 6,9	0,21 e 0,69

^aC= tubo de grafite convencional

^bP= tubo de grafite pirolítico

^c m_0 = massa característica

^dFator de correção para unidade final em massa=0,1 (0,25 g amostra/ 25,00 mL solução)

Fonte: Autoria Própria

As massas características obtidas para o chumbo em meio ácido e alcalino utilizando tubo de grafite convencional foram de 10 e 13 pg e de 12 e 15 pg para o tubo de grafite pirolítico, respectivamente. A diferença entre estes valores é relativamente pequena e sugere uma detectabilidade semelhante para o chumbo em ambos os meios nas condições estudadas. Outros autores (ACAR, 2001) encontraram massas características entre 14 e de 46 pg para a determinação de chumbo em amostras biológicas, utilizando tubos de grafite revestidos e outros modificadores químicos. Estes resultados indicam que os valores observados são comparáveis aos valores encontrados na literatura. Além disso, exceto a sensibilidade da calibração para o tubo pirolítico em meio alcalino, todos os demais parâmetros encontram-se na mesma ordem de grandeza, para os diferentes meios, indicando que o meio alcalino pode ser usado sem perda significativa de desempenho analítico.

5.5 ENSAIO DE BIOACESSIBILIDADE PARA FERRO

As frações bioacessíveis de ferro obtidas através do planejamento fatorial 3² bem como a matriz codificada contendo os níveis selecionados são apresentadas na Tabela

16. Usando um modelo quadrático descrito pela equação 12, realizou-se uma análise de regressão da superfície de resposta com unidades codificadas para cada fator de resposta.

Tabela 16-Variáveis independentes e níveis avaliados no planejamento 3^2 para determinar por F AAS o teor bioacessível de Fe em peito de frango cozido em panela de ferro

Ensaio	Massa de amostra g (X_1)	Pepsina %m/v (X_2)	Teor bioacessível Fe mg kg ⁻¹	% Bioacessível*
1	-1 (2,5)	-1 (6)	22	30
2	0 (5,0)	-1 (6)	13	18
3	1 (7,5)	-1 (6)	15	20
4	-1 (2,5)	0 (16)	24	33
5	0 (5,0)	0 (16)	16	22
6	0 (5,0)	1 (26)	17	23
7	1 (7,5)	1 (26)	10	13
8	1 (7,5)	0 (16)	12	16
9	-1 (2,5)	1 (26)	29	39
10	0 (5,0)	0 (16)	16	22
11	0 (5,0)	0 (16)	15	20

*Calculada pela equação 1, onde Teor Fe_{total} = 74 mg kg⁻¹

Fonte: Autoria Própria

A porcentagem bioacessível de ferro encontrada na amostras variou de 13 a 39 % para os ensaios 7 e 9, respectivamente. Os valores dos coeficientes calculados bem como os desvios-padrão associados e valores de p-valor são apresentados da Tabela 17.

Tabela 17-Valores dos coeficientes, desvio-padrão, teste-t e p-valor do planejamento 3² para o procedimento de bioacessibilidade

Coeficientes	Valor dos Coeficientes	Desvio-padrão	t(2)	p-valor
b ₀	15,6	0,5	30,84	0,01 x 10 ⁻¹
b ₁	-6,4	0,4	-15,79	0,04 x 10 ⁻¹
b ₂	0,6	0,4	1,41	0,29
b ₁₁	2,7	0,6	4,33	0,05
b ₂₂	0,5	0,6	0,58	0,62
b ₁₂	-3,1	0,5	-6,22	0,03

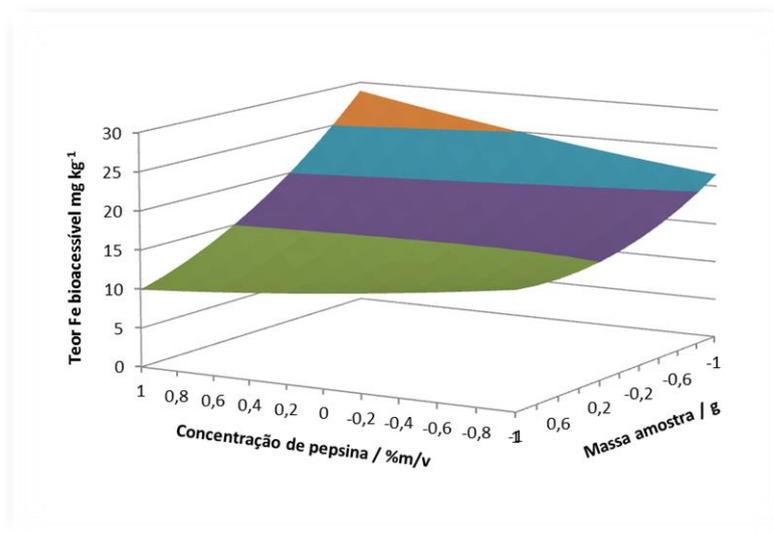
Fonte: Autoria Própria

De acordo com os p-valores, conclui-se que neste estudo a variável massa de amostra (X₁) e a interação massa de amostra-pepsina (X₁₂) apresentam um efeito estatisticamente significativo (p-valor <0,05) no teor de Fe bioacessível dentro do intervalo de níveis investigados. O ajuste do modelo também foi avaliado (ANOVA) e não se observou evidência de falta de ajuste no intervalo de confiança de 95 %. (F_{calc} = 1,03 e F_{tab(3,2)} = 19,16). Assim, obteve-se a relação matemática entre as variáveis avaliadas no planejamento 3² e o teor bioacessível de ferro, como descrito pela equação 14. Desta forma, construiu-se uma superfície de resposta para o teor de ferro bioacessível em função da massa de amostra (m) e da concentração de pepsina (P), a qual é apresentada na Figura 10.

Equação 14- Equação da superfície de resposta construída para o teor bioacessível de Fe em função da massa de amostra (m) e da concentração de pepsina (P).

$$\text{Teor Fe}_{\text{bioacessível}} (\text{mg kg}^{-1}) = (15,6 \pm 0,5) + (- 6,4 \pm 0,4) m + (0,6 \pm 0,4) P + (2,7 \pm 0,6) m^2 + (0,5 \pm 0,6) P^2 + (-3,1 \pm 0,5) mP$$

Figura 10-Superfície de Resposta obtida em função da massa de amostra (m) e da concentração de pepsina (P)



Fonte: Autoria Própria

Por se tratar de uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal (que ocorre num organismo vivo), ou seja, de um sistema biológico complexo, o objetivo da otimização multivariada não era obter uma resposta máxima, o que normalmente é almejado nas aplicações analíticas. Neste caso, o objetivo deste estudo era obter uma condição que reproduzisse a realidade deste organismo, em termos da capacidade de disponibilização do analito usando concentrações fisiológicas das enzimas no meio gastrointestinal. Assim, buscou-se uma condição com resultados compatíveis com teores biodisponíveis para este analito, já reportado pela literatura para as amostras de carne de frango.

Para o ferro, a literatura sugere teores biodisponíveis que variam de 20 a 30 % (BORTOLINI *et al*, 2010). Assim, aliando os dados da literatura aos custos por análises, visto que a enzima pepsina possui um alto valor agregado, selecionou-se a condição do ensaio 3 ($X_1 = 7,5$ g e $X_2 = 6$ % m/v) como a condição ótima para determinação do teor bioacessível de ferro em peito de frango. Além disso, a concentração de pepsina utilizada neste ensaio é compatível com aquela utilizada em diversos trabalhos que simulam a digestão gástrica *in vitro* (TOGNON, 2012; TEIXEIRAS, 2014).

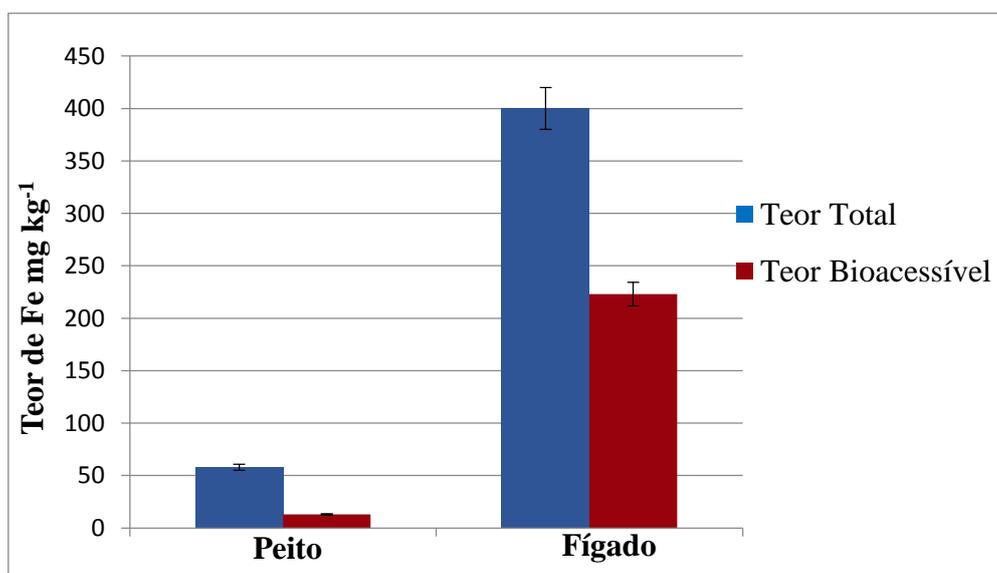
Aplicou-se a condição escolhida para a determinação dos teores bioacessíveis de ferro em dois cortes de carne de frango: peito e fígado, ambos cozidos em panela de

ferro, como descrito anteriormente. Estas amostras foram escolhidas por apresentarem o menor e o maior teor de ferro total, respectivamente.

As frações bioacessíveis de ferro obtidas para as amostras de peito e fígado cozidos foram de 23 e 56 %, respectivamente. A fração obtida para o peito de frango está coerente com os resultados obtidos por Menezes (2010) para este mesmo tipo de amostra, cerca de 20 %; para o fígado não foram encontrados trabalhos em que as frações bioacessíveis deste mineral foram determinados nesta matriz. Além disso, estes resultados indicam que o ferro presente no fígado de frango é mais disponível para ser absorvido no meio gastrointestinal do que aquele presente no peito, mostrando que o fígado é, realmente, uma boa fonte de ferro.

O gráfico apresentado da Figura 11 mostra os teores totais e os teores bioacessíveis obtidos para os cortes de frango cozidos.

Figura 11-Teores totais e bioacessíveis de Fe nos cortes de frango após cocção em panela de ferro



Fonte: Autoria Própria

Como não há CRM's para avaliar a exatidão de métodos de bioacessibilidade e por se tratar de uma matriz complexa, recorreu-se à calibração por adição de padrão, realizada em triplicata para cada uma das amostras escolhidas. Como medida da sensibilidade estimou-se o valor da concentração característica e os limites de detecção e quantificação, que foram calculados de acordo com as equações 4 e 5. A Tabela 18

apresenta as figuras de mérito avaliadas para o procedimento de bioacessibilidade. Obteve-se uma boa linearidade ($R^2_{\text{Fígado}} = 0,9991$ e $R^2_{\text{Peito}} = 0,9976$) na faixa de calibração utilizada para ambas as amostras.

Tabela 18-Figuras de mérito do procedimento de bioacessibilidade para Fe em cortes de frango. Detecção por F AAS e calibração por adição de padrão

Amostra	Coefficiente de Determinação (R^2)	LOD e LOQ Instrumentais (mg L^{-1})	LOD^a e LOQ Método (mg kg^{-1})	Concentração Característica C_0 (mg L^{-1})
Fígado	0,9991	0,58 e 1,9	2,9 e 9,9	0,20
Peito	0,9976	0,37 e 1,2	1,9 e 6,3	0,16

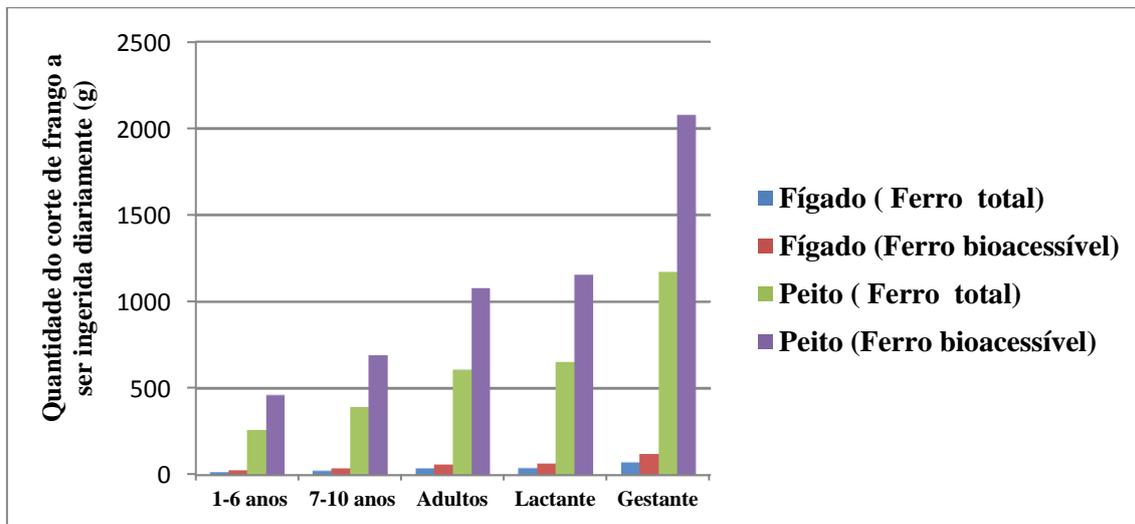
^aFator de correção para unidade final em massa: 5,1 (7,5 g amostra/ 38,00 mL solução)

Fonte: Autoria Própria

Os valores de LOD, LOQ e os valores de concentração característica obtidos para as determinações das frações bioacessíveis são maiores que aqueles obtidos para as determinações de ferro total. Isto pode ser justificado pelo fato dos extratos obtidos após a simulação da digestão gastrointestinal conterem um teor maior de matéria orgânica (sais e enzimas), o que pode influenciar na leitura das amostras devido ao elevado teor de sólidos dissolvidos (LEME, 2015). Todavia, foi possível quantificar as frações bioacessíveis de ferro já que os teores encontrados para as amostras foram maiores que o LOQ do método.

Para avaliar o potencial da carne de frango como fonte de ferro, calculou-se as quantidades de fígado e peito de frango necessárias para fornecer a ingestão diária de ferro recomendada pela Anvisa, de acordo com os grupos mostrados anteriormente. O gráfico de barras mostrado na Figura 12 mostra estas quantidades calculadas em função do teor total de ferro, bem como dos teores bioacessíveis deste elemento, ambos determinados nas amostras de peito e fígado após o cozimento em panela de ferro feita neste trabalho.

Figura 12-Quantidade de fígado e peito de frango cozidos em panela de ferro que devem ser ingeridas diariamente de acordo com as recomendações da ANVISA



Fonte: Autoria Própria

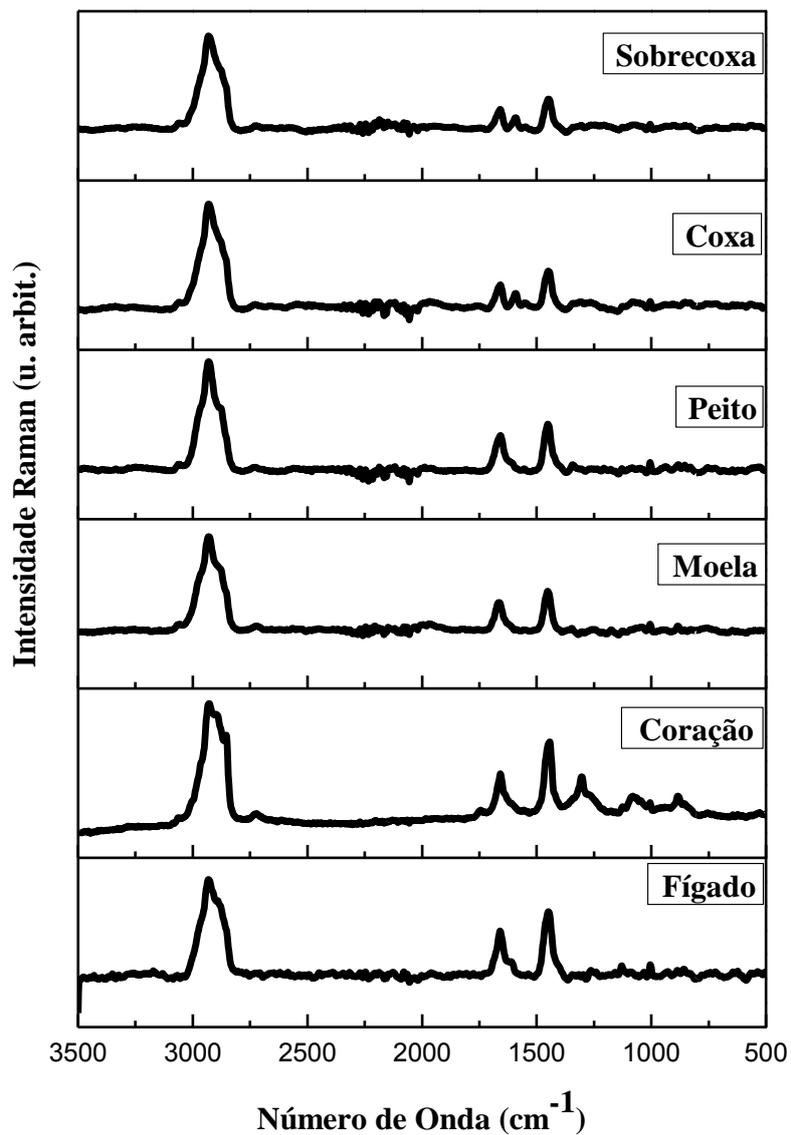
Como os teores totais e bioacessíveis de ferro no fígado foram maiores, as quantidades para ingestão diária conforme recomendado para este corte são menores que as necessárias para peito, fazendo do fígado uma boa fonte deste elemento. A ingestão diária deste corte, considerando esta a única fonte de ferro e o teor bioacessível encontrado, deve variar de 27 g para crianças de 1 a 6 anos à 121 g para gestantes. Em contrapartida, para atingir as recomendações diárias, crianças na mesma faixa etária devem consumir 462 g de peito de frango e gestantes 2077 g, valores elevadíssimos e fora da realidade de qualquer dieta. Entretanto, vale salientar que estes dados mostram uma estimativa das ingestões necessárias de carne de frango mas que não refletem uma dieta saudável e balanceada, em que há outras fontes de ferro na alimentação, tais como feijão e outras leguminosas.

5.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A Figura 13 apresenta os espectros FT-Raman obtidos para os cortes de frango crus e secos coletados conforme descrito no item 4.5. É possível notar que os cortes apresentam ligeiras diferenças no perfil espectral, justificadas pelas diferenças de composição centesimal dos tecidos. Observa-se que a amostra de coração apresenta um perfil espectral bem diferente dos demais cortes de vísceras, especialmente em relação à

banda na região de 1300 cm^{-1} . Além disso, as amostras de coxa e sobrecoxa apresentam uma banda na região de 1600 cm^{-1} e que não foi observada no espectro da amostra de peito.

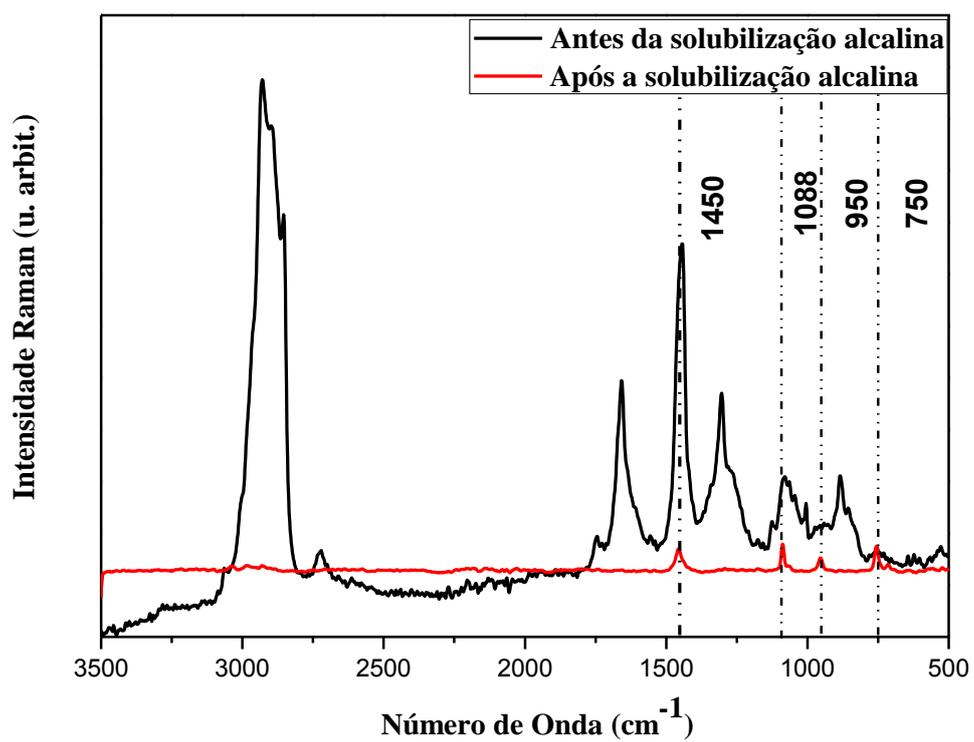
Figura 13-Espectros FT-Raman obtidos para os cortes de frango crus e secos antes do tratamento de solubilização alcalina



Fonte: Autoria Própria

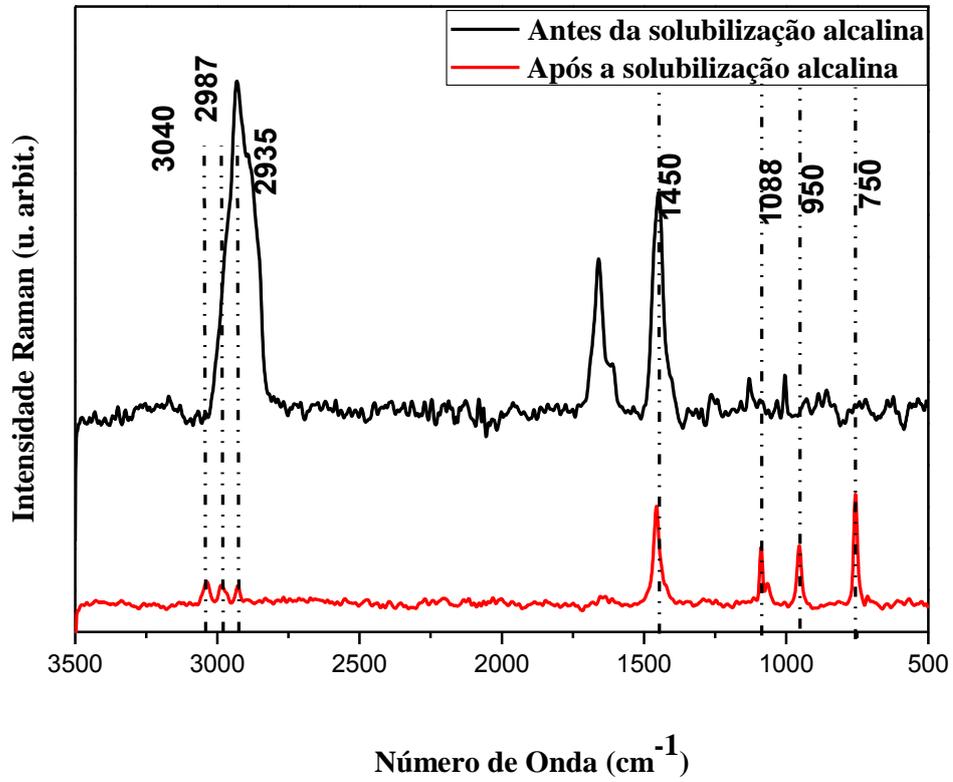
A Tabela 19 apresenta uma tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados nos espectros dos cortes de frango antes e após a solubilização alcalina, cujos espectros são apresentados nas Figuras 14 a 19.

Figura 14-Espectros FT-Raman obtidos para coração de frango antes e após a solubilização alcalina



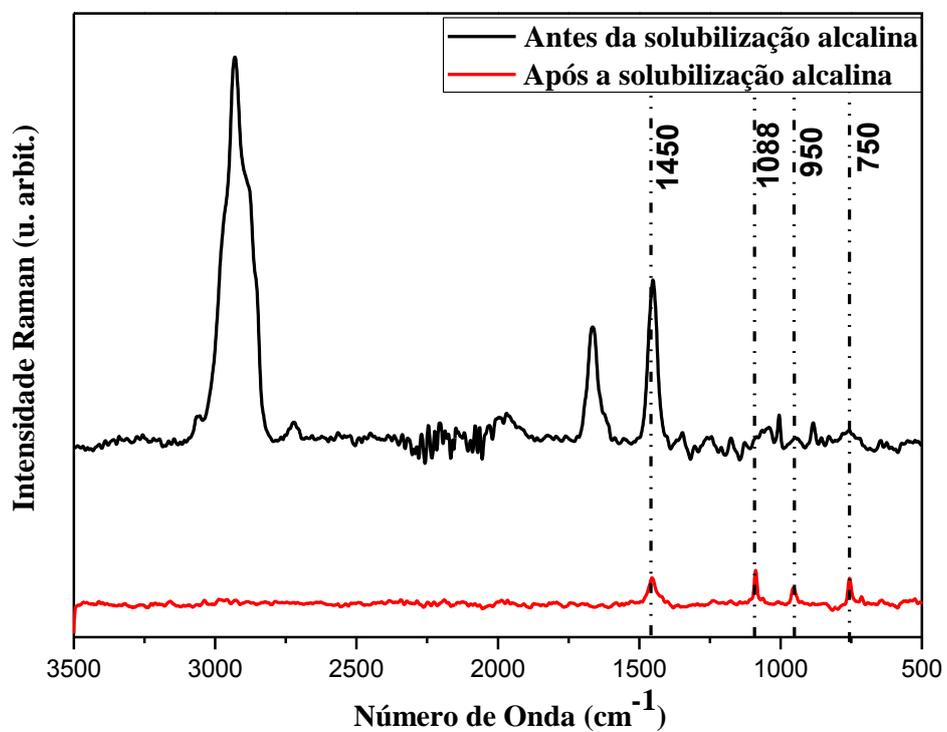
Fonte: Autoria Própria

Figura 15-Espectros FT-Raman da amostra de fígado de frango antes e após a solubilização alcalina



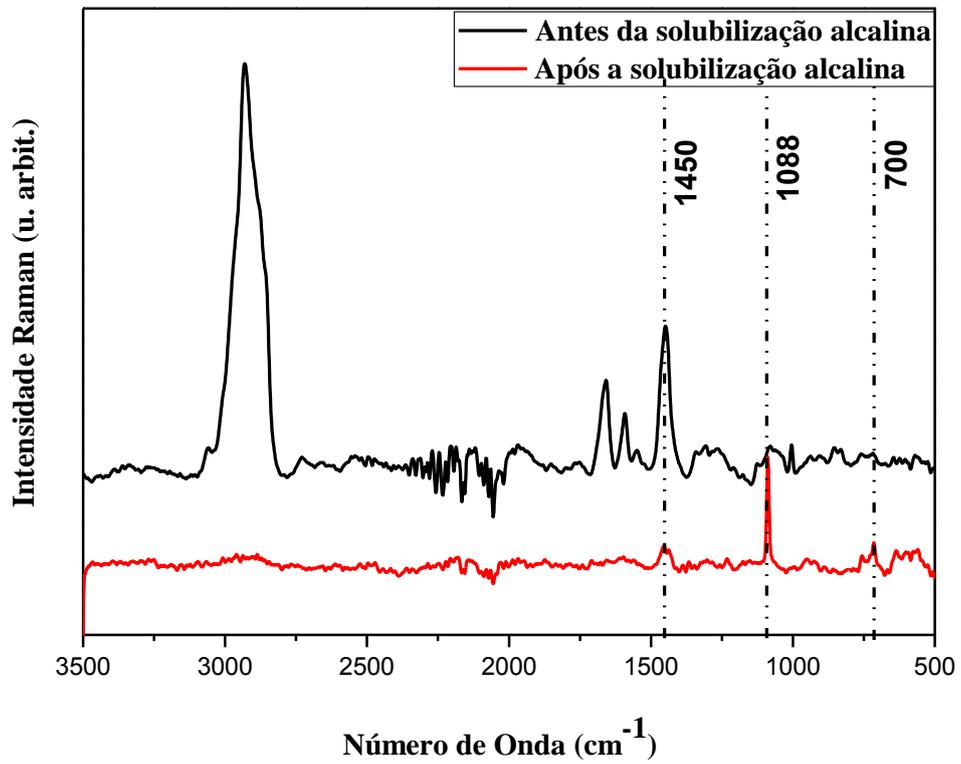
Fonte: Autoria Própria

Figura 16-Espectros FT-Raman obtidos para moela de frango antes e após a solubilização alcalina



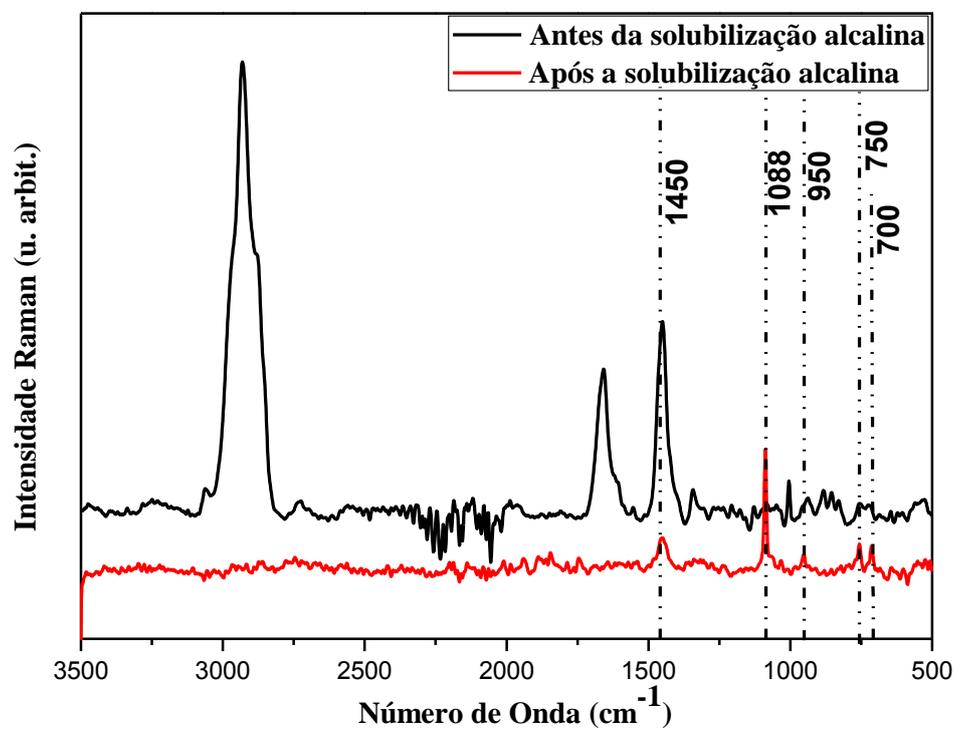
Fonte: Autoria Própria

Figura 17-Espectros FT-Raman obtidos para coxa de frango antes e após a solubilização alcalina



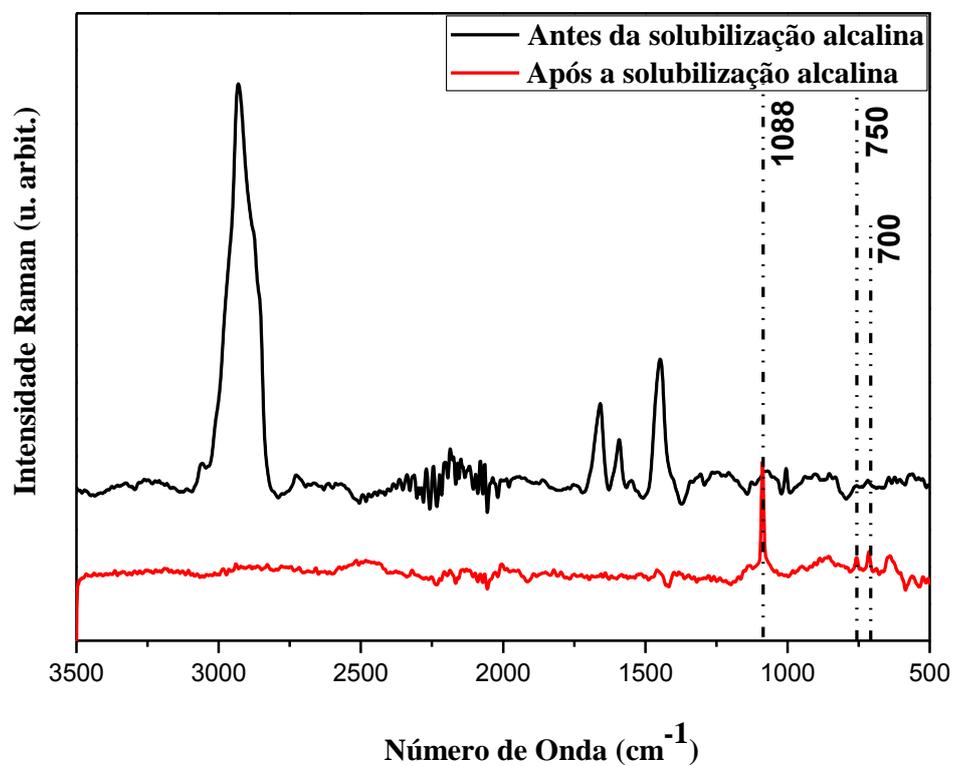
Fonte: Autoria Própria

Figura 18-Espectros FT-Raman obtidos para peito de frango antes e após a solubilização alcalina



Fonte: Autoria Própria

Figura 19-Espectros FT-Raman obtidos para sobrecoxa de frango antes e após a solubilização alcalina



Fonte: Autoria Própria

Tabela 19- Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados para os cortes de frango antes e após a solubilização alcalina
(ν = estiramento; ν_{ass} = estiramento anti-simétrico; ν_{sym} = estiramento simétrico; δ = torção)

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuição Tentativa	Componente
3040	ν (C-H)	Proteínas/ Carboidratos
2987	ν_{ass} (CH_3)	Lipídios
2935	ν_{ass} (CH_2)	Proteínas/ Carboidratos
2896	ν_{sym} (CH_3)	Proteínas/ Carboidratos
2853	ν_{sym} (CH_2)	Lipídios
2721	ν (C-H)	Proteínas/ Carboidratos/Lipídios
1744	ν (C=O)	Fosfolipídios
1660	ν_{ass} (C=O) Amida I	Proteínas
1612	ν (C=C)	Tirosina e Triptofano
1544	Amida II	Proteínas
1448	δ (CH_2)	Proteínas/ Lipídios
1342	δ (C-H)	Proteínas/ Carboidratos/Lipídios
1307	δ (CH_2) Amida III	Proteínas
1088	ν (C-C)	Proteínas/ Carboidratos/Lipídios
1000	δ (anel)	Fenilalanina
950	ν_{ass} (C-N)	TMAH
880	δ (anel)	Triptofano
756	ν_{sym} (C-N)	TMAH
700	ν (C-S)	Aminoácidos

Fonte: Autoria Própria

Analisando todos os espectros, conclui-se que o reagente alcalino TMAH parece apresentar um mecanismo de atuação diferente para cortes de músculo e vísceras.

Comparando os espectros das amostras de vísceras, antes e após o tratamento alcalino, observa-se que o reagente alcalino parece atuar na solubilização seguindo um mecanismo similar para os três cortes investigados. Para as amostras de coração e

moela, observa-se que após a solubilização não foram observadas bandas vibracionais relacionados à aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas, principalmente nas regiões $3500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, $1750\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e $1400\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$. Entretanto, para a amostra de fígado, observa-se apenas uma diminuição de intensidade das bandas nas regiões de 3040 , 2987 e 2935 cm^{-1} , relacionadas à carboidratos, lipídios e proteínas (MOVASAGHI *et al*, 2007). Nota-se ainda uma intensa diminuição de intensidade da banda localizada na região de 1450 cm^{-1} atribuída à torção do grupo CH_2 relacionada à modos vibracionais de carboidratos, lipídios e proteínas (MOVASAGHI *et al*, 2007; CAMPOS *et al*, 2014). Estas alterações espectrais indicam que o TMAH[®] atua na decomposição parcial desses compostos.

Duas bandas, nas regiões de 750 e 950 cm^{-1} , também são observadas nos espectros das amostras após a solubilização e são atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-N, respectivamente, (MICHAUD *et al*, 1998), de resíduos do reagente TMAH[®]. Estes modos vibracionais foram observados nos espectros dos demais cortes de frango após a solubilização, exceto a banda 950 cm^{-1} para coxa e sobrecoxa, indicando que a liofilização não eliminou totalmente este solvente (TMAH[®]) dos extratos.

Para os cortes de músculo, comparando os modos vibracionais observados antes e após a solubilização alcalina, conclui-se que o reagente atua mais vigorosamente na solubilização de aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas, visto que a maioria dos modos vibracionais relacionados à estes compostos não são observados nos espectros após o tratamento, quando comparado ao seu mecanismo para as vísceras. Para as amostras de peito e coxa, observa-se ainda uma redução de intensidade da banda na região de 1450 cm^{-1} atribuída à torção do grupo CH_2 relacionada à modos vibracionais de carboidratos, proteínas e lipídios; este modo vibracional não é observado no espectro da amostra de sobrecoxa após a solubilização. Para os três cortes, a banda em 700 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-S de aminoácidos também aparece após a solubilização com maior definição (MOVASAGHI *et al*, 2007).

Todos os espectros dos cortes de frango, após a solubilização, apresentam uma banda na região de 1088 cm^{-1} atribuído ao estiramento C-C. Este modo vibracional apresenta maior intensidade nos espectros após o tratamento. Este fato pode indicar que antes do tratamento houve uma sobreposição de modos vibracionais levando à uma baixa relação sinal/ruído do modo e, após a solubilização de grande parte da matriz da amostra, esta relação aumentou e a banda pôde ser visualizada com mais clareza.

Estudos anteriormente citados neste trabalho indicam que o TMAH[®] atua principalmente na solubilização de amostras com elevado teor de proteínas. As diferenças observadas nos perfis dos espectros das amostras de frango, antes e após o tratamento alcalino, indicam que este reagente também pode atuar na decomposição de compostos como aminoácidos, carboidratos e lipídios, mas de maneira parcial, visto que algumas bandas vibracionais características destes compostos ainda são observadas após o tratamento. Isto indica que este reagente pode atuar na extração de metais ligados preferencialmente à estes componentes.

6 CONCLUSÕES

Demonstrou-se neste trabalho o potencial da solubilização alcalina para o preparo de amostras de partes comestíveis de frango em relação ao tratamento tradicional (digestão total). O método empregando TMAH foi otimizado multivariadamente e as figuras de mérito avaliadas comprovam a aplicabilidade deste com boa eficiência e adequação a análises de rotina de vísceras de frango, visto que é possível preparar amostras em batelada com mínima manipulação, reduzindo as chances de contaminação. Todas as amostras avaliadas neste trabalho apresentaram teores de Pb abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira e internacional.

Além disso, otimizou-se um método de digestão total utilizando ácidos diluídos que se mostrou aplicável para a determinação dos dois analitos de interesse com boas exatidão e precisão. Quanto ao micronutriente estudado, Fe, observou-se que as vísceras apresentam um teor total deste em quantidade bem superior do que as porções de músculo e isto foi observado tanto nas amostras cruas quanto nas amostras cozidas.

Demostrou-se também que, nas condições estudadas, o tubo de grafite convencional pode substituir, sem perda de desempenho analítico, o tubo de grafite revestido piroliticamente, que é mais caro. Isso favorece o uso do método desenvolvido para análises de rotina, como as análises regulatórias preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por exemplo.

Um procedimento para determinação dos teores bioacessíveis de ferro em carne de frango foi desenvolvido e aplicado para duas amostras, fígado e peito, cozidos em panela de ferro utilizando calor úmido. Uma otimização multivariada deste ensaio permitiu estabelecer as variáveis que afetaram, *in vitro*, o teor bioacessível deste micronutriente. Estas variáveis foram massa de amostra e sua combinação com a concentração de pepsina. Com essa avaliação estabeleceu-se um método robusto e exato para esta finalidade. Após a aplicação do método, obteve-se a fração bioacessível para fígado e peito de 56 e 23 %, respectivamente, evidenciando que o fígado é realmente uma excelente fonte de ferro.

Por fim, verificou-se o potencial da Espectroscopia Raman como ferramenta de monitoramento do preparo das amostras envolvendo a solubilização alcalina, visto que foi possível diferenciar as amostras “in natura” das amostras tratadas com base em mudanças de modos vibracionais de macronutrientes. Os estudos mencionados neste trabalho indicam que o TMAH[®] atua como um agente solubilizante de proteínas e, os

resultados gerados neste estudo, indicam que o mesmo pode, ainda, solubilizar compostos como aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas. Esses resultados comprovaram que a solubilização com TMAH[®] é parcial para as amostras de tecido de frango, atuando também como um extrator para as espécies possivelmente associadas a estes compostos.

REFERÊNCIAS

ACAR, O. Determination of cadmium and lead in biological samples by Zeeman ETAAS using various chemical modifiers. **Talanta**, 55, 613-622, 2001.

ALMEIDA, M.R. **Avaliação da Qualidade e Variedade de Leite em Pó e Leite Condensado por Espectroscopia Raman e Análise Multivariada**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

ALMEIDA, M.R.; OLIVEIRA, K.S.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L.F.C. Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination of Adulteration in Milk Powder. **Analytical Letters**, 45, 2589-2602, 2012.

ARAÚJO, G.C.L.; GONZALEZ, M.H., FERREIRA, A.G.; NOGUEIRA, A.R.A.; NOBREGA, J.A. Effect of acid concentration on closed vessel microwave-assisted acid digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta B**, 57, 2121-2132, 2002.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), **Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura**, 2015, *Disponível em* <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>, acesso em 09 de agosto de 2015.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

BASS, D.A.; HOLCOMBE, J.A. Mass Spectral Investigation of Mechanisms of Lead Vaporization from a Graphite Surface Used in Electrothermal Atomizers. **Analytical Chemistry**, 59, 974-980, 1987.

BERGHOF, **Relatório de aplicação**, V80-S1/1, 2013.

BETTELHEIM, F.A.; BROWN, W.H.; CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Introdução à Bioquímica**. 9ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2012.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 965-977, 2008.

BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 42, 94-100, 1992.

BORGES, D.L.G.; CURTIUS, A.J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, 18, 58-67, 2005.

BORTOLINI, G. A.; FISBERG, M. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 32, 05-113, 2010.

BRASIL, Resolução RDC No-269, de 22 de setembro de 2005, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de agosto, 2005.

BRASIL, Resolução RDC No-42, de 29 de agosto de 2013, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de agosto, 2013.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 13, 129-146, 2003.

CÂMARA, F.; AMARO, M.A.; BARBERÁ, R.; CLEMENTE, G. Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. **Food Chemistry**, 92, 481-489, 2005.

CAMPOS, N.S.; OLIVEIRA, K.S.; ALMEIDA, M.R.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L.F.C. Classification of Frankfurters by Raman spectroscopy and chemometric methods. **Molecules**, 19, 18980-18992, 2014.

CASTRO, J.T.; SANTOS, E.C.; SANTOS, W.P.C.; COSTA, L.M.; KORN, M.; NOBREGA, J.A.; KORN, M.G.A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, 78, 1378-1382, 2009.

CORREIA, P.R.M.; NOMURA, C.S.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica Multielementar: Desafios e Perspectivas. **Revista Analytica**, 5, 52-59, 2003.

De CAPITANI, E.M. Metabolismo e toxicidade do chumbo na criança e no adulto. **Medicina**, 42, 3, 278-286, 2009.

DEMIRBAS, A. Proximate and heavy metal composition in chicken meat and tissues. **Food Chemistry**, 67, 27-31, 1999.

DOGANOC, D.Z. Distribution of lead, cadmium, and zinc in tissues of hens and chickens from Slovenia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 57, 932-937, 1996.

FANTINI, A.P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SOUZA, M.C.; MANSI, D.N. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, 435-439, 2008.

GERBER, N.; SCHEEDER, M.R.L.; WENK, C. The influence of cooking and fat trimming on the actual nutrient intake from meat. **Meat Science**, 81, 148-154, 2009.

GERMANO, R.M.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Importância do ferro em nutrição humana. **Journal of Brazilian Society for Food and Nutrition**, 24, 85-104, 2002.

GONÇALVES, R.M.; GONÇALVES, J.R.; GONÇALVES, R.M.; OLIVEIRA, R.R.; OLIVEIRA, R.A.; LAGE, M.E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados

em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, 10, 553-559, 2009.

GONZALEZ, M.H.; SOUZA, G.B.; OLIVEIRA, R.V.; FORATO, L.A.; NOBREGA, J.A., NOGUEIRA, A.R.A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, 79, 396-401, 2009.

GOODACRE, R.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E. Progress toward the Rapid Nondestructive Assessment of the Floral Origin of European Honey Using Dispersive Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, 56, 521-527, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011.

HARRIS, D.; **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora S.A., 2005.

HASSEL, D.C.; MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J.A. Temperature Programmed Static Secondary Ion Mass Spectrometric Study of Phosphate Chemical Modifiers in Electrothermal Atomizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 6, 105-108, 1991.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. *In Vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, 125, 1-12, 2011.

HUSSEIN, H.K.; ABU-ZINADAH, O.A.; EL RABEY, H.A.S.; MEERASAHIB, M.F. Environmental assessment of ground water pollution by heavy metals and bioaccumulation of mercury residues in chicken tissues. **African Journal of Biotechnology**, 10, 16089-16100, 2011

JOHNSON, L.R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

Joint FAO, WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission, **Recommended Methods for Analysis and Sampling**, CODEX STAN 234, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9ª ed. Rio de Janeiro :Editora Guanabara Koogan, 2012.

KRUG, F.J. **Fundamentos Sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar**. 1ªed. Piracicaba: Editora CENA/USP, 2010.

KUMAR, P.; PRASAD, Y.; PATRA, A.K.; SWARUP, D.B. Levels of cadmium and lead in tissues of freshwater fish (*Clarias bratachus L.*) and chicken in Western UP (India) **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 79, 396-400, 2007.

KURNAZ, E.; FILAZI, A. Determination of metal levels in the muscle tissue and livers of chickens. **Frenesius Environmental Bulletin**, 20, 2896-2901, 2011.

LEME, A.B.P. **Avaliação da fração bioacessível e biodisponível de nutrientes e contaminantes em cortes de carne bovina.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

LOPEZ-DIEZ, E.C.; BIANCHI, G.; GOODACRE, G. Rapid Quantitative Assessment of the Adulteration of Virgin Olive Oils with Hazelnut Oils Using Raman Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 6145–6150, 2003.

LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.H.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FROHLICH, W. Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 72, 415-424, 1996.

MACÊDO, J.A.B. **Química Ambiental-Uma ciência ao alcance de todos.** Belo Horizonte: Editora CRQ-MG, 2002.

MANAHAN, S.E. **Environmental Chemistry.** 7^a ed. Londres: Lewis Publishers, 1993.

MENEZES, E. A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de carnes bovinas, suínas e frango in natura e processamento termicamente.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MICHAUD, P.T.; BABIC, D. A Raman Study of Etching Silicon in Aqueous Tetramethylammonium Hydroxide. **Journal of the Electrochemical Society**, 145, 4040-4043, 1998.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; CAMPEN, D. V. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 34, 2248-2256, 1981.

MOVASAGUI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, 42, 493–541, 2007.

MURTHY, L.; MENDEN, E.E.; ELLER, P.M.; PETERING, H.G. Atomic absorption determination of zinc, copper, cadmium, and lead in tissues solubilized by aqueous tetramethylammonium hydroxide. **Analytical Biochemistry**, 53, 365–372, 1973.

NARDI, E.P.; EVANGELISTA, F.S.; TORMEN, L.; SAINT'PIERRE, T.D.; CURTIUS, A.J.; SOUSA, S.; BARBOSA Jr. F. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, 112, 727-732, 2009.

NÓBREGA, J.A.; PIROLA, C.; FIALHO, L.L.; ROTA, G.; DE CAMPOS JORDÃO, C.E.K.M.A.; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, 98, 272-276, 2012.

NÓBREGA, J.A.; SANTOS, M.C.; SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media **Spectrochimica Acta Part B**, 61,465–495, 2006.

OLIVIO, N. **Mercado Mundial de Carnes**. Criciúma: Editora Varela, 2008.

PANTUZZO, F. L.; SILVA, J. C. J.; CIMINELLI, V. S. T. A fast and accurate microwave-assisted digestion method for arsenic determination in complex mining residues by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, 168, 1636-1638, 2009.

PARK, J.; BRITTIN, H.C. Iron content, sensory evaluation, and consumer acceptance of food cooked in iron utensils. **Journal of Food Quality**, 23, 2, 205-215, 2000.

PHILIPPI, S.T. **Nutrição e Técnica Dietética**. Barueri: Editora Manole, 2003.

PURCHÁS, R.W.; BUSBOOM, J.R.; WILKINSON, B.H.P. Changes in the forms of iron and in concentrations of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine in beef longissimus muscle with cooking and simulated stomach and duodenal digestion. **Meat Science**, 74, 443-449, 2006.

QUINTAES, K.D.; AMAYA-FARFAN, J.; TOMAZINI, F.M.; MORGANO, M.A.; MANTOVANI, D.M.B. Migração de minerais de panelas brasileiras de aço inoxidável, ferro-fundido e pedra-sabão (esteatito) para simulantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24, 3, 397-402, 2004.

RAMOS, A.; CABRERA, M.C.; SAADOUN, A. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn, Fe and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Bradford steers fed pasture. **Meat Science**, 91, 116-124, 2012.

REGULAMENTO CE 1881, **Jornal Oficial da União Europeia**, 2006.

REID, L.M.; O'DONNELL, C.P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Science and Technology**, 17, 344-353, 2006.

RESOLUÇÃO GMC MERCOSUL n. °12, 2011.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas: Editora Cárita, 2009.

ROSA, F.C.; BRESSAN, M.C.; BERTECHINI, A.G.; FASSANI, E.J.; VIEIRA, J.O.; FARIA, P.B.; SAVIANI, T.V. Efeito dos métodos de cocção sobre a composição química e colesterol em peito e coxa de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, 30, 4, 707-714, 2006.

SCHIFER, T.S.; JUNIOR, S.B.; MONTANO, M.A.E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Infarma**, 17, 5-6, 2005.

SLAVIN, W. **Graphite Furnace AAS, a source book**, Perkin-Elmer, 1984.

SLAVIN, W.; MANNING, D.C.; CARNRICK, G.R. The stabilized temperature platform furnace. **Atomic Spectroscopy**, 2, 137-145, 1981.

SOUSA, R.A.; SABARENSE, C.M.; PRADO, G.L.P.; METZE, K.; CADORE, S. Lead biomonitoring in different organs of lead intoxicated rats employing GF AAS and different sample preparations. **Talanta**, 104, 90-96, 2013.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 4ª Edição, Núcleo de pesquisas e Estudos em Alimentação: UNICAMP, 2011.

TAHVONEN, R.; KUMPULAINEN, J. Lead and Cadmium contents in pork, beef and chicken and in pig and cow liver in Finland during 1991. **Food Additives and Contaminants**, 11, 415-426, 1994.

TAN, Y.; MARSHALL, W.D.; BLAIS, J.S. Slurry preparation by high-pressure homogenization for cadmium, copper and lead determination in cervine liver and kidney by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, 121, 483-488, 1996.

TEIXEIRAS, M. B. **Avaliação e especiação do ferro bioacessível em alimentos**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

TOGNON, A.L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

VOLINSKY, A.B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, 58, 905-921, 2003.

WELZ, B. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3ª ed. New York: Editora Wiley-VCH, 1999.

WENDL, W; MULLER-VOGT, G. Chemical Reactions of Lead in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 3, 63-66, 1998.

World Health Organization; **Summary of Toxicological data of certain food additives and contaminants**, WHO: Roma, 1978.

YILMAZ, I.; GECGEL, U. Some heavy metal contents of chicken meat, liver, heart, veal liver and lamb kidney sold in Tekirdag, Turkey. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, 12, 437-446, 2011.

ZHUANG, P.; ZOU, H.L.; SHU, W.S. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study. **Journal of Environmental Sciences China**, 21, 849-853, 2009.

ZRALY, Z.; PISARIKOVA, B.; TRCKOVA, M.; NAVRATILOVA, M. Effect of Humic Acids on Lead Accumulation in Chicken Organs and Muscles. **Acta Veterinaria Brno**, 77, 439-445, 2008.

ANEXO I - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1) Disciplinas cursadas

Métodos Espectroanalíticos

Química Analítica Avançada

Métodos de Separação

2) Participação em eventos

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2015.

IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, Juiz de Fora, 2015.

3) Trabalhos apresentados

CAMPOS, N.S.; OLIVEIRA, M.A.L.; SOUSA, R.A. Otimização da solubilização alcalina de amostras biológicas para a determinação de Pb por GF AAS. 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2015.

CAMPOS, N.S.; IZUMI, C.M.S.; SOUSA, R.A. Espectroscopia Raman e a solubilização alcalina de tecidos biológicos: avaliação do processo. IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2015.

4) Produção Bibliográfica

CAMPOS, N.S.; OLIVEIRA, K.S.; ALMEIDA, M.R.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L.F.C. Classification of Frankfurters by Raman spectroscopy and chemometric methods. **Molecules**, 19, 18980-18992, 2014.

CAMPOS, NÁIRA S.; STEPHANI, RODRIGO; SOUSA, RAFAEL A. DE; PERRONE, ÍTALO T.; CARVALHO, ANTÔNIO F. DE; OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. DE. Lactose Quantification in Dairy Products by Accu Chek Glucometer. **Revista Virtual de Química**, 6, 1677-1686, 2014.

CAMPOS, N. S.; OLIVEIRA, K. S.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia Raman e Quimiometria - Emergentes ferramentas analíticas para produtos cárneos. Anuário. **Revista Nacional da Carne**, 108 - 114, 2014.

SOUSA, RAFAEL A. DE; CAMPOS, NÁIRA; ORLANDO, R. Preparação de amostras para análise elementar. 2015. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Apostila). Disponível em <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/07/Apostila-PREPARO-DE-AMOSTRAS-Analitica-Avancada.pdf>