

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Thalles Pedrosa Lisboa

**Determinação de Micronutrientes Minerais em Amostras de Suplemento Alimentar por
Espectrometria de Absorção Atômica**

Juiz de Fora
2016

Thalles Pedrosa Lisboa

**Determinação de Micronutrientes Minerais em Amostras de Suplemento Alimentar por
Espectrometria de Absorção Atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

**Juiz de Fora
2016**

Thalles Pedrosa Lisboa

**Determinação de Micronutrientes Minerais em Amostras de Suplemento Alimentar por
Espectrometria de Absorção Atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Aprovada em 28 de julho de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Arromba de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Renato Moreira Nunes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Fábio Grandis Lepri
Universidade Federal Fluminense

Dedico este trabalho à minha família e aos meus queridos amigos. Dedico a todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na execução do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar oportunidades como esta e colocar pessoas importantes em minha vida.

Agradeço à minha mãe Rônia, meu pai Mauri, minha irmã Maria Eduarda e minha quase noiva Beatriz pelos momentos de compreensão e apoio durante esta jornada.

Agradeço ao professor Rafael Arromba de Sousa, pela oportunidade em dar continuidade aos trabalhos iniciados durante o período de graduação, pela amizade e todo apoio, conselhos e orientação nesses mais de dois anos de convívio.

Agradeço aos amigos do Grupo Baccan: Aparecida, Náira, Antonio, Ângela, Paola, Felipe e Joseane, pelos dias de convívio e pela troca de conhecimento.

Agradeço aos amigos do NUPIS: Gustavo, Roberto, Lucas, Fernanda, Raiane, Fausto, Guilherme e Taimara, pelos vários momentos de descontração e é claro por todo o café que bebi.

Agradeço aos amigos do GQAQ por toda colaboração e esforço no desenvolvimento de trabalhos significativos.

Agradeço aos professores Júlio, Lilian, Marcone e Denise, pelo convívio em laboratório e pelo compartilhamento do conhecimento durante a realização das disciplinas do programa de pós-graduação.

Agradeço à técnica de laboratório Bárbara por todas as vidrarias emprestadas e por auxiliar com a utilização do Fotômetro.

Agradeço à professora Charlane por todas as medidas realizadas no DRX e o auxílio na interpretação dos dados.

Agradeço ao Fábio Silva da Agilent pela contribuição e parceria para análise de algumas amostras por ICP-MS.

Agradeço ao Marcelo Biolcati e à Votorantim Metais de Juiz de Fora por auxiliar nas análises preliminares do projeto.

A todos os funcionários, em especial a senhora Isabel que sempre demonstrou muito carinho e zelo na limpeza do laboratório.

Um agradecimento também aos grandes amigos Karol e Gabriel, que contribuíram muito com a obtenção das amostras para realização do trabalho.

Agradeço em especial aos amigos Gustavo e Lucas por toda ajuda e contribuição com este trabalho.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para minha formação profissional e pessoal, o meu: Muito Obrigado!

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

(Issac Newton)

RESUMO

Neste trabalho foi otimizado um procedimento de preparo de amostras com digestão ácida em forno de micro-ondas para a determinação do elemento mineral cromo por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) em amostras de suplemento alimentar do tipo *whey protein*, hipercalórico e *protein bar*. Os parâmetros instrumentais relativos à determinação de Cr por GF AAS foram otimizados, sendo selecionada a temperatura de pirólise de 1100 °C para a análise das amostras de *whey protein* e hipercalórico e 1050 °C para a análise das amostras de *protein bar*. Já a temperatura de atomização foi fixada em 2300 °C para todas as amostras. Os valores de concentração de cromo, nas amostras, foram obtidos através de curva de calibração externa validada através da análise de variância e variaram de 0,403 a 0,647 µg/g para amostras de *protein bar*, 0,266 a 0,442 µg/g para amostras de hipercalórico e 0,224 a 1,04 µg/g para amostras de *whey protein*. Foi observada ainda a presença de cromo em amostras sem informações nutricionais rotuladas a respeito de enriquecimento dos suplementos com este micronutriente e, em alguns casos, em concentrações superiores ao indicado como dose diária recomendada para adultos, que é de 35 µg. A difração de raios X de pó (DRX) foi utilizada como ferramenta analítica para avaliação do estado de oxidação do cromo nas amostras de suplemento alimentar. Nos resultados obtidos foi verificada a presença de picos de difração característicos do Cr⁺³, sob a forma de picolinato de cromo, para os três tipos de amostras e a presença picos de difração característicos para o Cr⁺⁶, sob a forma de trióxido de cromo (VI), para as amostras de *whey protein* e hipercalórico. As determinações de sódio e potássio foram realizadas através do método de adição de padrão empregando como técnica analítica a espectrometria de emissão atômica em chama (F AES). As concentrações de Na variaram na faixa de 1,4 a 5,4 mg/g, 0,3 a 3,5 mg/g e 0,4 a 8,8 mg/g, enquanto que as concentrações de K variaram na faixa de 1,5 a 18,2 mg/g, 0,5 a 6,5 mg/g e 3,3 a 33,7 mg/g para as amostras de *protein bar*, hipercalórico e *whey protein*, respectivamente. Além disso, os resultados obtidos por F AES permitiram o cálculo da razão Na/K para as amostras de suplementos e pode-se considerá-las adequadas de acordo com as recomendações da OMS (Na/K ≤ 1). Finalmente, por meio de ensaios interlaboratoriais promoveu-se a comparação estatística dos resultados obtidos pelos métodos desenvolvidos com resultados obtidos por ICP-MS, garantindo a confiabilidade dos dados aqui apresentados.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. *Whey Protein*. Hipercalórico. *Protein Bar*.
Micronutrientes minerais. Absorção atômica. Difração de raios X. Cromo. Sódio.
Potássio.

ABSTRACT

In this work, a sample preparation procedure with acid digestion in a microwave oven has been optimized for the determination of chromium by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) in three types of food supplement samples: whey protein, hypercaloric and protein bar. The instrumental parameters for the determination of Cr by GF AAS have been optimized by setting the temperature pyrolysis at 1100 °C for the analysis of samples of whey protein and hypercaloric and 1050 °C for the analysis of samples of protein bar, the atomization temperature was set at 2300 °C for all samples. The chromium concentration values were obtained by external calibration curve, validated through variance analysis, and ranged from 0.403 to 0.647 µg/g for protein bar samples, from 0.266 to 0.442 µg/g for hypercaloric samples and from 0.224 to 1.04 µg/g for whey protein samples. It was also observed the presence of chromium in samples without nutritional information related to chromium enrichment, in which some concentrations were above the one stated as the recommended daily dose for adults (35 µg). The X-ray diffraction (XRD) was used as a chemical tool to evaluate the chromium oxidation state in the food supplement samples. The results showed the presence of characteristic diffraction peaks of Cr⁺³ in the form of chromium picolinate to the three types of samples and the presence of diffraction peaks characteristic to Cr⁺⁶ in the form of chromium trioxide (VI), for samples of whey protein and hypercaloric. Sodium and potassium determinations were performed by flame atomic emission spectrometry (F AES). For the analytes quantification it was used the standard addition method. The sodium concentrations varied in the range of 1.4 to 5.4 mg/g, 0.3 to 3.5 mg/g and 0.4 to 8.8 mg/g, while the potassium concentrations varied in the range of 1.5 to 18.2 mg/g 0.5 to 6.5 mg/g and 3.3 to 33.7 mg/g for the samples of protein bar, hypercaloric and whey protein, respectively. Besides, these results obtained by F AES allowed the calculation of the Na/K ratios for the supplement samples. The values obtained (≤ 1) suggest they can be considered appropriate according to WHO recommendations. Finally, through an inter-laboratory tests the results obtained by ICP-MS, showing a good agreement at a 95% confidence level. It ensured the reliability of the presented data and conclusion.

Key-words: Food supplement. Whey Protein. Hypercaloric. Protein Bar. Mineral micronutrients. Atomic Absorption. X-ray Diffraction. Chromium. Sodium. Potassium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática de um sistema cristalino, onde raios X incidem formando um ângulo θ com os planos cristalinos.....25
- Figura 2 – Pré-tratamento das amostras de *protein bar*. (a) Antes do processo de trituração; (b) Após o processo de trituração; (c) Após a etapa de secagem; e, (d) Amostras maceradas e prontas para acondicionamento.....28
- Figura 3 – Programação e execução do programa de aquecimento empregado para digestão de suplementos alimentares no forno micro-ondas.....37
- Figura 4 – Sinais de absorção para: (a) hipercalórico obtido à temperatura de 1100°C; (b) *protein bar* obtido à temperatura de 1050°C; e (c) *whey protein* obtido à temperatura de 1100°C.....41
- Figura 5 – Sinais de absorção para: (a) hipercalórico; (b) *protein bar*; e (c) *whey protein*; obtidos à temperatura de atomização de 2300°C.....41
- Figura 6 – (a) Tubo de grafite com revestimento pirolítico após aproximadamente 1200 queimas; (b) Fotomicrografia com ampliação de 240 x da região de injeção de amostra no tubo de grafite.....43
- Figura 7 – Difratomogramas da amostra *mix* de *whey protein*, CrO₃, picolinato de cromo e lactose.....54
- Figura 8 – Difratomogramas da amostra *mix* de hipercalórico, CrO₃, picolinato de cromo e lactose.....55
- Figura 9 – Difratomogramas da amostra *mix* de *protein bar*, CrO₃, picolinato de cromo e lactose.....56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Curvas de pirólise e atomização para a determinação do cromo em amostras de hipercalórico, *protein bar* e *whey protein*.....40
- Gráfico 2 – Curvas analíticas para determinação de Cr em amostras de: (a) *protein bar*; (b) *whey protein* e hipercalórico.....44
- Gráfico 3 – Curvas analíticas utilizadas para determinação de sódio e potássio em amostras de suplementos alimentares por fotometria de chama.....58
- Gráfico 4 – Curva por adição de padrão para amostra: (a) H-2; (b) PB-4; e, (c) WP-2...60
- Gráfico 5 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de hipercalórico.....81
- Gráfico 6 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de *whey protein*.....82
- Gráfico 7 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de *protein bar*.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão de amostras de proteína em pó.....	30
Tabela 2 – Resultados preliminares, por ICP OES, da determinação de contaminantes e constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.....	34
Tabela 3 – Programas de aquecimento para determinação de cromo por GF AAS.....	35
Tabela 4 – Valores de absorvância média do cromo para os métodos testados de digestão assistida por radiação micro-ondas.....	36
Tabela 5 – Absorvância médias das amostras com e sem utilização de $Mg(NO_3)_2$	38
Tabela 6 – Programas de aquecimento para determinação de cromo por GF AAS.....	42
Tabela 7 – Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas apresentadas no Gráfico 2.....	45
Tabela 8 – Resultados de recuperação de cromo em amostras de suplementos alimentares.....	46
Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método e instrumentais obtidos para determinação de cromo em suplementos alimentares.....	47
Tabela 10 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo <i>Whey Protein</i>	49
Tabela 11 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo Hiperclórico.....	50
Tabela 12 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo <i>Protein Bar</i>	51

Tabela 13 – Comparação entre os valores de concentração de cromo obtidos por GF AAS e ICP-MS.....	52
Tabela 14 – Limites de detecção e quantificação do método e instrumentais obtidos para determinação de sódio e potássio em suplementos alimentares.....	61
Tabela 15 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo <i>Whey Protein</i>	61
Tabela 16 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo Hipercalórico.....	63
Tabela 17 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo <i>Protein Bar</i>	64
Tabela 18 – Comparação entre os valores de concentração de sódio e potássio obtidos por fotometria de chama e ICP-MS.....	65
Tabela 19 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de <i>whey protein</i>	66
Tabela 20 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de hipercalórico.....	67
Tabela 21 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de <i>protein bar</i>	67
Tabela 22 – Planejamento experimental para determinação das temperaturas de pirólise e atomização de manganês em amostras de suplementos alimentares.....	79
Tabela 23 – Valores de absorvância integrada obtida para as amostras de suplementos alimentares após realização do planejamento de experimento.....	80

Tabela 24 – Equações das superfícies de resposta para otimização das condições instrumentais para determinação de manganês em amostras de suplemento alimentar e valores de F calculado para falta de ajuste e regressão.....	84
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IDR:	Ingestão Diária Recomendada
INMETRO:	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
OMS/WHO:	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</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>
F AES;	Espectrometria de emissão atômica em chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
ICP OES:	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS:	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
STPF:	Do inglês <i>Stabilized Temperature Platform Furnace</i>
XRD:	Difração de raios X, do inglês <i>X-ray Diffraction</i>
H:	Suplemento do tipo Hipercalórico
PB:	Suplemento do tipo <i>Protein Bar</i>
WP:	Suplemento do tipo <i>Whey Protein</i>
GLP:	Gás liquefeito de petróleo
GFT:	Fator de tolerância à glicose, do inglês <i>Glucose Tolerance Factor</i>
LD:	Limite de detecção
LQ:	Limite de quantificação
RSD:	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
ANOVA:	Análise de Variância

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	16
1.2.	CONTEXTO NUTRICIONAL.....	17
1.3.	PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE SUPLEMENTOS	21
1.4.	O EMPREGO DE TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA OS ANALITOS DE INTERESSE.....	22
1.5.	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	24
2.	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1.	AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E INFORMAÇÕES DECLARADAS NOS RÓTULOS	27
3.2.	PREPARO DE AMOSTRA.....	27
3.3.	DIGESTÃO EM CHAPA DE AQUECIMENTO	28
3.4.	ANÁLISES PRELIMINARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE	29
3.5.	DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	29
3.6.	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE	30
3.7.	MODIFICADOR QUÍMICO.....	31
3.8.	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM CHAMA... 31	
3.9.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	31
3.10.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA 32	
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1.	TESTES PRELIMINARES	33
4.2.	DIGESTÃO EM MICRO-ONDAS	35
4.3.	MODIFICADOR QUÍMICO.....	37

4.4.	PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO.....	38
4.5.	CURVAS ANALÍTICAS USANDAS EM GF AAS E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS MESMAS	43
4.6.	FIGURAS DE MÉRITO.....	46
4.7.	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.8.	COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL DAS CONCENTRAÇÕES DE CROMO EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTO ALIMENTAR	52
4.9.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES	53
4.10.	DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO	57
5.	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO 1. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS OTIMIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES	79
	ANEXO 2. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A tendência mundial pela procura do corpo perfeito ou ideal, ou para obter outros benefícios à estética, como o combate ao envelhecimento, é hoje uma realidade que atinge todas as faixas etárias e é independente do sexo ou classe social (GOMES, 2010). Um aumento significativo no consumo de suplementos alimentares tem sido observado nos últimos anos (BRIZIO *et al.*, 2013; MARRERO *et al.*, 2013) e segundo a Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais, ABENUTRI, o consumo de vitaminas e suplementos alimentares atingiu R\$ 3,5 bilhões em 2014, tornando o Brasil o quarto país em vendas (ABENUTRI, 2015).

Uma alimentação equilibrada e variada oferece todos os nutrientes que um indivíduo necessita para os processos fisiológicos e para o crescimento (GOSTON, 2008; GOMES, 2010), porém como resultado do ritmo de vida moderno ocorreram algumas mudanças nos hábitos alimentares, prejudicando a qualidade da alimentação. Com a redução de ingestão de uma dieta variada e equilibrada, muitas pessoas passaram a apresentar deficiências nutricionais (KREJČOVÁ *et al.*, 2012) e para atender a essa necessidade os suplementos surgiram há quatro décadas. Os suplementos foram projetados para auxiliar na redução de quaisquer deficiências possíveis ou existentes na dieta e também para otimizar a performance humana em quaisquer níveis (LINHARES & LIMA, 2006).

Suplementos alimentares definem-se então como produtos que pretendem completar a dieta e que contém um ou mais dos seguintes ingredientes: vitaminas, minerais, ervas ou outros componentes botânicos, aminoácidos, ou qualquer combinação destes ingredientes (F.D.A., 1994; MARRERO *et al.*, 2013); e, segundo a portaria nº 32 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, são alimentos que servem para completar a dieta diária de uma pessoa saudável, devendo conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) na porção diária recomendada pelo fabricante (BRASIL, 1998b), sendo que nos casos em que as doses indicadas pelo fabricante ultrapassam o limite de 100% da IDR estes são considerados medicamentos (BRASIL, 1998a).

Os suplementos utilizados por atletas com o intuito de melhorar o rendimento esportivo são considerados como substâncias ergogênicas, substâncias que supostamente

melhoram ou aumentam o rendimento esportivo (LINHARES & LIMA, 2006; GOSTON, 2008; ALVES & LIMA, 2009; GOMES, 2010). São formulados à base de macro e micronutrientes em diferentes proporções, tornando-os adequados para diferentes finalidades, dentre estes podem ser destacados: i) aqueles à base de proteína do soro do leite (conhecidos como “*Whey Protein*”) e que possuem alto valor nutricional, alto teor de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada, alto teor de cálcio e peptídeos bioativos (HARAGUCHI *et al.*, 2006); ii) os suplementos constituídos principalmente por carboidratos, como a maltodextrina; e, iii) os suplementos formulados com proteína e carboidratos (conhecidos como hipercalóricos). São encontrados em uma grande variedade de marcas e de preços, sendo que alguns desses produtos contêm substâncias com propriedades terapêuticas e que são proibidas para uso em alimentos, como hormônios e estimulantes, que não podem ser consumidas sem acompanhamento médico e que não passaram por avaliação de segurança. Muitos desses suplementos alimentares não estão regularizados junto à Anvisa e são comercializados ilegalmente (ANVISA, 2012), podendo colocar em risco a saúde de seus consumidores.

1.2. CONTEXTO NUTRICIONAL

De acordo com o CODEX Alimentarius (CODEX, 1999), no sentido de segurança alimentar, diversas substâncias químicas, dentre elas elementos minerais, devem ser periodicamente monitorados e controlados em produtos alimentares. Este monitoramento deve ser executado pelos fabricantes dos produtos (KREJČOVÁ *et al.*, 2006; ANVISA, 2013), mas os teores, caso encontrados, não precisam ser declarados nos rótulos exceto para o sódio que é obrigatório. Opcionalmente outros minerais, quando estiverem presentes em quantidade igual ou maior que 5% da IDR por porção indicada no rótulo, podem ser declarados. A Anvisa incentiva a dispor nos rótulos informações sobre cálcio e ferro desde que o produto apresente quantidade igual ou superior a 5% da IDR (ANVISA, 2005b). Além disso, as legislações do Mercosul (G.M.C., 1994) e da Comunidade Comum Europeia (C.C.E., 2007) estabelecem limites para alguns contaminantes inorgânicos em alimentos.

Nesse contexto, o fraco controle de qualidade já relatado em outros países, aumenta o risco de contaminação dos produtos por bactérias, fungos, metais e até mesmo elementos-traço potencialmente tóxicos (KORFALI *et al.*, 2013). Além de permitir que produtos de baixa qualidade sejam inseridos no mercado, como comprovado pelo

relatório do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (INMETRO, 2014), onde quinze (15) amostras de diferentes marcas de suplementos proteicos para atletas foram avaliadas em alguns testes, como por exemplo: quantidade de proteínas, teor de carboidratos, origem proteica; apenas uma marca foi considerada “conforme” de acordo com informações nutricionais rotuladas. Considerando ainda que alguns micronutrientes constituintes desses produtos quando ingeridos em excesso, podem apresentar caráter tóxico, como por exemplo o cromo, torna-se necessário monitorar os níveis dos microconstituintes dos suplementos alimentares a fim de se garantir a segurança dos consumidores.

Outro aspecto relacionado aos suplementos alimentares é que, geralmente, o consumo é realizado sem acompanhamento profissional adequado, combinado com outros produtos e, até mesmo, em doses excessivas (LINHARES & LIMA, 2006). Este consumo inadequado é devido principalmente às crenças dos consumidores de que estes produtos são naturais e, por isso, seguros e sem efeitos adversos (GARCÍA-RICO *et al.*, 2007). Porém, pouca ênfase é dada nos efeitos adversos da utilização de suplementos alimentares (LINHARES & LIMA, 2006), assim como não há comprovação científica de que tais produtos tem efeitos realmente benéficos, a não ser em situações de carência nutricional (ALVES & LIMA, 2009).

1.2.1. Cromo

O elemento químico cromo apresenta-se como mineral e, naturalmente, sob as formas trivalente (Cr^{3+}) e a forma hexavalente (Cr^{6+}) (PRIEGO-CAPOTE & LUQUE DE CASTRO, 2006). A primeira é considerada essencial a alguns processos metabólicos do organismo (HARO *et al.*, 2001; BERNER *et al.*, 2004; KRZYSIK *et al.*, 2008), e a segunda é definida como tóxica e um agente potencialmente carcinogênico (MALTEZ & CARASEK, 2005; HOSSEINI & BELADOR, 2009). O cromo está distribuído em diversos tipos de alimentos como: o levedo de cerveja, os cereais, a lagosta, mariscos e alguns vegetais (AZEVEDO & CHASIN, 2003; GOMES *et al.*, 2005; COZZOLINO, 2012), sendo a ingestão diária adequada e segura estimada entre 25 e 35 $\mu\text{g}/\text{dia}$ para mulheres e homens adultos, respectivamente (I.O.M., 2002; GOMES *et al.*, 2005). O cromo trivalente potencializa os efeitos da insulina, melhorando a tolerância à glicose (SCHWARZ & MERTZ, 1957; GOMES *et al.*, 2005) e sua deficiência é associada a doenças como diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, perturbações do sistema

nervoso, intolerância à glicose, aumento dos níveis de insulina, colesterol e triglicerídeos (HARO *et al.*, 2001; BERNER *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2005; KRZYSIK *et al.*, 2008).

O cromo é transportado no organismo pela transferrina até as células-alvo, onde ocorre uma mobilização de receptores de transferrina a partir de vesículas intracelulares para se fundirem com a membrana, sendo o complexo formado internalizado por endocitose (GOMES *et al.*, 2005). O pH ácido do espaço intravesicular promove a digestão deste complexo e a consequente liberação do cromo para o citosol, onde quatro íons se ligam à apocromodulina tornando-a ativa sob a forma de cromodulina. A cromodulina liga-se ao sítio ativo no receptor insulínico, completando a ativação do mesmo e amplificando o sinal da insulina, o que influencia no fator de tolerância à glicose (GTF) (SUN *et al.*, 2000; VINCENT, 2000; GOMES *et al.*, 2005).

O fator de tolerância à glicose (MERTZ & ROGINSKI, 1969) tem estimulado o desenvolvimento de suplementos de cromo (III) como: picolinato de cromo, nicotinato de cromo, citrato de cromo e complexos aminoácidos de cromo (PHAM *et al.*, 2014) e, com as crescentes campanhas de marketing envolvendo consumo de suplementos correlacionados ao bem estar e melhorias na saúde, diversos suplementos alimentares estão sendo formulados com este micronutriente mineral, presente principalmente na forma de picolinato de cromo, que é um complexo estável de cromo trivalente considerado seguro para utilização em suplementos alimentares (BERNER *et al.*, 2004) e que mostrou em estudo recente, melhoras nos níveis de glicose em pacientes com diabetes tipo 2 (SUKSOMBOON *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que o cromo disputa os sítios de absorção no intestino com outros metais como ferro, zinco, manganês, cobre, entre outros. O consumo de cromo está associado a uma diminuição da absorção de zinco, um micronutriente associado a mais de 300 processos metabólicos no organismo (MCDOWELL, 2003). Cromo, manganês e ferro utilizam também a mesma proteína transportadora, a transferrina, para sua distribuição pelo corpo, logo uma dieta desbalanceada pode influenciar não somente na deficiência de um micronutriente, mas também de outros micronutrientes, acarretando problemas de saúde (AZEVEDO & CHASIN, 2003; GOMES *et al.*, 2005).

O consumo excessivo de cromo tem sido associado ao desenvolvimento de algumas alterações fisiológicas como: a perda de peso, anemia, disfunções renais e insuficiência hepática, dermatites, insônia, déficit de humor e hipoglicemia (BUNNER & MCGINNIS; CERULLI *et al.*, 1998; FOWLER, 1998; VINCENT, 2003). Alguns estudos mostram ainda que o picolinato de cromo pode causar danos clastogênicos, ou seja,

clivagem dos cromossomos de células de ovário de *hamster* chineses (STEARNS *et al.*, 1995).

1.2.2. Sódio e Potássio

É também de importante relevância a determinação dos macronutrientes minerais sódio e potássio nos alimentos em geral e, principalmente, naqueles que são processados industrialmente. Embora essenciais, as proporções entre eles constitui uma preocupação atual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), cujas pesquisas demonstram que os níveis de sódio estão consideravelmente acima daqueles que seriam conceituados adequados para muitos de nossos produtos industrializados. A Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2013) sugere um consumo menor que 2 g de Na por dia, correspondente a aproximadamente 5 g cloreto de sódio (NaCl), sendo o consumo excessivo deste, um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento da hipertensão arterial (BRASIL, 2006; DU *et al.*, 2014). A hipertensão arterial é um problema de saúde pública, que atinge cerca de 20 % da população adulta brasileira e é um dos principais fatores de risco evitável para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (BISI MOLINA *et al.*, 2003; SANTOS, 2009; ZHANG *et al.*, 2013; XI *et al.*, 2015).

Concomitante com a sugestão de redução da ingestão de Na, a OMS (WHO, 2013) também sugere uma ingestão mínima de 3,5 g de K que tem sido reconhecido como um fator de proteção contra a hipertensão (DU *et al.*, 2014), porque induz aumento na perda de água e sódio pelo corpo tendo efeito protetor sobre a pressão arterial e as doenças cardiovasculares (ASCHERIO *et al.*, 1998; BISI MOLINA *et al.*, 2003; TOMAZONI & SIVIERO, 2009).

Embora os mecanismos exatos pelos quais os níveis de sódio e de potássio afetem a pressão sanguínea ainda não sejam bem compreendidos, evidências sugerem que a alteração de sódio e potássio desempenham um papel chave na patogênese da hipertensão (ZHANG *et al.*, 2013). Inúmeros estudos mostram os efeitos adversos na pressão arterial da ingestão excessiva de sódio (SANTOS, 2009) onde alguns resultados indicam que a ingestão de sódio é positivamente associada com a pressão arterial sistólica e hipertensão e que a ingestão de potássio é negativamente associada com ambos (ZHANG *et al.*, 2013). A ligação de dietas modernas, ricas em Na e pobres em K, com a patogênese da hipertensão é fortemente suportada pelo efeito da redução da pressão sanguínea com

dietas com composição catiônica inversa, ou seja, pobres em Na e ricas em K (ADROGUÉ & MADIAS, 2014).

Embora tem-se verificado uma redução no consumo de sódio em todo o mundo, os níveis consumidos são ainda consideravelmente altos e representam fatores de risco para hipertensão. Além disso, embora com o declínio no consumo do sódio o aumento de muitos outros fatores de risco, como por exemplo o consumo de álcool e sobrepeso, compensa essas pequenas reduções no consumo de sódio (DU *et al.*, 2014) de forma que recentemente dietas primitivas ricas em potássio, cálcio e magnésio vêm sendo associados com atenuação progressiva dos níveis pressóricos com a idade (BISI MOLINA *et al.*, 2003). Dessa forma, a razão Na/K tem associação com a hipertensão incidente mais forte que a ingestão de sódio ou de potássio isoladamente. Em razões Na/K altas o risco de hipertensão é maior que em razões menores (DU *et al.*, 2014) e segundo a OMS essa razão, em dietas saudáveis, deve permanecer ≤ 1 , o que também é consistente com outras recomendações internacionais, como a da Dietary Guidelines of Americans (ZHANG *et al.*, 2013).

1.3. PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE SUPLEMENTOS

Para a determinação do teor de minerais pelas técnicas de absorção ou emissão atômica, normalmente são utilizadas soluções de amostra, sendo necessária uma etapa prévia de dissolução ou decomposição da matriz e que, em alguns casos, pode permitir a separação e/ou pré-concentração dos analitos (OLIVEIRA, 2003). Geralmente o processo acontece com utilização de ácidos minerais (HNO_3 , H_2SO_4 , HCl , HClO_4 , HF) e sob aquecimento, seja em sistema aberto (chapas e blocos de aquecimento) ou em sistemas fechados (bombas de alta pressão, geralmente com aquecimento por micro-ondas) (IAL, 2008). Além disso, a etapa de preparo de amostra é de grande importância onde aproximadamente 60% do tempo total para realização da análise completa é requerido e é responsável por 30% do total de erros da análise. Portanto, os objetivos a serem atingidos na etapa do tratamento da amostra é proporcionar resultados analíticos com boa exatidão, no menor tempo, com mínima contaminação, baixo consumo de reagentes e mínima geração de resíduos (OLIVEIRA, 2003).

Tem-se observado em trabalhos atuais uma tendência na utilização de digestores do tipo micro-ondas em função de vantagens no emprego desta estratégia como, por exemplo, o curto período de tempo necessário para realizar a decomposição das amostras,

aquecimento direto de amostras e reagentes, contaminação mínima e sem perda de elementos voláteis, o que é possibilitado quando se emprega frascos fechados. Além disso, a utilização de métodos de digestão assistida por micro-ondas também é observada na literatura para a mineralização de amostras de suplementos alimentares (KREJČOVÁ *et al.*, 2006; KOVÁCS *et al.*, 2007; SORIANO *et al.*, 2007; AVULA *et al.*, 2010; MORET *et al.*, 2011; KREJČOVÁ *et al.*, 2012; BRIZIO *et al.*, 2013; KORFALI *et al.*, 2013; MARRERO *et al.*, 2013; KRAWCZYK, 2014).

Procedimentos de extração ácida também são relatados, principalmente como alternativa aos procedimentos de digestão convencionais (SORIANO *et al.*, 2007), assim como o emprego da análise direta de sólidos (KREJČOVÁ *et al.*, 2006; KRAWCZYK, 2014), visto que a amostragem em suspensão reduz o tempo de preparação da amostra e diminui a possibilidade de perdas de analito e contaminações (MILLER-IHLI, 1990).

1.4. O EMPREGO DE TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA OS ANALITOS DE INTERESSE

De acordo com o *CODEX Alimentarius*, métodos espectroanalíticos estão entre os recomendados para a determinação de nutrientes minerais em produtos alimentícios. As técnicas instrumentais indicadas pela literatura consistem principalmente na espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES); e, espectrometria de absorção atômica (AAS) com atomização por chama (F AAS) ou atomização eletrotérmica, geralmente utilizando forno de grafite (GF AAS) (CODEX, 1999). Dentre elas, estaca-se a primeira técnica, pois é altamente sensível e tende a minimizar muitos efeitos de matriz; porém sua utilização torna-se limitada diante dos elevados custos operacionais. Com isto, a espectrometria de absorção atômica é de grande aplicabilidade na determinação de metais considerando a facilidade de operação, rapidez e a confiabilidade dos resultados obtidos (EVANS *et al.*, 2013).

A GF AAS atualmente, encontra-se bem estabelecida e tem seu uso disseminado para determinação de elementos que ocorrem em baixas concentrações em amostras ambientais, biológicas e de alimentos. Os limites de detecção obtidos por GF AAS, ficam na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, estabelecendo-se entre os limites obtidos por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS), mais sensível, e ICP OES. A técnica baseia-se na introdução de um pequeno volume, na ordem de microlitros, no interior de um tubo de grafite, que é, então, aquecido, de tal forma que o solvente da amostra seja evaporado,

precursores atômicos sejam formados no estado sólido e, em seguida, ocorra a atomização do analito. Durante a atomização, a nuvem atômica produzida no interior do tubo é detectada e um sinal transiente, cuja área é proporcional à concentração do analito da amostra, é produzido.

As características exigidas pelos espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite são completamente diferentes das requeridas quando utilizados no modo chama. Tais características instrumentais desejáveis para GF AAS são estabelecidas no conceito STPF (do inglês, *stabilized temperature platform furnace*). Destaca-se como parâmetros desejáveis o uso de eletrônica digital de alta velocidade, obtenção do sinal de absorvância atômica de forma integrada, o aquecimento homogêneo e com taxa elevada do forno de grafite, uso de uma plataforma de grafite no interior do tubo, uso de modificadores químicos, interrupção da injeção do gás argônio durante o processo de atomização, utilização de tubo de grafite com revestimento pirolítico e compensação do sinal de fundo através da utilização de corretores (WELZ & SPERLING, 1999). Algumas interferências podem ser comuns em análises por GF AAS e normalmente se devem à presença da matriz da amostra, que pode causar elevado sinal de fundo na etapa de atomização. Além disso, perdas dos analitos podem ocorrer na etapa de pirólise. Estas interferências podem ser evitadas através da escolha correta das condições de temperatura e tempo do programa de aquecimento do forno de grafite, que permite eliminar grande parte da matriz sem perda dos analitos anteriormente à etapa de atomização (ÖZCAN & AKMAN, 2000), assim como a utilização de substâncias, chamadas de modificadores químicos. Essas substâncias podem aumentar a estabilidade térmica do analito de interesse possibilitando a utilização de temperaturas de pirólise mais elevadas e, assim, permitindo a completa eliminação de concomitantes (WELZ & SPERLING, 1999).

Na literatura, destaca-se a utilização de técnicas instrumentais multielementares como as técnicas de ICP OES e ICP-MS para determinação de micronutrientes minerais em amostras suplementos alimentares à base de minerais e creatina (KREJČOVÁ *et al.*, 2006; AVULA *et al.*, 2010; MORET *et al.*, 2011; KREJČOVÁ *et al.*, 2012; BRIZIO *et al.*, 2013; KORFALI *et al.*, 2013; MARRERO *et al.*, 2013). É relatada ainda a utilização da espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amálgama (TDA-AAS) para determinação de mercúrio em amostras de suplementos comercializados na Itália à base de ervas e outros componentes botânicos (BRIZIO *et al.*, 2013). Destaca-se ainda o emprego de F AAS para determinação de minerais em suplementos alimentares multivitamínicos/minerais (SORIANO *et al.*, 2007; KORFALI *et al.*, 2013) e GF AAS

(KOVÁCS *et al.*, 2007; KRAWCZYK, 2014). Desta forma, a técnica analítica selecionada para determinação de Cr, neste trabalho, está de acordo com o contexto atual da química analítica para este tipo de amostra.

1.5. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

A difratometria de raios X (XRD) corresponde a uma das principais técnicas de caracterização micro estrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos. Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, ou seja, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo onde a onda espalhada tem direção definida, mesma fase e mesma energia em relação à onda incidente de forma que cada átomo atua com um centro de emissão de raios X.

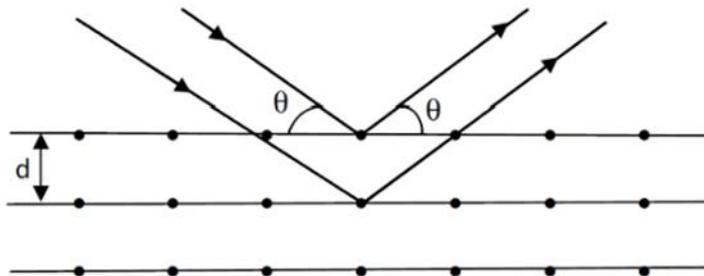
Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranjados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que os efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos.

Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente (Figura 1). Esta condição é expressa pela lei de Bragg, ou seja,

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, n a um número inteiro correspondente à ordem de difração, d à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X, medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos (REIS, 2014).

Figura 1 – Representação esquemática de um sistema cristalino, onde raios X incidem formando um ângulo θ com os planos cristalinos



Fonte: (REIS, 2014)

A intensidade difratada, dentre outros fatores é dependente do número de elétrons no átomo; adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que as intensidades difratadas sejam, por consequência, distintas para diversos planos cristalinos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Utilizar método de digestão assistida por micro-ondas para mineralização de amostras de diferentes tipos de suplementos alimentares para atletas a fim de determinar os níveis de nutrientes minerais por espectrometria atômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer um método analítico para preparo de amostras utilizando digestão ácida assistida por micro-ondas que se adeque aos diferentes tipos de suplementos alimentares;
- ✓ Otimizar as condições instrumentais necessárias para avaliação dos teores de cromo utilizando como técnica analítica GF AAS;
- ✓ Utilizar a difração de raios X como ferramenta analítica para avaliar o estado de oxidação do cromo nas amostras;
- ✓ Desenvolver um método para monitorar as concentrações de sódio e potássio utilizando a F AES como técnica analítica;
- ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos para um conjunto de amostras de suplementos alimentares a saber: *whey protein*, hipercalórico e *protein bar*;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E INFORMAÇÕES DECLARADAS NOS RÓTULOS

As amostras foram adquiridas a partir de doações de praticantes de atividade física acompanhada e através de contribuições de uma nutricionista e um *personal trainer* ambos residentes de Juiz de Fora.

Obteve-se 4 amostras de hipercalórico, numeradas de H-1 a H-4; 7 amostras de *protein bar*, numeradas de PB-1 a PB-7; e, 14 amostras de *whey protein* e 1 amostra de *soy protein*, que por apresentarem-se características similares foram numeradas de WP-1 a WP-15.

Algumas das amostras apresentavam-se como informação rotulada o enriquecimento com vitaminas e minerais, podendo citar como os principais minerais utilizados para o enriquecimento destas amostras: ferro, manganês, cobre, magnésio, zinco, molibdênio, selênio e cromo.

3.2. PREPARO DE AMOSTRA

As amostras de hipercalórico e *whey protein*, por apresentarem-se finamente divididas em sua forma comercial, foram acondicionadas em frascos plásticos previamente descontaminados em banho de ácido nítrico 10% v/v por período mínimo de 24 horas. Promoveu-se também sua separação de acordo com as informações rotuladas com relação à presença dos micronutrientes minerais de interesse e pesou-as em frações equivalentes para a obtenção de um “*mix*” de amostra, também acondicionado em frasco plástico, com finalidade de utilizá-lo para o desenvolvimento do método analítico.

Inicialmente as amostras de *protein bar* foram trituradas com auxílio de um *mixer* de alimentos e depositadas sobre placas de petri previamente descontaminadas em ácido nítrico 10% v/v, conforme ilustrado pelas Figuras 2: (a) e (b). As amostras trituradas foram então levadas à estufa, com temperatura pré-estabelecida em torno de $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ e deixadas secando até que não fosse observada variação de massa, Figura 2: (c). As amostras secas foram retiradas da estufa e permaneceram por 24 horas em dessecador à vácuo. Após este período as amostras foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo de ágata e acondicionadas em frascos plásticos descontaminados, Figura 2: (d). Alíquotas

equivalentes de cada uma das amostras também foram separadas para obtenção do “mix” de *protein bar*.

Figura 2 – Pré-tratamento das amostras de *protein bar*. (a) Antes do processo de trituração; (b) Após o processo de trituração; (c) Após a etapa de secagem; e, (d) Amostras maceradas e prontas para acondicionamento



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

3.3.DIGESTÃO EM CHAPA DE AQUECIMENTO

Realizou-se testes iniciais de mineralização utilizando a digestão em chapa aquecedora (*Warmnest*, modelo DB-IVA 110 V) e HNO_3 65% v/v P.A. (ISO FAR) com base num procedimento de Tokalioğlu e colaboradores, que digeriram amostras de suplementos a base de vitaminas e minerais (TOKALIOĞLU *et al.*, 2014).

Aproximadamente 400 mg de amostra foram pesados em béquer de 100 mL e adicionados 4,0 mL de ácido nítrico concentrado. A mistura foi levada à chapa de aquecimento e submetida a um aquecimento, com sistema de refluxo obtido pela

colocação de um vidro de relógio sobre o béquer, até obtenção de temperatura em torno de 85 – 90°C. Adições sucessivas de 2,0 mL de ácido nítrico concentrado foram realizadas até que o desprendimento de vapores nitrosos cessasse. Para algumas amostras a quantidade de ácido adicionada chegou a 8,0 mL. O resultado final do procedimento caracterizou-se pela obtenção de um digerido visualmente completo e que foi avolumado para 25,00 mL com água deionizada em balão volumétrico.

3.4. ANÁLISES PRELIMINARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

Utilizou-se a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) em um equipamento disponibilizado pela Votorantim Metais, na unidade de Juiz de Fora. O equipamento utilizado (*CCD Simultaneous ICP Optical Emission Spectrometer*, modelo *Agilent 725-ES ICP-OES*) apresenta tocha do tipo radial e opera apenas com amostras digeridas por meio de nebulização pneumática.

Neste teste, utilizou-se curva analítica multielementar (calibração externa) com concentrações variando na faixa de 0,05 a 2,00 mg/L, preparada a partir de padrões estoque de 1000 mg/L (*Qhemis High Purity*) dos analitos e com acidez ajustada para 2% v/v com ácido nítrico 65% v/v. Esta curva foi preparada para avaliar a presença dos seguintes analitos: arsênio (As – 188,98 nm), cádmio (Cd – 226,50 nm), chumbo (Pb – 220,35 nm), cobalto (Co – 238,89), cobre (Cu – 324,75), cromo (Cr – 267,72), molibdênio (Mo – 202,03 nm) e manganês (Mn – 257,61 nm). As condições instrumentais foram vazão de 18 L/min para o argônio do plasma e 1,5 L/min para o gás auxiliar, pressão de nebulização de 140 kPa e altura de observação de 8 mm.

3.5. DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

O procedimento utilizado foi desenvolvido no laboratório empregando um forno micro-ondas da *Berghof* (modelo *Speedwave 4*). Para isso foi adaptado um programa de digestão disponível no *software* do equipamento (*Berghof Applications 7.0*) para digestão de proteína em pó e considerando também dados de literatura para outras amostras semelhantes (SORIANO *et al.*, 2007; MORET *et al.*, 2011; MARRERO *et al.*, 2013).

Foram realizados três diferentes testes de acordo com o programa de aquecimento disposto a seguir na Tabela 1. Variaram-se os reagentes oxidantes: ácido nítrico

concentrado, 65% v/v, e peróxido de hidrogênio, 35% v/v (*Impex*); ácido nítrico concentrado; e, ácido nítrico diluído (6,4 mols/L). Anteriormente aos processos de digestão o ácido nítrico utilizado foi purificado através do processo de destilação utilizando para isto um aparato para purificação/destilação de ácidos (*Distillacid Berghof*, modelo *BSB-939-IR*).

Tabela 1 – Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão de amostras de proteína em pó

Temperatura (°C)	Pressão Máxima (bar)	Tempo de Alcance (min)	Tempo de Residência (min)	Potência (%)
170	40	6	10	90
210	40	2	15	90
50	10	1	10	0

Fonte: *Software Berghof Applications 7.0*

O procedimento de digestão inicial consistiu em pesar aproximadamente 250 mg de amostra seca em frascos de Teflon[®] modelo DAP-30, alta pressão, adicionou-se 6,0 mL de ácido nítrico e 2,0 mL de peróxido de hidrogênio, seguindo com o programa de aquecimento mostrado na Tabela 1. Após o procedimento, os digeridos foram avolumados para 25,00 mL em balões volumétricos utilizando água deionizada.

3.6.ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Utilizou-se o espectrômetro de absorção atômica, disponível no Departamento de Química, *Thermo Scientific* modelo *Solaar Serie M5* (Waltham, MA, United States) equipado com lâmpada de cátodo oco de cromo (P812, *PHOTRON Lamps*) que foi operada com corrente máxima de 6 mA.

As medidas foram realizadas em ambiente com temperatura controlada para 20 °C. Utilizou-se argônio de alta pureza, grau analítico (99,999%, White Martins, Praxair, Brasil), como gás de proteção e purga. As integrações dos picos de absorvância foram realizadas por área de acordo com o conceito STPF (WELZ & SPERLING, 1999). O sistema de corretor de fundo baseado no uso da lâmpada de deutério não foi utilizado. Além disso, manteve-se a abertura da fenda espectral em 0,5 nm e como comprimento de onda utilizou-se o valor de 357,9 nm. Todas as análises foram realizadas com emprego

de tubo de grafite com revestimento pirolítico, aquecimento longitudinal e injeção manual de 30 μL de solução de leitura sobre a superfície interna do tubo.

Para as determinações de cromo nos diferentes tipos de amostras, preparou-se uma curva analítica com faixa de concentração de 2,25 a 11,25 $\mu\text{g/L}$ a partir de solução padrão estoque de cromo 1000 mg/L (*Qhemis High Purity*) e com acidez ajustada em 2% v/v com ácido nítrico destilado.

3.7. MODIFICADOR QUÍMICO

Para as determinações de cromo utilizou-se como modificador químico 12,75 μg de nitrato de magnésio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, nas alíquotas de análise.

3.8. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM CHAMA

Empregou-se a espectrometria de emissão atômica em chama (F AES), também referida como fotometria de chama, para as determinações dos níveis de sódio e potássio nas amostras de suplemento alimentares. Para isso, utilizou-se um fotômetro de chama da *Digimed* (modelo *DM-61*), disponível no Departamento de Química. As determinações dos analitos foram feitas com leitura simultânea (Na e K) com resolução de 0,1 ppm e tempo de resposta de 8 segundos. O mesmo estava equipado com câmara de nebulização para introdução de GLP (gás liquefeito de petróleo) como gás combustível e ar comprimido como gás oxidante. As soluções de amostra foram aspiradas com uma vazão média de $(5,77 \pm 0,12)$ mL/min.

Para a quantificação dos analitos foram avaliados dois métodos, calibração externa e a adição de padrão, sendo que para o primeiro foi preparada uma curva multielementar a partir de solução estoque, também multielementar (Na, K, Li e Ca), de 100 mg/L (*Digimed*). Nos diferentes métodos testados trabalhou-se na faixa de concentração de 1 a 15 mg/L e, em alguns ensaios também foram usados cloreto de lítio P.A. (*LiCl – Synth*), como padrão interno e o álcool etílico P.A. (*Vetec*).

3.9. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Análises de difração de raios X por policristais foram realizadas em um difratômetro da *Bruker* (modelo *D8 Advance DaVinci*) com geometria Bragg-Brentano,

tubo de cobre (1,54056 Å), filtro de Ni e detector linear *LynxEye*. Os difratogramas foram coletados no intervalo angular de 0 a 50°, com passo de 0,02° e uma fenda de divergência de 0,6 nm e fendas Soller primária e secundária de 2,5°. A tensão aplicada foi de 40 kV e a corrente de 40 mA. Para essas análises foram usadas as amostras originais, após secagem e maceração.

Foram estudados os difratogramas das amostras *mix* de *whey protein*, *protein bar* e hipercalórico, além dos padrões de picolinato de cromo (*Harika Drugs*), lactose e trióxido de cromo (VI), CrO₃, (*Synth*) para facilitar a interpretação dos dados.

3.10. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

Utilizou-se a espectrometria de massas com fonte de plasma para confirmação dos dados analíticos obtidos com os métodos desenvolvidos e que foram baseados nas técnicas de absorção e emissão atômica. Essas análises por ICP-MS foram realizadas num equipamento da *Agilent* (modelo *7700 series*) e que foi disponibilizado pela *Agilent Technologies*, em São Paulo.

Para isso, foi utilizada uma curva analítica multielementar (calibração externa) com concentrações variando na faixa de 0,50 a 1000 µg/L e que foi preparada a partir de padrões estoque 1000 mg/L (*Qhemis High Purity*) de sódio, potássio e cromo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. TESTES PRELIMINARES

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) apresenta-se como uma técnica analítica de larga aplicação em rotinas laboratoriais, sendo capaz de determinar cerca de 70 elementos de forma eficiente e reprodutível com limites de detecção na faixa de miligramas por litro (BOSS e FREDEEN, 1997).

Aliada à esta característica, as análises por ICP OES apresentam como vantagem em relação às técnicas de absorção atômica com chama e forno de grafite a eliminação de muitas das interferências espectrais e não espectrais. Neste sentido, em função da confiabilidade dos resultados e praticidade de obtenção dos mesmos para diversos analitos de forma rápida e eficiente, optou-se pela ICP OES como técnica analítica para realização de análises preliminares, avaliando assim a presença de micronutrientes e contaminantes que poderiam ser “priorizados” nas amostras de interesse.

Nesses testes avaliou-se a presença de analitos como: arsênio, cádmio e chumbo, pelo fato de existirem relatos de sua presença em amostras de suplementos alimentares (GARCÍA-RICO *et al.*, 2007; AVULA *et al.*, 2010; KORFALI *et al.*, 2013) e também pela sua toxicidade; e, cobalto, cobre, cromo, manganês e molibdênio, que são minerais rotulados em algumas das amostras.

Empregando a curva analítica multielementar previamente preparada deu-se prosseguimento com a realização dos testes iniciais com as soluções digeridas em chapa de aquecimento utilizando o ICP OES. Os resultados obtidos a partir dessa análise indicaram que a concentração dos analitos arsênio, cádmio, chumbo, cobalto e cromo nas amostras estava abaixo do limite de detecção, enquanto que para os analitos molibdênio, cobre, e manganês foi possível quantificá-los em algumas amostras, como mostra a Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 – Resultados preliminares, por ICP OES, da determinação de contaminantes e constituintes inorgânicos em suplementos alimentares

	Mix Whey Protein	Mix Hipercalórico	Soy Protein
As	< LD	< LD	< LD
Cd	< LD	< LD	< LD
Pb	< LD	< LD	< LD
Co	< LD	< LD	< LD
Cr	< LD	< LD	< LD
Cu	< LD	< LD	0,07 mg/L
Mo	< LD	< LD	0,01 mg/L*
Mn	0,02 mg/L*	< LD	0,25 mg/L

LD – Limite de Detecção.

*Concentração estimada.

Limites de Detecção: As – 0,0045 mg/L; Cd – 0,0002 mg/L; Pb – 0,0070 mg/L; Cr – 0,0038 mg/L; Co – 0,0018 mg/L; Cu – 0,0016 mg/L; Mo – 0,0013 mg/L; e, Mn – 0,0003 mg/L.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Nos resultados obtidos e apresentados na Tabela acima nota-se que não foi possível detectar os elementos tóxicos (provavelmente ao nível de traços) como o chumbo e o cádmio. Isto indica a necessidade de um refinamento nas condições instrumentais para uma avaliação mais minuciosa da presença destes contaminantes. Por outro lado, foi possível detectar e confirmar a presença dos minerais como: cobre, molibdênio e manganês.

Dessa forma, os testes preliminares foram de grande importância para avaliar, em linhas gerais os níveis de micronutrientes minerais nas amostras selecionadas e, assim, traçar uma estratégia de estudo com base em ensaios experimentais. Além disso, tornou-se evidente a necessidade de se utilizar uma técnica instrumental de maior sensibilidade, visto o valor dos resultados obtidos nas análises. Por outro lado, como a presença do micronutriente cromo é rotulada em 54% das amostras adquiridas e, aliando esta informação à questão de que o mesmo é essencial apenas quando no estado de oxidação Cr^{+3} , considerou-se importante investigar a presença do mesmo.

4.2.DIGESTÃO EM MICRO-ONDAS

Foram realizados três diferentes procedimentos de digestão empregando o mesmo programa de aquecimento, Tabela 1, diferenciando apenas os reagentes oxidantes e suas concentrações empregados para a decomposição das amostras. As análises para comparação dos diferentes testes de digestão assistida por radiação micro-ondas foram realizadas empregando-se como técnica instrumental a GF AAS sob condições instrumentais padrão, disponíveis no *software* (*Thermo SOLAAR*) do equipamento. O programa de aquecimento disposto na Tabela 3 a seguir descreve tais condições.

Tabela 3 – Programa de aquecimento para determinação de cromo por GF AAS

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa de Aquecimento (°C/s)	Vazão Gás (L/min)
100	30	10	0,2
1200	20	150	0,2
2500	3	0	0
2600	3	0	0,2

Fonte: *Software Thermo SOLAAR*

Para o primeiro teste, utilizando a mistura de HNO_3 e H_2O_2 , observou-se que os valores medidos de absorvância média do cromo estavam relativamente maiores que os dos demais testes. Porém, em virtude do alto valor obtido para o branco amostral, o que sugere a possibilidade do peróxido de hidrogênio, em função de suas impurezas, ter contribuído para o aumento do sinal de absorvância do cromo, optou-se por não prosseguir com as digestões assistidas por micro-ondas utilizando este método.

Para o segundo e terceiro testes manteve-se as mesmas condições do primeiro, ou seja: mesma massa, tipo de frasco, programa de aquecimento e volume de ácido empregado. Porém, no segundo teste foi utilizado apenas ácido nítrico concentrado como reagente oxidante e para o último teste o ácido empregado foi diluído para 6,4 mol/L.

Comparando os resultados obtidos, absorvância, para as amostras digeridas com solução de ácido nítrico diluído e ácido nítrico concentrado, observa-se que os resultados deste último se apresentam relativamente maiores. Inicialmente foi realizado o teste F para comparação das variâncias de ambos os métodos, de forma que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 2,108 enquanto que o $F_{\text{crítico}}$ é tabelado em 2,484, sendo assim pode-se afirmar que as

variâncias são comparáveis. Para comparação das médias, realizou-se um teste *t* pareado de Student de forma que para as amostras o valor de $t_{calculado}$ foi 3,428 e o $t_{crítico}$ é tabelado em 2,145. Avaliando o resultado do teste *t* pareado, conclui-se que as médias calculadas não foram equivalentes de forma que se optou por escolher o método que forneceu valores de absorvância média maiores.

Tabela 4 – Valores de absorvância média do cromo para os métodos testados de digestão assistida por radiação micro-ondas

	HNO₃ 65% v/v e H₂O₂ 35% v/v	HNO₃ 65% v/v	HNO₃ 6,4 mol/L
Branco¹	(0,2544 ± 0,0213)	(0,0993 ± 0,0098)	(0,0908 ± 0,0066)
Whey protein²	(0,4223 ± 0,0220)	(0,2305 ± 0,0030)	(0,1247 ± 0,0163)
Hipercalórico²	(0,2968 ± 0,0317)	(0,1142 ± 0,0039)	(0,0772 ± 0,0068)
Branco¹	(0,2140 ± 0,0071)	(0,0876 ± 0,0079)	(0,0721 ± 0,0071)
Protein bar²	(0,2904 ± 0,0065)	(0,1076 ± 0,0068)	(0,0996 ± 0,0123)

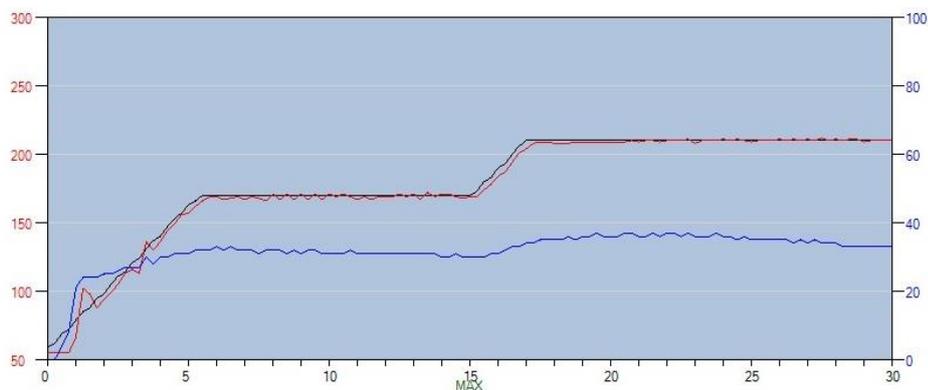
¹ Os testes de digestão foram realizados em dias diferentes, por isso temos a presença de duas amostras branco.

² Os valores de absorvância para as amostras foram descontados dos brancos amostrais.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É possível verificar a aplicação do programa de aquecimento disposto na Tabela 1 através do gráfico gerado pelo *software* do digestor micro-ondas onde observa-se claramente as rampas e patamares de aquecimento, de forma que o processo de digestão das amostras transcorreu de acordo com o programa, não havendo aumento excessivo de temperatura ou pressão. Além disso, é importante destacar que a observação visual dos digeridos indicou que a digestão foi completa, visto que os digeridos apresentaram um aspecto límpidos e constituíam uma solução homogênea.

Figura 3 – Programação e execução do programa de aquecimento empregado para a digestão de amostras de suplementos alimentares no forno micro-ondas



Fonte: *Software Berghof Applications 7.0*

Na Figura 3, a linha vermelha indica as variações de temperatura em função do tempo. Pode-se observar que a temperatura atingida durante as etapas de rampas e patamares do aquecimento foi satisfatoriamente próxima à temperatura pré-estabelecida no programa de aquecimento, representado pela linha preta. Já em azul destaca-se a variação da pressão interna atingida pelo frasco durante o processo de digestão, sendo importante ressaltar que os valores máximos de pressão estabelecidos no método de 40 bar, que correspondem à capacidade máxima do frasco utilizado, não foram ultrapassados.

4.3. MODIFICADOR QUÍMICO

O uso de modificador químico por vezes pode ser considerado desnecessário em função do comportamento refratário do cromo, entretanto, baixas temperaturas de pirólise podem influenciar na eliminação de matrizes complexas (MINAMI *et al.*, 1994; BOLZAN, 2007). O emprego de modificadores como o nitrato de magnésio, $Mg(NO_3)_2$, são reportados na literatura para determinação de cromo em diferentes tipos de matrizes permitindo estabilizar termicamente o analito durante a etapa de pirólise, eliminando a matriz sem perdas de analito (CABRERA-VIQUE & BOUZAS, 2009; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012).

A verificação da necessidade de utilização do modificador químico foi realizada através da variação dos sinais de absorvâncias para amostras analisadas com a adição de $Mg(NO_3)_2$ e sem a adição do modificador seguindo o programa de aquecimento indicado pelo *software* do equipamento, disposto na Tabela 3. Na Tabela 5 a seguir estão descritos

os dados observados para a absorvância média de cromo para as diferentes amostras estudadas com e sem a utilização do modificador químico.

Tabela 5 – Absorvância médias das amostras com e sem utilização de $Mg(NO_3)_2$

	<i>Whey Protein</i>	Hipercalórico	<i>Protein Bar</i>
Absorvância média sem modificador	(0,1891 ± 0,0087)	(0,0891 ± 0,0046)	(0,0811 ± 0,0042)
Absorvância média com $Mg(NO_3)_2$	(0,2305 ± 0,0030)	(0,1142 ± 0,0039)	(0,1076 ± 0,0068)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As variâncias foram comparadas através do teste F e verificou-se que ambas são comparáveis, visto que o valor de $F_{calculado}$ foi 1,545 enquanto que o $F_{crítico}$ é tabelado como 3,438. Para comparação dos sinais médios obtidos (Tabela 5) realizou-se o teste t pareado de Student onde verificou-se que o valor de $t_{calculado}$ para as amostras de *whey protein*, hipercalórico e *protein bar* foi de 9,029, enquanto que o valor de $t_{tabelado}$ é 4,303. Isto indica que esses valores médios não são equivalentes, mostrando assim um favorecimento real do sinal analítico quando da utilização de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico.

4.4. PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

Em determinações por GF AAS pode-se enfrentar diversos problemas experimentais, dentre eles: perda de analito antes da atomização resultando queda de sensibilidade em matrizes mais complexas, efeitos de memória, difícil correção do sinal de fundo com fonte contínua e problemas de contaminação durante a etapa de preparo de amostra (THOMAIDIS & PIPERAKI, 2000; BOLZAN, 2007). Quando ocorre, a baixa sensibilidade em determinações de cromo pode estar relacionada à formação de carbeto, visto que o mesmo é um metal refratário e que tende a formar carbeto de cromo em atomizadores de grafite (BARBOSA JR *et al.*, 2004). Dessa forma, um melhor desempenho analítico, ou seja, temperaturas de pirólise mais altas e maior sensibilidade, é obtido utilizando forno de grafite com revestimento pirolítico (SLAVIN, 1988; TSALEV *et al.*, 2000).

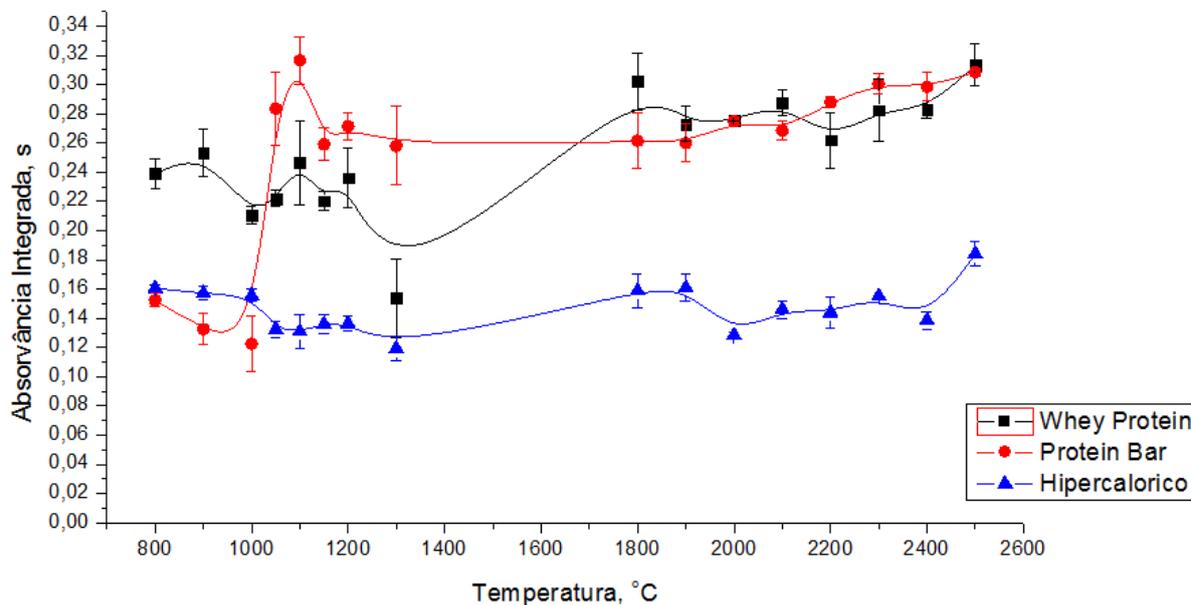
Na atomização eletrotérmica o volume de amostra é inserido dentro do atomizador e um programa de aquecimento é seguido sob etapas, de forma que o solvente e a matriz da amostra sejam eliminados antes do fenômeno de atomização, isto é, até a etapa de pirólise, inclusive. A pirólise é uma importante etapa considerada como pré-tratamento da amostra e é empregada para eliminar componentes orgânicos e inorgânicos da matriz, o que deve ocorrer sem perdas significativas do analito. Dessa forma, uma vez que toda a alíquota introduzida no forno de grafite é atomizada, um sinal dependente do tempo em forma de pico é gerado e sua área (absorvância integrada) é proporcional à massa de analito presente na solução de medição (WELZ & SPERLING, 1999).

Com objetivo de avaliar as melhores condições do programa de aquecimento utilizado para a quantificação de cromo em amostras de suplemento alimentar, foi realizada a construção e análise das curvas de pirólise e atomização em função do sinal analítico obtido.

Os estudos foram realizados em uma faixa de temperatura de 800 a 1300 °C para a pirólise, na presença de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico (12,75 µg). A escolha da temperatura ótima de pirólise teve como base a busca da maior relação entre sinal analítico obtido e a simetria do pico de absorção, de forma que para as amostras de *whey protein* e hipercalórico a temperatura ótima de pirólise foi fixada em 1100 °C e para as amostras de *protein bar* em 1050 °C.

Uma vez encontradas e definidas as temperaturas de pirólise para os diferentes tipos de amostras, procedimento semelhante foi seguido variando-se a temperatura de atomização, avaliada para a faixa de 1800 a 2500 °C a fim de se observar em qual temperatura seria possível obter a melhor sensibilidade.

Gráfico 1 – Curvas de pirólise e atomização para a determinação de cromo em amostras de hipercalórico, *protein bar* e *whey protein*



¹Pirólise (800 – 1300 °C): $RSD_{\text{médio}}$ para hipercalórico = 4,3%, $RSD_{\text{médio}}$ para *protein bar* = 7,3%, $RSD_{\text{médio}}$ para *whey protein* = 7,1%

²Atomização (1800 – 2500 °C): $RSD_{\text{médio}}$ para hipercalórico = 4,4%, $RSD_{\text{médio}}$ para *protein bar* = 2,9%, $RSD_{\text{médio}}$ para *whey protein* = 4,4%

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

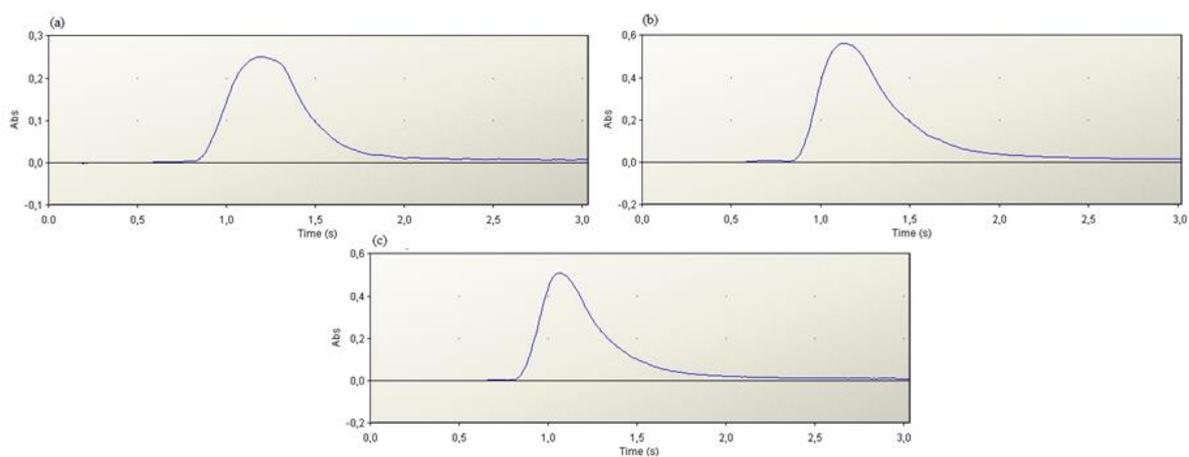
A curva de pirólise obtida para a amostra de *protein bar* evidencia que a temperatura onde obteve-se maior sinal de resposta analítica foi de 1100 °C, porém observa-se maior simetria do pico de absorção na temperatura de 1050 °C. Por isso, esta última temperatura foi definida como a temperatura ótima de pirólise.

Para a amostra de hipercalórico nas temperaturas iniciais testadas, 800 e 900 °C, foram observados os maiores sinais de resposta analítica, porém exatamente nestas temperaturas os picos de absorção não se apresentaram simétricos indicando baixa eficiência desta etapa. Ou seja, a matriz não foi totalmente eliminada com possível interferência molecular da matriz no processo de atomização do analito, visto que algumas moléculas podem absorver a radiação eletromagnética nos mesmos comprimentos de ondas proporcionando aumento do sinal analítico. Já a partir da temperatura de 1050 °C os picos de absorção do cromo mostraram-se mais simétricos, de forma que em 1100 °C observou-se os maiores valores de absorvância, definindo-se assim

esta temperatura de pirólise como ótima para as amostras de hipercalórico. De maneira semelhante às amostras de hipercalórico, definiu-se a temperatura ótima de pirólise para as amostras de *whey protein* como sendo 1100 °C.

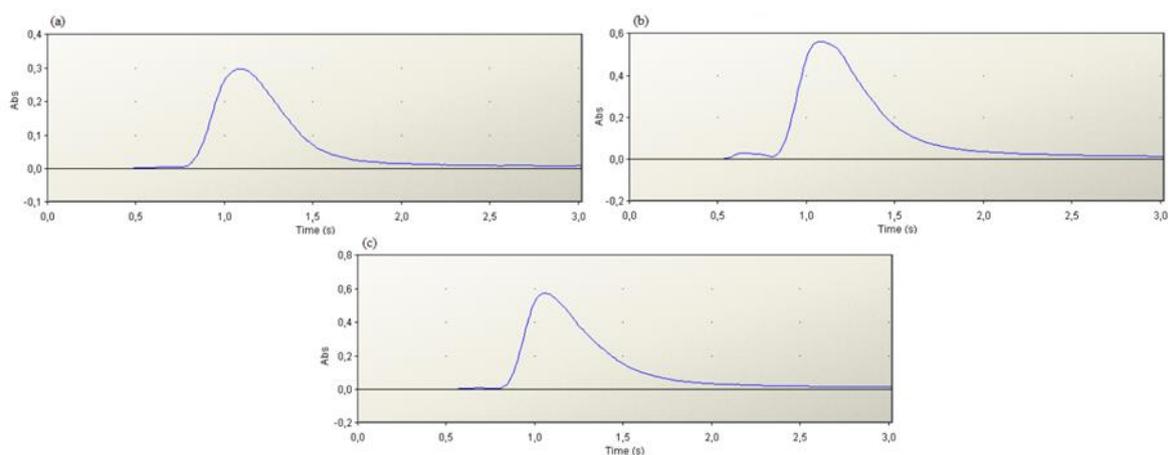
Nas Figuras 4 e 5 (a, b e c) a seguir, estão apresentados os gráficos com os picos de absorvância em função do tempo para os processos de pirólise e atomização, respectivamente.

Figura 4 – Sinais de absorção para: (a) hipercalórico obtido à temperatura de 1100 °C; (b) *protein bar* obtido à temperatura de 1050 °C; e, (c) *whey protein* obtido à temperatura de 1100 °C



Fonte: Software Thermo SOLAAR

Figura 5 – Sinais de absorção para: (a) hipercalórico; (b) *protein bar*; e, (c) *whey protein*; obtidos à temperatura de atomização de 2300 °C



Fonte: Software Thermo SOLAAR

Para determinação da temperatura ótima de atomização avaliou-se os sinais de resposta analítica, absorvância, considerando também a simetria do perfil do pico de absorvância do analito. Perfis não simétricos podem indicar a coexistência de diferentes mecanismos de atomização o que pode influenciar diretamente na sensibilidade analítica. Há de se preocupar também com a vida útil dos tubos de grafite, onde mesmo utilizando grafite com revestimento pirolítico, altas temperaturas de atomização empregadas podem acelerar o processo de deterioração dos mesmos. Levando-se em consideração estes fatores, optou-se por escolher a temperatura de 2300 °C como sendo a temperatura ótima para atomização do cromo nas três amostras estudadas.

As temperaturas de pirólise e atomização recomendadas pelo fabricante do equipamento são 1200 e 2500 °C, respectivamente. Como esses valores são obtidos para soluções aquosas de padrões analíticos, entende-se que são esperados comportamentos diferentes para analitos em outras matrizes.

Ao final do processo de otimização instrumental das temperaturas de pirólise e atomização, estabeleceram-se os programas de aquecimento do forno de grafite otimizados para as determinações de cromo, que estão disponibilizados na Tabela 6 a seguir:

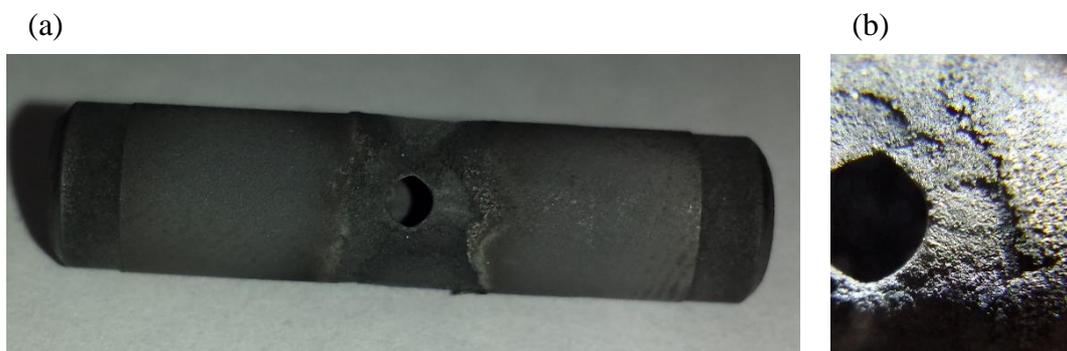
Tabela 6 – Programas de aquecimento para determinação de cromo por GF AAS

<i>Whey Protein e Hipercalórico</i>			
Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa de Aquecimento (°C/s)	Vazão de Gás (L/min)
100	30	10	0,2
1100	25	150	0,2
2300	3	0	0
2600	3	0	0,3
<i>Protein Bar</i>			
100	30	10	0,2
1050	25	150	0,2
2300	3	0	0
2600	3	0	0,3

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os programas de aquecimento foram otimizados e aplicados para a determinação de cromo em amostras de suplementos alimentares utilizando tubo de grafite com revestimento pirolítico. O tubo teve duração média de 1200 queimas e destaca-se que apesar dos sinais de desgaste o mesmo não apresentou, visualmente, deterioração significativa após a conclusão do estudo.

Figura 6 – (a) Tubo de grafite com revestimento pirolítico após aproximadamente 1200 queimas; (b) Fotomicrografia com ampliação de 240x da região de injeção de amostras no tubo de grafite



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

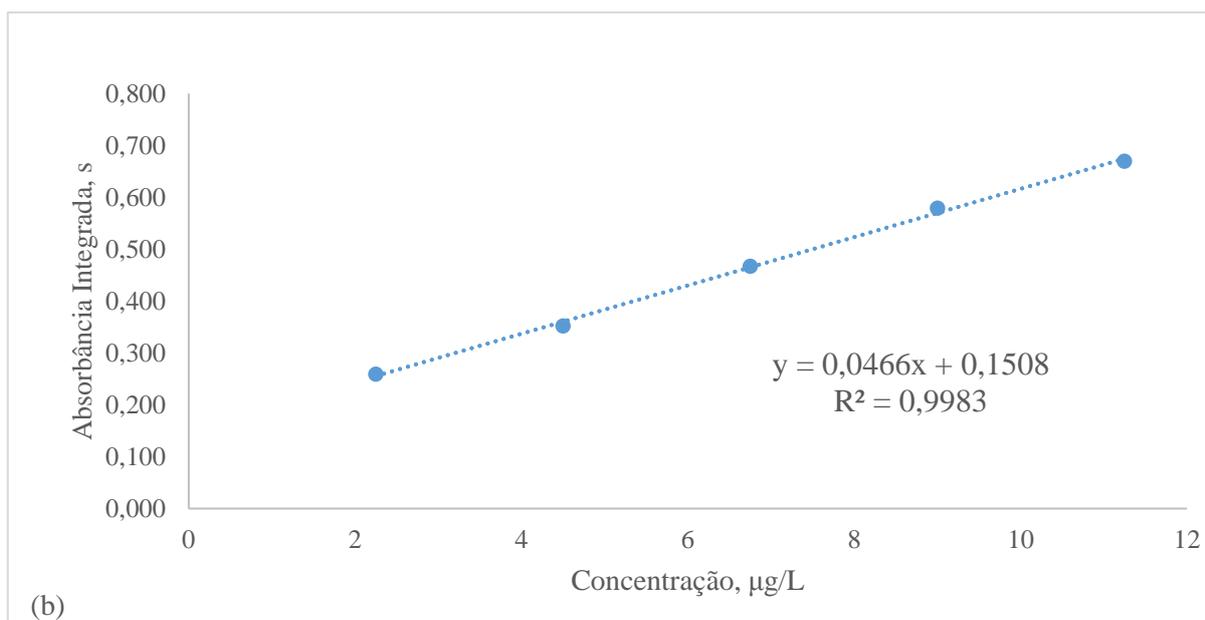
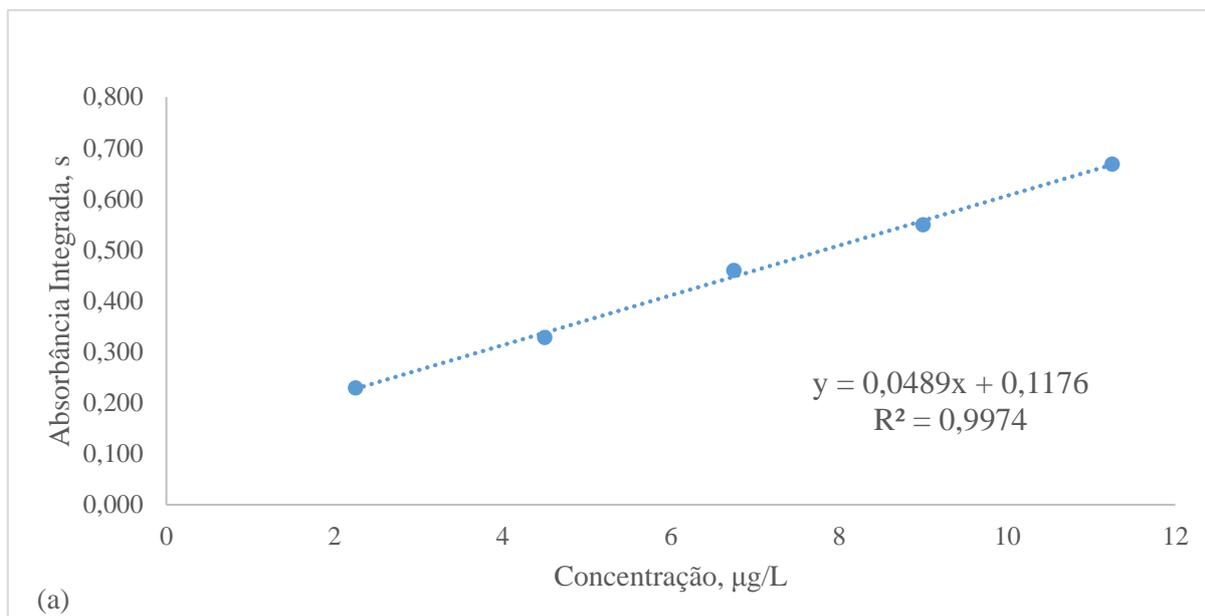
4.5. CURVAS ANALÍTICAS USADAS EM GF AAS E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS MESMAS

Os resultados analíticos baseiam-se numa curva de calibração usada como referência, na qual valores de resposta (absorvância integrada) observados, são relacionados matematicamente com a concentração de uma série de soluções padrão, sendo “curva analítica” o nome usual desta relação matemática.

Devido ao erro indeterminado, que sempre acompanha uma medida experimental, é necessário que se derive a melhor linha de tendência que represente essas medidas. A análise de regressão é um tratamento estatístico que fornece a melhor linha de tendência de forma que o método dos mínimos quadrados fornece o modelo matemático mais adequado e a análise de variância (ANOVA) garante a confiabilidade deste modelo.

No Gráfico 2, a seguir, estão dispostas as curvas analíticas relativas às medições de absorvância integrada empregando os diferentes programas de pirólise e atomização.

Gráfico 2 – Curvas analíticas para determinação de Cr em amostras de: (a) *protein bar*; (b) *whey protein* e hipercalórico



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para as curvas analíticas “a” e “b” obtidas, utilizou-se a análise de regressão linear para verificação de falta de ajuste do modelo, assim como para determinar a melhor linha de tendência. Na Tabela 7 a seguir encontram-se resultados estatísticos oriundos da análise de variância (ANOVA) realizada.

Tabela 7 – Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas apresentadas no Gráfico 2

Whey Protein e Hipercalórico		
Teste de Shapiro Wilk	$W_{calc} = 0,903$	$W_{tab} = 0,881$
Teste de Cochran	$Q_{calc} = 0,522$	$Q_{tab} = 0,684$
Falta de Ajuste	$F_{faj-calc} = 1,017$	$F_{faj-tab} = 3,708$
Regressão	$F_{reg-calc} = 1747$	$F_{reg-tab} = 4,667$
R² - Ajustado	$R^2 = 0,9920$	
Equação da Reta	$y = (0,0466 \pm 0,0011).x + (0,1508 \pm 0,0083)$	
Protein Bar		
Teste de Shapiro Wilk	$W_{calc} = 0,941$	$W_{tab} = 0,881$
Teste de Cochran	$Q_{calc} = 0,336$	$Q_{tab} = 0,684$
Falta de Ajuste	$F_{faj-calc} = 2,908$	$F_{faj-tab} = 3,708$
Regressão	$F_{reg-calc} = 2342$	$F_{reg-tab} = 4,667$
R² - Ajustado	$R^2 = 0,9941$	
Equação da Reta	$y = (0,0489 \pm 0,0010).x + (0,1176 \pm 0,0075)$	

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Avaliando os dados da Tabela 7 é possível verificar que no método proposto para análise de *whey protein* e hipercalórico e, também, naquele estabelecido para análise de *protein bar*, o teste de Shapiro Wilk não forneceu evidências de que a 95% de confiança haja não normalidade da distribuição dos resíduos, visto que $W_{calculado}$ é maior que o $W_{tabelado}$. Através do teste de Cochran, verificou-se a homocedasticidade, isto é, a homogeneidade da variância dos resíduos. O teste de Cochran foi aplicado para os dados relativos à determinação de cromo nas amostras de hipercalórico e *whey protein* e também aos dados relativos à determinação de cromo nas amostras de *protein bar*. Verificou-se que não há diferença significativa nas variâncias, uma vez que os valores de $Q_{calculado}$ foram menores que $Q_{tabelado}$.

Calculou-se então a análise de regressão linear onde, como os valores de $F_{calculado}$ apresentaram-se menores que os valores de $F_{tabelado}$, assume-se que não há falta de ajustes nos métodos. Dessa forma, avaliou-se também a significância da regressão observando que em ambos os métodos os valores de $F_{calculado}$ foram consideravelmente superiores aos valores de $F_{tabelado}$, demonstrando evidência estatística suficiente de existência de relação linear entre as variáveis analisadas. Como os valores de $F_{calculado}$ foram pelo menos dez

vezes maiores que os valores de $F_{tabelado}$, pode-se considerar que a regressão é altamente significativa e útil para fins de previsão (NETO *et al.*, 2001).

4.6.FIGURAS DE MÉRITO

A fim de avaliar a exatidão do método realizou-se testes de adição e recuperação de analito em dois níveis de fortificação. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de cromo, recuperado no processo, em relação à quantidade do mesmo presente inicialmente na amostra (BRITO *et al.*, 2003).

O estudo de recuperação consistiu em “fortificar” as amostras de suplementos alimentares, ou seja, adicionar diferentes volumes, 62,5 μL e 125 μL , de solução padrão de Cr 1 mg/L para o nível baixo (2,50 $\mu\text{g/L}$) e para o nível mais alto (5,00 $\mu\text{g/L}$), respectivamente, e em seguida, determinar a concentração do analito adicionado nas amostras. Ressalta-se que a solução padrão foi adicionada às amostras antes do processo de digestão e o branco amostral também foi preparado com dois níveis de fortificação. Ao final do procedimento de digestão, obteve-se soluções digeridas homogêneas, ou seja, sem a presença visual de resíduos característicos de processos de digestão incompletos.

Tabela 8 – Resultados de recuperação de cromo em amostras de suplementos alimentares

Amostras	Nível 1 – (2,50 $\mu\text{g/L}$)	Nível 2 – (5,00 $\mu\text{g/L}$)
Branco	88,8%	91,0%
Whey Protein	99,4%	107%
Hipercalórico	110%	93,3%
Branco	96,7%	100%
Protein Bar	94,5%	102%

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tendo em vista que os erros sistemáticos relativos para determinação de elementos traço são superiores que os para elementos majoritários, existem valores críticos aceitáveis de recuperação do analito estudado em função de sua concentração, onde para o nível de concentração das amostras avaliadas, aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/g}$, o intervalo de recuperação aceitável é de 82,2 a 117,8% de acordo com os cálculos da curva de Horwitz (HORWITZ, 1982). Como os valores de recuperação obtidos enquadram-se

neste intervalo de aceitação, considera-se que o método desenvolvido apresenta boa exatidão para a determinação de cromo em suplementos alimentares.

Em relação à detectabilidade, foram estabelecidos os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Para isso, calculou-se a partir do desvio padrão de 10 medidas consecutivas dos brancos analíticos o valor de LD, a menor concentração do analito que pode ser detectada (mas não necessariamente quantificada) e, o valor de LQ, definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis. Os valores de LD e LQ foram obtidos de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente, descritas abaixo:

$$LD = \frac{3 \times s}{a} \quad (2) \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10 \times s}{a} \quad (3)$$

onde s é o desvio padrão do sinal de resposta e a o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade de calibração instrumental).

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método e instrumentais obtidos para determinação de cromo em suplementos alimentares

Amostras	LD (µg/L)	LD (µg/g)	LQ (µg/L)	LQ (µg/g)
<i>Whey Protein</i>	0,65	0,07	2,2	0,22
Hipercalórico	0,45	0,05	1,5	0,15
<i>Protein Bar</i>	0,43	0,04	1,5	0,15

* Em função do número de amostras, as digestões foram divididas de acordo com o tipo de amostra obtendo-se assim três pares de LD e LQ.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Além disso, para as determinações por GF AAS a detectabilidade é usualmente chamada de “sensibilidade” e, nesse caso, é expressa em termo de massa, referida como “massa característica”. Este valor corresponde à massa de analito, em picogramas (pg), responsável por absorver 1% da radiação, ou seja, que é capaz de gerar uma absorvância igual a 0,0044 (SLAVIN, 1988). Segundo Sola-Larrañaga e Navarro-Blasco, a massa característica calculada para análise de cromo em amostras de fórmulas infantis foi 4,8 pg (SOLA-LARRAÑAGA & NAVARRO-BLASCO, 2006), enquanto que Saracoglu e seus colaboradores encontraram 5 pg para o mesmo tipo de amostra (SARACOGLU *et*

al., 2007). Bruhn e seus colaboradores calcularam, para amostras de leite em pó desnatado, 3 pg. Eles utilizaram uma mistura de ácido ascórbico e magnésio como modificadores químicos. Também observaram que alterando as proporções dos modificadores chegava-se ao valor de 4 pg (BRUHN *et al.*, 1999).

Nota-se que essas amostras mencionadas são semelhantes às amostras de suplementos alimentares estudadas, visto que são amostras de leite em pó ou de produtos derivados, com matriz complexa e formada por carboidratos e proteínas derivados do leite. Dessa forma, espera-se que os valores de massa característica calculados, para as amostras estudadas, sejam próximos a esses encontrados na literatura. Para as amostras de *whey protein* e hipercalórico, a massa característica de cromo calculada foi 2,8 pg, enquanto que para a amostra de *protein bar* 2,7 pg, que são valores bastante satisfatórios. Há de se ressaltar ainda que para o cromo, a massa característica esperada em atomizadores longitudinalmente aquecidos é de aproximadamente 3 pg (WELZ & SPERLING, 1999), o que nos remete à conclusão de que a sensibilidade analítica calculada encontra-se dentro do valor esperado e, de fato, pode ser considerada adequada.

4.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após a validação do método e obtenção das figuras de mérito, foi possível aplicá-lo às 26 amostras coletadas e os resultados para a determinação de cromo estão dispostos na Tabela 10 a seguir:

Tabela 10 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo *Whey Protein*

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	$\mu\text{g Cr/Porção}^{(4)}$ (Calculado)	IDR (%)⁽¹⁾	$\mu\text{g Cr/Porção}$ (Rotulado)
WP-1	(1,035 \pm 0,135)	62,1	177,4	10,0
WP-2	(0,224 \pm 0,060)	6,7	19,2	–
WP-3	< 0,065 ⁽²⁾	–	–	–
WP-4	0,217 ⁽³⁾	–	–	–
WP-5	0,149 ⁽³⁾	–	–	–
WP-6	(0,894 \pm 0,057)	35,8	102,2	–
WP-7	(0,778 \pm 0,143)	23,3	66,7	5,3
WP-8	(0,443 \pm 0,098)	14,4	41,0	–
WP-9	(0,309 \pm 0,076)	80,2	229,2	34
WP-10	0,205 ⁽³⁾	–	–	–
WP-11	0,067 ⁽³⁾	–	–	–
WP-12	< 0,065 ⁽²⁾	–	–	–
WP-13	0,080 ⁽³⁾	–	–	–
WP-14	(0,287 \pm 0,093)	9,5	27,1	–
WP-15	(0,262 \pm 0,065)	6,5	18,7	–

*Os valores de desvio padrão relativo (RSD) permaneceram abaixo de 8%;

⁽¹⁾ Ingestão Diária Recomendada de Cr para homens adultos – 35 μg (ANVISA, 2005a);

⁽²⁾ Menor que Limite de Detecção;

⁽³⁾ Valor estimado. Acima do LD, mas abaixo do LQ;

⁽⁴⁾ As massas de porções indicadas nos rótulos em alguns casos são diferentes;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Observa-se que aplicando o método desenvolvido para análise de suplementos alimentares foi possível avaliar os teores de cromo em quinze (15) amostras de suplementos do tipo *whey protein*, evidenciando sua presença em boa parte destas amostras, mesmo naquelas onde não era rotulada a presença do micronutriente. Das 15 amostras, sete (7) apresentaram concentrações abaixo dos limites de quantificação e/ou detecção, enquanto que a concentração média de cromo calculada variou numa faixa de 0,224 a 1,035 $\mu\text{g/g}$.

A partir dos resultados obtidos calculou-se a porcentagem da IDR que seria suprida a partir do consumo de uma dose recomendada para cada suplemento baseando-

se nas informações dispostas nos rótulos. Verificou-se que para as amostras de *whey protein* as necessidades diárias de cromo são supridas numa faixa de 19,2 a 229,2%. Destaca-se que três (3) das amostras analisadas (WP-1, WP-6 e WP-9) apresentaram valores de IDR suprida acima de 100%, o que de acordo com a legislação brasileira caracteriza o produto como um medicamento e, por isso, seu consumo deve ser restrito às recomendações médicas.

Tabela 11 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo Hipercalórico

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	$\mu\text{g Cr/Porção}^{(3)}$ (Calculado)	IDR (%)⁽¹⁾	$\mu\text{g Cr/Porção}$ (Rotulado)
H-1	(0,304 \pm 0,072)	21,3	60,8	8,75
H-2	(0,442 \pm 0,046)	44,2	126,2	–
H-3	(0,266 \pm (0,084)	56,3	161,0	5,25
H-4	0,107 ⁽²⁾	–	–	–

*Os valores de desvio padrão relativo (RSD) permaneceram abaixo de 8%;

⁽¹⁾ Ingestão Diária Recomendada de Cr para homens adultos – 35 μg (ANVISA, 2005a);

⁽²⁾ Valor estimado. Acima do LD, mas abaixo do LQ;

⁽³⁾ As massas de porções indicadas nos rótulos em alguns casos são diferentes;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O método desenvolvido foi também aplicado a um conjunto de quatro (4) amostras de suplementos alimentares do tipo hipercalórico sendo possível detectar o micronutriente cromo em 3 dessas amostras. A concentração de cromo calculada nas amostras de hipercalórico variou numa faixa de 0,266 a 0,442 $\mu\text{g/g}$ e a partir destes resultados avaliou-se a porcentagem da IDR suprida a partir do consumo da dose recomendada pelo fabricante para cada suplemento. Os valores de IDR suprida variaram numa faixa de 60,8 a 161,0%, destacando-se que duas das amostras analisadas (H-2 e H-3) apresentaram valores de IDR suprida acima de 100%, o que de acordo com a legislação brasileira as classifica como medicamentos e não suplementos alimentares.

Tabela 12 – Resultados para determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares do tipo *Protein Bar*

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	$\mu\text{g Cr/Barrinha}^{(2)}$ (Calculado)	IDR (%) ⁽¹⁾	$\mu\text{g Cr/Barrinha}$ (Rotulado)
PB-1	(0,634 \pm 0,059)	20,9	59,8	2,8
PB-2	(0,535 \pm 0,074)	16,0	45,8	2,8
PB-3	(0,408 \pm 0,065)	12,2	35,0	3,7
PB-4	(0,403 \pm 0,064)	16,1	46,0	4,2
PB-5	(0,647 \pm 0,042)	29,1	83,2	4,2
PB-6	(0,414 \pm 0,017)	12,4	35,5	5,3
PB-7	(0,558 \pm 0,049)	22,3	63,7	3,4

*Os valores de desvio padrão relativo (RSD) permaneceram abaixo de 8%;

⁽¹⁾ Ingestão Diária Recomendada de Cr para homens adultos – 35 μg (ANVISA, 2005a);

⁽²⁾ As massas das barrinhas de proteína são diferentes.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Por fim, os dados da Tabela 12 mostram que o micronutriente cromo foi encontrado em todas as 7 amostras do conjunto de *protein bar*, evidenciando sua presença também nesse tipo de amostra. As concentrações calculadas desse micronutriente variaram numa faixa de 0,403 a 0,647 $\mu\text{g/g}$ e utilizando estes resultados foi calculada a porcentagem de IDR suprida a partir do consumo de uma barrinha de suplemento deste tipo. A porcentagem de IDR suprida para essas amostras variou numa faixa de 35,0 a 83,2%.

Um fato a ser destacado é o elevado erro relativo entre a concentração de cromo calculada por meio de comparação com os dados fornecidos pela metodologia desenvolvida e as informações nutricionais declaradas nos rótulos das amostras. Esses erros variam numa faixa de 135 a 521% para as amostras de *whey protein*, de 143 a 973% para as amostras de hipercalórico e de 134 a 647% para as amostras de *protein bar*. Isto pode ser um indicativo da ineficiência do processo de produção, resultando em contaminação dos suplementos alimentares, visto que muitas marcas produzem e comercializam diversos produtos com diferentes formulações, ou mesmo, da falta de um controle de qualidade adequado para esses produtos. Nesse contexto vale relembrar que a Anvisa chegou a proibir a distribuição e comercialização de 20 marcas de suplementos proteicos por problemas de irregularidade na composição dos produtos (ANVISA, 2014).

Destaca-se ainda a possibilidade de fraude nesses suplementos, visto que a própria Anvisa identificou a presença de alguns ingredientes não declarados nos rótulos como soja, amido, milho e fécula de mandioca (NUBLAT, 2014).

4.8.COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL DAS CONCENTRAÇÕES DE CROMO EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTO ALIMENTAR

Um conjunto aleatório de quatro amostras de cada tipo de foram analisadas utilizando como técnica de ICP-MS com o objetivo de comparar estatisticamente os resultados e confirmar a exatidão do método baseado na técnica de absorção atômica.

Na Tabela 13 a seguir estão dispostos os valores de concentração de cromo obtidos a partir do método desenvolvido por GF AAS e, os valores de concentração obtidos a partir da análise por ICP-MS para as mesmas amostras.

Tabela 13 – Comparação entre os valores de concentração de cromo obtidos por GF AAS e ICP-MS

Amostras	GF AAS (µg/L)	ICP-MS (µg/L)
<i>Whey Protein</i>		
WP-6	9,10	8,20
WP-7	7,91	8,53
WP-8	4,92	5,39
WP-9	3,56	3,58
Hipercalórico		
H-2	4,31	3,59
H-3	2,58	2,00
<i>Protein Bar</i>		
PB-2	5,33	5,46
PB-5	6,49	5,96
PB-6	4,15	4,00
PB-7	5,62	5,08

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR

As variâncias das concentrações foram avaliadas através do teste F, de forma que o valor de $F_{calculado}$ obtido foi 1,068 enquanto que o $F_{crítico}$ tabelado é 3,179, sendo assim pode-se considerar que as variâncias são equivalentes. Logo, uma comparação estatística das médias das concentrações de cromo obtidas através das diferentes técnicas foi realizada utilizando um teste t pareado de Student, onde o valor obtido para $t_{calculado}$ foi 1,333, enquanto que o valor de $t_{crítico}$ é tabelado como 2,262.

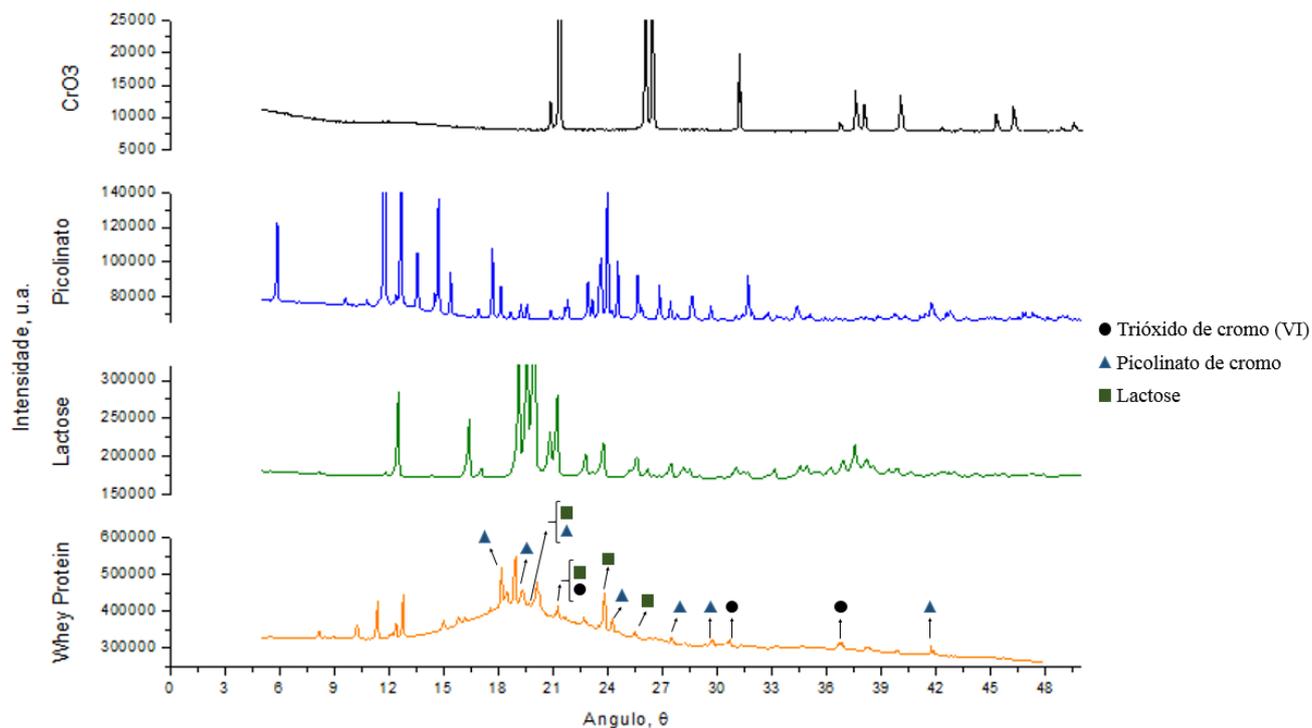
Logo, observa-se que o valor de $t_{crítico}$ foi menor que o valor de $t_{tabelado}$, onde foram comparados os resultados da concentração de cromo em amostras de suplemento alimentar por diferentes técnicas analíticas. Dessa forma, pode-se afirmar que a 95% de confiança não existem pressupostos que indiquem diferenças significativas entre os resultados obtidos por ICP-MS e os resultados obtidos com o método desenvolvido.

4.9. DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Considerando que os valores de concentrações de cromo obtidos a partir do método desenvolvido se apresentaram significativamente superiores às que são declaradas pelos fabricantes, foi utilizada a difração de raios X como ferramenta para identificação da fase do cromo presente nessas amostras, ou seja, se a fase foi de trióxido ou picolinato de cromo ou mesmo uma mistura de ambas.

O estudo consistiu na obtenção dos difratogramas das amostras no intervalo angular de 0 a 50°, região que concentra os picos de difração com maiores intensidades, e comparação com os difratogramas dos padrões de trióxido de cromo (VI) (CrO_3), lactose e picolinato de cromo. Nas Figuras 7, 8 e 9, dispostos abaixo, estão os difratogramas das amostras *mix* de *whey protein*, hipercalórico e *protein bar*, respectivamente.

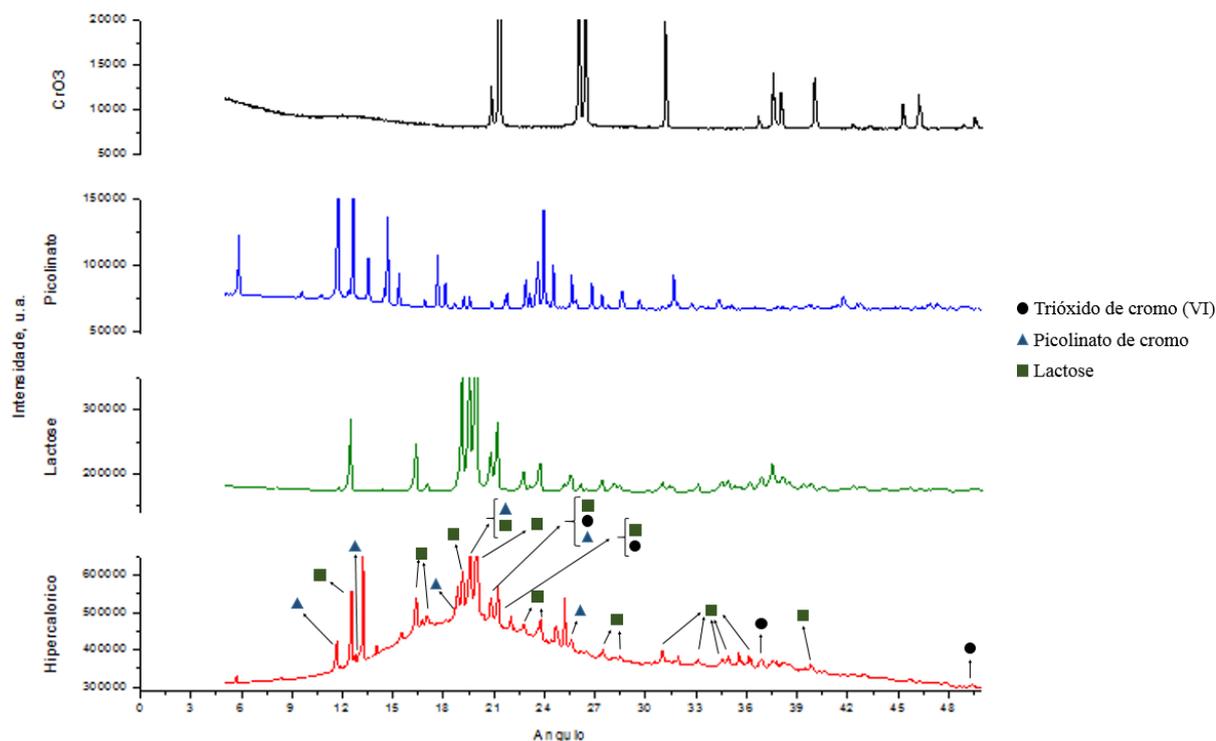
Figura 7 – Difratomogramas da amostra *mix* de *whey protein*, CrO_3 , picolinato de cromo e lactose



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A partir do difratograma obtido para a amostra *mix* de *whey protein* é possível atribuir picos de difração para o picolinato de cromo, lactose e também para o CrO_3 . Os sinais obtidos para o picolinato de cromo podem ser destacados através das marcações no formato de triângulos azuis no difratograma da amostra, os principais são aqueles que estão nos ângulos: $18,1^\circ$, $19,3^\circ$, $24,2^\circ$, $27,5^\circ$, $29,7^\circ$ e $41,7^\circ$. Porém, nota-se que alguns picos são correspondentes à contribuição de difração de diferentes compostos; os picos em $19,6^\circ$ possivelmente correspondem à contribuição de picolinato de cromo e lactose, e $21,2^\circ$ correspondem à lactose e ao CrO_3 . Ainda para a lactose, pode-se associar picos de difração nos ângulos $23,8^\circ$ e $25,4^\circ$. As evidências mais preocupantes se dão pelo fato de que os picos referentes aos ângulos $30,6^\circ$ e $36,7^\circ$ podem ser atribuídos ao CrO_3 , ou seja, utilizando-se a difração de raios X como ferramenta analítica, pode-se inferir que possivelmente existe cromo no estado de oxidação +6 nas amostras de *whey protein*.

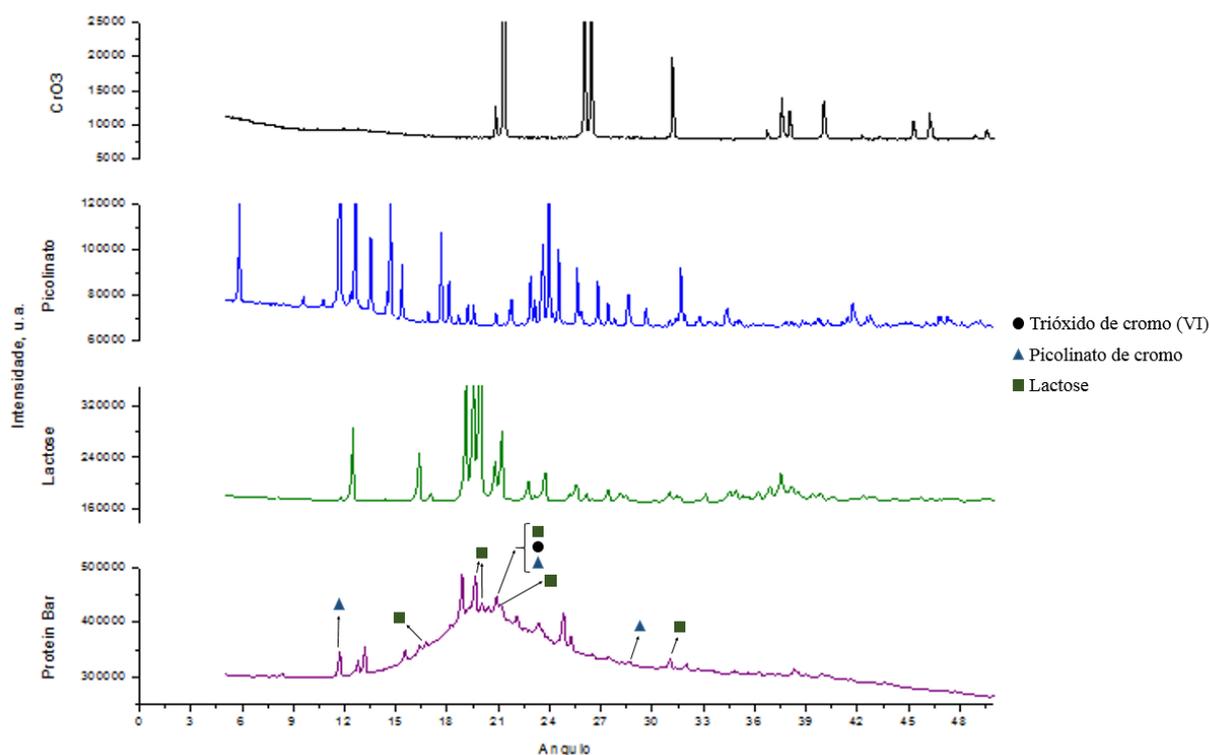
Figura 8 – Difratomogramas da amostra *mix* de hipercalórico, CrO_3 , picolinato de cromo e lactose



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tendo em mãos o difratograma da amostra *mix* de hipercalórico também foi possível atribuir os picos de difração de raios X para os três padrões avaliados. Observa-se algumas contribuições de picos de difração no mesmo ângulo para as amostras analisadas, porém destaca-se a atribuição de diversos picos à lactose como, por exemplo, em: $12,5^\circ$, $19,2^\circ$, $23,8^\circ$, $34,9^\circ$, entre outros. Foi também possível atribuir picos de difração característicos para o padrão de picolinato de cromo como em: $11,6^\circ$, $18,6^\circ$ e $25,6^\circ$. De maneira análoga às amostras *mix* de *whey protein*, foi possível atribuir picos de difração em aproximadamente $36,8^\circ$ e $49,4^\circ$ referentes ao padrão CrO_3 , evidenciando a presença do Cr^{+6} também na amostra *mix* de hipercalórico.

Figura 9 – Difratomogramas da amostra *mix* de *protein bar*, CrO_3 , picolinato de cromo e lactose



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para a amostra *mix* de *protein bar* observa-se que, apesar de em menor número, alguns ângulos podem ser atribuídos aos picos de difração de raios X da lactose como por exemplo: $16,4^\circ$, $19,7^\circ$ e $31,1^\circ$. Pode-se atribuir também alguns ângulos como sendo característicos da difração de raios X do picolinato de cromo como: $11,7^\circ$ e $28,7^\circ$. No ângulo de aproximadamente $20,9^\circ$ pode ser observado um pico de difração com possíveis contribuições da lactose, picolinato de cromo e CrO_3 , porém não existem evidências suficientes para afirmar que há a presença do Cr^{+6} nessa amostra, visto que não foram observados outros picos característicos para o trióxido de cromo (VI).

Considerando-se o disposto, a difração de raios X mostrou-se uma ferramenta de auxílio importante na caracterização composicional das amostras, quanto à presença do Cr^{+3} sob a forma de picolinato de cromo e à presença de Cr^{+6} sob a forma de trióxido de cromo. Foi possível atribuir picos em ângulos característicos para o picolinato de cromo nos três tipos de amostras, evidenciando a presença do mesmo conforme já relatado nas informações nutricionais dos suplementos alimentares. Por outro lado, destaca-se que também foi possível atribuir picos para o CrO_3 em ângulos característicos em dois tipos de amostras, as do tipo *whey protein* e as do tipo hipercalórico. Isto mostra possíveis

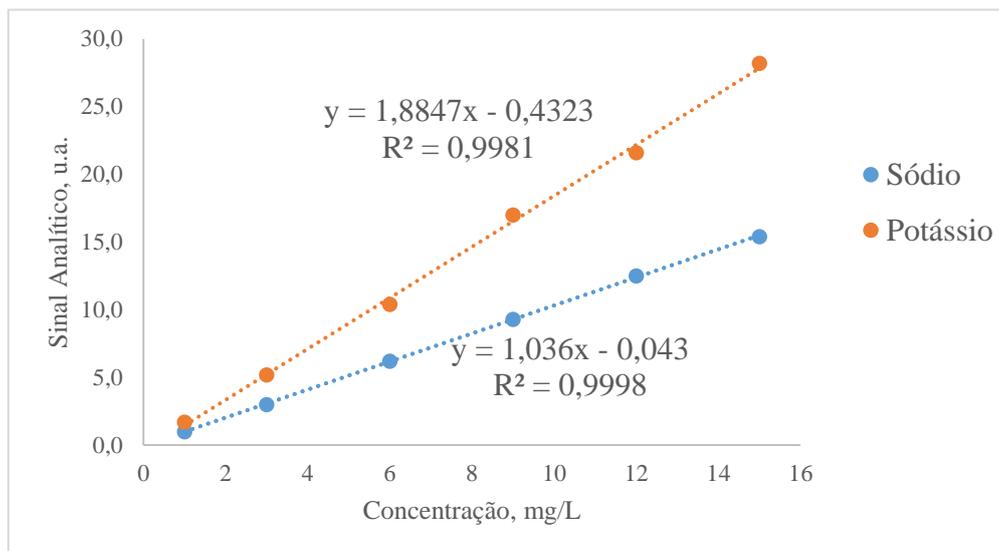
contaminações dos produtos seja a partir de matéria-prima de baixa qualidade ou lixiviações do cromo presente no aço inoxidável dos equipamentos utilizados para os complexos processos de secagem das “proteínas brutas”.

É importante ainda ressaltar a presença de lactose em todas as amostras, mostrando que mesmo os suplementos do tipo *whey protein*, comercializados como isentos da mesma, apresentam indícios de sua presença. Outro aspecto a ser ressaltado refere-se ao fato de que as amostras são complexas e geralmente contém diversos minerais e outros ingredientes em sua composição e, quando os mesmos se apresentarem sob a forma cristalina, poderão ser notados picos de difração de raios X em ângulos característicos como pôde ser evidenciado nos difratogramas obtidos e que não foram atribuídos à nenhuma destas espécies químicas em específico.

4.10. DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO

Para determinação da concentração dos micronutrientes minerais sódio e potássio nas amostras de suplementos alimentares, inicialmente recorreu-se à utilização do método de calibração externa como estratégia de trabalho. Para isso, empregou-se uma curva analítica multielementar com concentração variando na faixa de 1,0 a 15,0 mg/L, em meio de ácido nítrico 2% v/v e, as amostras *mix* foram previamente preparadas conforme método descrito anteriormente, visando-se a realização de ensaios de adição e recuperação.

Gráfico 3 – Curvas analíticas utilizadas para determinação de sódio e potássio em amostras de suplementos alimentares por fotometria de chama



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As amostras foram diluídas dez vezes e analisadas por fotometria de chama com emprego de uma curva de calibração externa. A faixa de recuperação obtida para este primeiro teste não foi considerada aceitável, visto os baixos valores observados para a amostra *mix* de hipercalórico: de 48 a 78% para o potássio e de 77 a 87% para o sódio. Para a amostra *mix* de *whey protein* os valores de recuperação também ficaram abaixo do esperado, variando entre 63 a 87% para o sódio e 115 a 230% para o potássio. De maneira geral, os resultados obtidos para a amostras *mix* de *protein bar* ficaram ligeiramente melhores que os das demais amostras, 97 a 111% para o sódio e 102 a 118% para o potássio, mas ainda assim encontram-se fora da faixa de aceitação para recuperação de analito segundo os cálculos obtidos a partir da curva de Horwitz (HORWITZ, 1982), que seria de 95 e 105%.

As divergências encontradas entre os valores esperados e os de concentração real de um analito são uma característica da influência que as propriedades da matriz (viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor, etc.) têm sobre o processo envolvido na medida do sinal analítico e é conhecida como interferência ou efeito de matriz. Sendo assim há de se destacar que a complexidade das amostras avaliadas neste trabalho possa ter contribuído para ocorrência de efeito de matriz significativo, visto que em função da utilização de digestão por micro-ondas, o volume final de digerido e a utilização de ácido nítrico pode ter exercido influência sobre algumas propriedades como a viscosidade da solução de leitura fazendo com que a taxa de aspiração do nebulizador seja menor que

para soluções padrão e assim apresente valores de leitura menores que os valores das soluções padrão.

Uma alternativa de contorno do efeito de matriz foi a utilização do lítio como padrão interno, porém destaca-se que os valores de recuperação obtidos não sofreram grande alteração, permanecendo dentro da mesma faixa citada anteriormente.

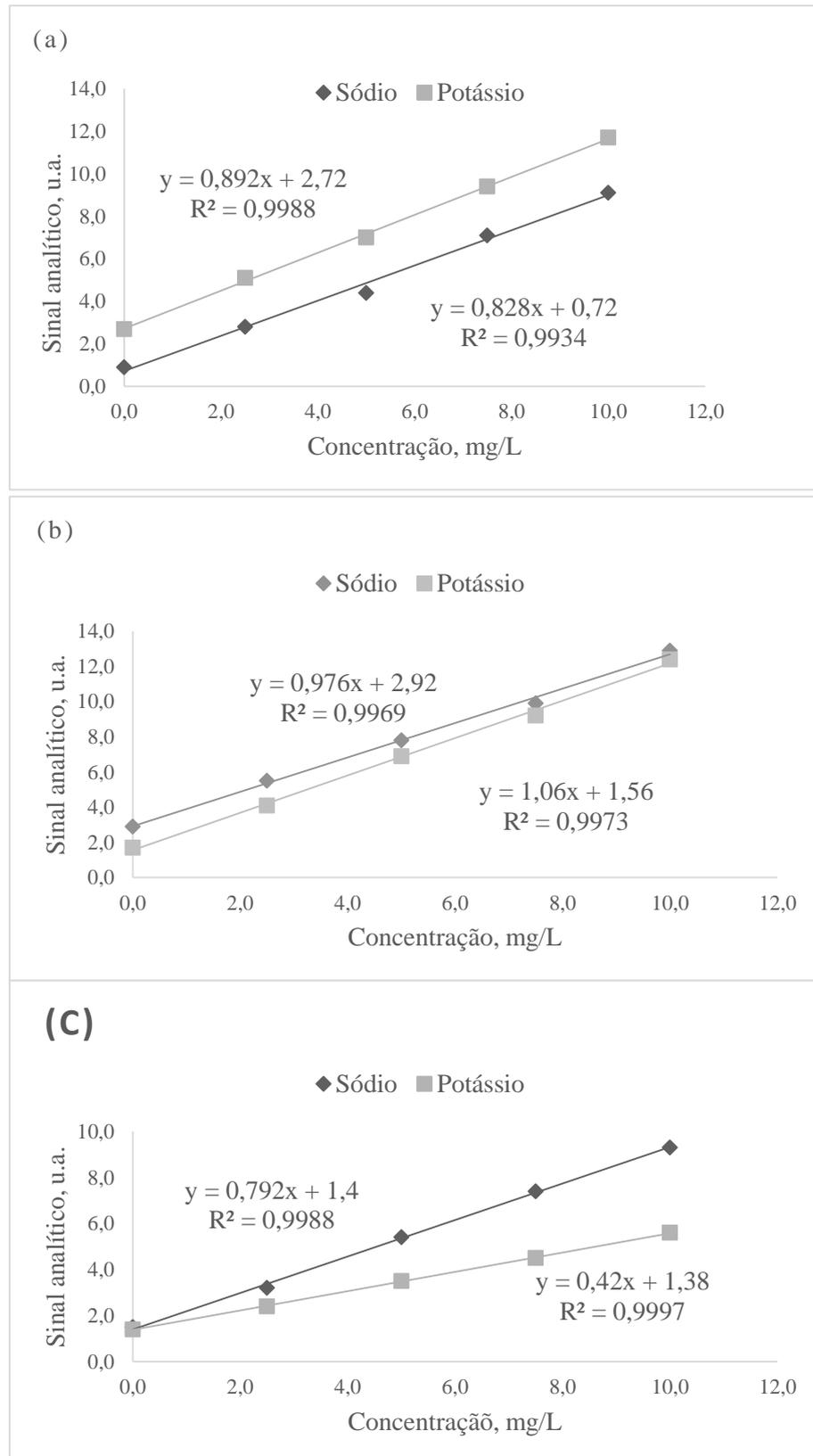
Tendo em consideração que as temperaturas máximas que o GLP pode atingir variam entre 1700 e 1900 °C, pode-se presumir que em função da complexidade da matriz tal temperatura possa não ser suficiente para eliminação de interferentes, de forma que como alternativa a esse problema optou-se pela utilização de álcool etílico na solução de leitura a 10% v/v. Isso poderia aumentar o potencial energético da chama com consequente correção do efeito de matriz. Entretanto, observou-se que tal alternativa também não foi eficiente para minimizar os efeitos observados e os valores de recuperação para os analitos continuaram indicando determinações não quantitativas.

Uma terceira avaliação realizada consistiu em utilizar uma solução 1% v/v de lítio, previamente preparada, como supressor de ionização, pois se durante o processo de excitação estivesse ocorrendo uma ionização demasiada dos analitos, a população de átomos neutros na chama estaria muito reduzida e, por isso, os resultados estariam pouco coerentes. Nesses casos, sabe-se que a adição de um analito que tenha maior potencial de ionização, supressor de ionização, faz com que a população de elétrons na chama aumente e, de acordo com o princípio de Le Chatelier, promove-se um deslocamento no equilíbrio químico de ionização de maneira que a pressão parcial de Na e K nos estados atômicos aumentem. Mesmo assim, os resultados obtidos com o uso do supressos de ionização também não foram satisfatórios e os valores de recuperação permaneceram fora da faixa de aceitação calculada pela da curva de Horwitz.

Considerando que os métodos anteriormente avaliados não forneceram os resultados esperados e que o equipamento utilizado não permite alteração nas condições operacionais, decidiu-se utilizar a curva de calibração por adição de padrão como alternativa de contorno para o problema observado. E, nesta etapa, tomou-se cuidado durante o preparo das amostras para manter a mesma diluição, promovendo assim um efeito de matriz constante sobre todas as medidas dos sinais analíticos. No Gráfico 4 a seguir são destacados alguns exemplos das curvas por adição de padrão obtidas para as amostras avaliadas.

Gráfico 4 – Curva por adição de padrão para amostra: (a) H-2; (b) PB-4; e, (c)

WP-2



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os limites de detecção e quantificação foram estimados através da substituição do desvio padrão do sinal de resposta nas Equações 2 e 3 pelo desvio padrão do coeficiente linear das retas ajustadas das curvas de calibração externa dispostas no Gráfico 3. Considerando o fator de diluição, na Tabela a seguir, estão dispostos os limites estimados instrumentais e do método para determinação de sódio e potássio em amostras de suplementos alimentar.

Tabela 14 – Limites de detecção e quantificação do método e instrumentais obtidos para determinação de sódio e potássio em suplementos alimentares

Amostras	LD (mg/L)	LD (mg/g)	LQ (mg/L)	LQ (mg/g)
Sódio	0,2	0,2	0,6	0,6
Potássio	0,6	0,6	2,0	2,0

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Após a aplicação do método por adição de padrão foram analisadas diversas amostras de suplemento alimentar sendo possível determinar as concentrações de sódio e potássio nas mesmas. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16 a seguir, destacando-se os valores de sódio e potássio ingeridos por porção indicada de produto assim como a comparação com os valores informados nas tabelas nutricionais representada pelo erro relativo.

Tabela 15 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo *Whey Protein*

Amostras	Concentração (mg/g)	mg/Porção	Valor Rotulado (mg)	Erro Relativo (%)
Sódio				
WP-1	1,5	89,4	12,0	644,6
WP-2	1,8	52,8	156,0	-66,1
WP-3	2,1	61,7	54,0	14,3
WP-4	8,8	308,1	196,6	56,7
WP-5	1,2	122,8	47,0	161,4
WP-6	2,7	95,5	64,0	49,3
WP-7	5,6	167,6	33,0	407,8

WP-8	2,1	69,0	85,0	-18,9
WP-9	0,4 ⁽¹⁾	58,9	104,0	-43,4
WP-10	2,5	114,7	161,3	-28,9
WP-11	2,3	75,4	93,0	-18,9
WP-12	1,4	28,8	45,0	-36,0
WP-13	1,3	40,5	61,0	-33,7
WP-14	3,9	129,1	48,0	168,9
WP-15	1,5	37,7	32,0	17,9
Amostras	Concentração (mg/g)	mg/Porção	Valor Rotulado (mg)	Erro Relativo (%)

Potássio

WP-1	14,0	842,9	-	-
WP-2	3,3	98,2	-	-
WP-3	5,0	149,8	-	-
WP-4	10,5	367,9	514,8	-28,5
WP-5	< 0,6 ⁽²⁾	2,0	-	-
WP-6	6,9	240,6	-	-
WP-7	9,1	273,2	21,0	1201,0
WP-8	8,1	263,7	-	-
WP-9	7,0	1123,3	-	-
WP-10	5,1	228,6	-	-
WP-11	7,1	234,9	-	-
WP-12	3,7	74,7	-	-
WP-13	4,7	146,4	-	-
WP-14	6,8	225,1	89,0	152,9
WP-15	33,7	1079,6	-	-

⁽¹⁾ Valor estimado. Acima do LD, mas abaixo do LQ;

⁽²⁾ Menor que Limite de Detecção;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para os suplementos do tipo *whey protein* destacam-se os resultados obtidos para as amostras: WP-3, WP-8, WP-11 e WP-15, que tiveram uma variação da concentração obtida de sódio em função do valor informado pelas tabelas nutricionais destes suplementos menor que 20%, acima ou abaixo do valor tabelado. Por outro lado, as

amostras WP-1, WP-5, WP-7 e WP-14 apresentaram erros relativos elevados, variando entre 161 e 645% para o sódio, indicando uma divergência entre os valores nutricionais informados e aqueles obtidos através do método desenvolvido. Nesse sentido, destacam-se também as amostras WP-7 e WP-14 por também apresentarem ainda elevada variação na concentração de potássio, isto é, com erros relativos de 1201 e 153%, respectivamente.

Tabela 16 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo Hipercalórico

Amostras	Concentração (mg/g)	mg/Porção	Valor Rotulado (mg)	Erro Relativo (%)
Sódio				
H-1	2,7	186,7	184,0	1,5
H-2	0,9	86,9	209,0	-58,4
H-3	0,3 ⁽¹⁾	69,0	130,0	-46,9
H-4	3,5	346,0	80,0	332,5
Amostras	Concentração (mg/g)	mg/Porção	Valor Rotulado (mg)	Erro Relativo (%)
Potássio				
H-1	6,5	453,3	-	-
H-2	3,0	304,6	1500,0	-79,7
H-3	< 0,6 ⁽²⁾	100,4	-	-
H-4	2,8	564,4	-	-

⁽¹⁾ Valor estimado. Acima do LD, mas abaixo do LQ;

⁽²⁾ Menor que Limite de Detecção;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados obtidos para a determinação de sódio em amostras de hipercalórico indicam que apenas uma das amostras, H-1, apresentou boa correlação entre o valor de concentração obtido e o valor informado pela tabela nutricional. A amostra H-4 é destacada pelo fato de que o valor informado é consideravelmente inferior ao valor obtido, de forma que um erro relativo de aproximadamente 333% foi encontrado. Já para as amostras H-2 e H-3 as concentrações calculadas ficaram abaixo dos valores tabelados, tanto para o sódio quanto para o potássio, o qual é informado nas tabelas nutricionais apenas para a amostra H-2.

Tabela 17 – Resultados para determinação de Na e K em amostras de suplementos alimentares do tipo *Protein Bar*

Amostras	Concentração (mg/g)	mg/Barrinha	Valor Rotulado (mg)	Erro Relativo (%)
Sódio				
PB-1	5,4	177,2	37,0	379,0
PB-2	3,0	89,0	94,0	-5,3
PB-3	1,7	51,3	26,0	97,2
PB-4	1,4	57,6	95,0	-39,4
PB-5	2,2	97,9	98,0	-0,1
PB-6	2,6	121,9	75,0	62,5
PB-7	4,4	176,2	22,0	701,0
Potássio				
PB-1	18,2	600,0	170,0	253,0
PB-2	5,2	156,8	-	-
PB-3	2,4	71,8	-	-
PB-4	1,5 ⁽¹⁾	59,2	-	-
PB-5	3,0	136,6	-	-
PB-6	6,6	303,3	-	-
PB-7	5,9	235,5	-	-

⁽¹⁾ Valor estimado. Acima do LD, mas abaixo do LQ;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A partir dos resultados é possível observar que para algumas amostras, como por exemplo PB-1 e PB-7, há uma divergência alta entre os valores de concentração de sódio calculados e os valores informados pelas tabelas nutricionais desses suplementos, tal divergência fica explícita pela variação do erro relativo de 379 a 701% para as duas amostras respectivamente. Destaca-se que apenas uma das amostras, PB-1, apresenta em sua tabela nutricional informações relativas à presença de potássio e a mesma também apresentou uma variação bastante significativa para concentração calculada e a informada, sendo o erro relativo próximo a 253%. De maneira geral, observa-se que em apenas duas das sete amostras, PB-2 e PB-5, os valores encontrados de sódio estavam de acordo com os valores rotulados. Para as outras amostras observa-se que as concentrações

obtidas estavam acima dos valores esperados, com exceção para a amostra PB-4, que apresentou valores menores que os informados pela tabela nutricional.

Por fim, de modo análogo ao realizado para as determinações de cromo, um conjunto aleatório das amostras estudadas foi formado e encaminhado para análises por ICP-MS. Os resultados obtidos para a análise por ICP-MS podem ser conferidos na Tabela 17 a seguir, assim como os respectivos resultados obtidos por fotometria de chama.

Tabela 18 – Comparação entre os valores de concentração de sódio e potássio obtidos por fotometria de chama e ICP-MS

Amostras	Sódio ⁽¹⁾		Potássio ⁽²⁾	
	Fotometria de Chama (mg/L)	ICP-MS (mg/L)	Fotometria de Chama (mg/L)	ICP-MS (mg/L)
WP-6 ⁽¹⁾ – WP-3 ⁽²⁾	27,8	25,7	50,0	57,0
WP-7 ⁽¹⁾ – WP-4 ⁽²⁾	56,8	59,5	106,5	95,4
WP-13 ⁽¹⁾ – WP-11 ⁽²⁾	13,1	16,3	71,6	69,5
H-1	27,1	21,8	65,8	55,5
H-2	8,7	7,8	30,5	24,3
PB-5	22,0	23,2	30,7	28,1
PB-6	27,0	28,4	67,2	57,6
PB-7	44,9	50,1	60,0	57,4

⁽¹⁾ Amostras utilizadas para comparação do sódio;

⁽²⁾ Amostras utilizadas para comparação do potássio.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Inicialmente foi realizada uma comparação estatística através do teste F entre as variâncias das concentrações de sódio e potássio obtidas por fotometria de chama e ICP-MS. Obteve-se como resultado os valores de $F_{calculado}$ 1,193 para as variâncias do sódio e 1,349 para o potássio, enquanto que o valor de $F_{crítico}$ é tabelado em 3,787. Dessa forma, pode-se afirmar que a 95% de confiança as variâncias dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas para sódio e potássio são comparáveis.

As médias das concentrações de sódio e potássio foram comparadas estatisticamente através do teste t de Student. O valor de $t_{calculado}$ foi 0,573 e 2,214 para o sódio e potássio, respectivamente, enquanto que o valor de $t_{crítico}$ é tabelado em 2,365.

Dessa forma, $t_{calculado}$ é menor que $t_{crítico}$ podemos afirmar que a 95% de confiança as médias de concentração obtidas são estatisticamente comparáveis.

Atualmente a razão entre os teores de Na e K (Na/K) tem associação com a hipertensão incidente, sendo um parâmetro mais forte que a ingestão de sódio ou de potássio isoladamente. Dessa forma, a OMS recomenda que para dietas saudáveis tal razão permaneça ≤ 1 . Utilizando os resultados de concentração de sódio e potássio, obtidos através do método por fotometria de chama, foi possível calcular a razão entre os micronutrientes para as amostras estudadas e apresentá-las nas Tabelas 18, 19 e 20 a seguir.

Tabela 19 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de *whey protein*

Amostras	Na/K
WP-1	0,11
WP-2	0,54
WP-3	0,41
WP-4	0,84
WP-5	-
WP-6	0,40
WP-7	0,61
WP-8	0,26
WP-9	-
WP-10	0,50
WP-11	0,32
WP-12	0,39
WP-13	0,28
WP-14	0,57
WP-15	0,03

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Já para as amostras de suplementos do tipo *whey protein* as razões de concentrações entre sódio e potássio variaram na faixa de 0,03 a 0,84. Destaca-se que para a amostra WP-5 não foi possível detectar a presença de potássio através do método

desenvolvido, o que inviabilizou o cálculo da razão entre as concentrações de sódio e potássio.

Tabela 20 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de hipercalórico

Amostras	Na/K
H-1	0,41
H-2	0,29
H-3	-
H-4	0,61

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados apresentados para as razões dos teores de Na e K variaram na faixa de 0,29 a 0,61 e sugerem que todos os suplementos do tipo hipercalórico que foram avaliados neste trabalho se estabelecem dentro do limite indicado pela OMS para dietas saudáveis, ou seja, razões menores que 1,0.

Tabela 21 – Razão entre as concentrações de sódio e potássio para as amostras de *protein bar*

Amostras	Na/K
PB-1	0,30
PB-2	0,57
PB-3	0,71
PB-4	-
PB-5	0,72
PB-6	0,40
PB-7	0,75

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para os suplementos avaliados do tipo *protein bar* os resultados para as razões de Na/K variaram na faixa de 0,30 a 0,75, estabelecendo-se também numa faixa aceitável e recomendada pela OMS.

Ressalta-se que as concentrações de sódio por porção indicada para os suplementos variaram na faixa de 87 a 346 mg para o hipercalórico; de 51 a 177 mg para o *protein bar*; e, de 29 a 308 mg para o *whey protein*. Já as concentrações de potássio variaram na faixa de 305 a 565 mg para o hipercalórico; de 72 a 600 mg para o *protein bar*; e, de 75 a 1125 mg para o *whey protein*.

De maneira geral, pode-se considerar que os valores de sódio por porção indicada são altos quando comparados com as indicações de consumo diário, máximo de 2000 mg (segundo a OMS), pois há ainda de se considerar que o sódio e potássio são comuns na dieta diária.

5. CONCLUSÕES

Para possibilitar a determinação de cromo nas amostras de suplementos alimentares fez-se necessário realizar uma etapa de solubilização das amostras, onde foi escolhida a digestão assistida por radiação micro-ondas. Em função dos níveis de cromo observado nas amostras a partir dos testes preliminares, foi utilizada a espectrometria de absorção atômica no modo de atomização eletrotérmica (GF AAS) e, para isto, otimizou-se as temperaturas de pirólise e atomização para cada uma das amostras. Após a otimização das condições instrumentais, observou-se que duas das amostras podem ser analisadas nas mesmas condições, *whey protein* e hipercalórico, enquanto que a amostra de *protein bar* é analisada em condições ligeiramente diferentes para que o desempenho analítico seja igualmente satisfatório.

Destaca-se que nas condições experimentais estabelecidas foram obtidas evidências de análises com boa exatidão empregando calibração externa, construídas em meio de ácido nítrico diluído. Além disso, o método desenvolvido apresentou uma boa sensibilidade, com valores de massa característica de 2,8 pg para as amostras de *whey protein* e hipercalórico e 2,7 pg para as amostras de *protein bar*, condizentes com aqueles reportados na literatura para determinações de cromo em amostras com características semelhantes.

Os resultados obtidos para a concentração de cromo nos suplementos alimentares estudados apresentaram-se superiores às informações nutricionais tabeladas, de maneira que em algumas das amostras foi detectada a presença do micronutriente mesmo quando sua presença não era informada no rótulo do suplemento. Embora a legislação brasileira não exija obrigatoriedade em informar a presença do referido nutriente, constatou-se que em alguns casos a concentração de cromo ultrapassa o limite de ingestão diária recomendado, o que caracteriza essas amostras como medicamentos e não suplementos.

Pode-se inferir que essa diferença entre os valores nutricionais informados e os valores obtidos através do método desenvolvido para determinações de cromo nas amostras de suplementos alimentares do tipo *whey protein*, *protein bar* e hipercalórico, pode ser influenciada por problemas de contaminação e/ou qualidade das matérias-primas e/ou deficiências no controle de qualidade desses produtos. Portanto, os resultados obtidos aqui tornam-se um alerta para que a avaliação destes produtos englobe também elementos minerais, devido ao risco de ingestão de minerais em excesso.

Tendo como motivação os resultados obtidos para concentração de cromo, foi realizado um estudo utilizando a difração de raios X de policristais como ferramenta de investigação do estado de oxidação do cromo nas amostras estudadas. Neste estudo observou-se que as três amostras avaliadas apresentavam picos de difração característicos da presença do ingrediente picolinato de cromo, cujo estado de oxidação é + 3. Porém, para as amostras de *whey protein* e hipercalórico, também foram observados picos de difração para o cromo no estado de oxidação +6, referentes à presença de CrO_3 , o que é preocupante do ponto de vista toxicológico.

Já para a determinação dos nutrientes sódio e potássio, realizadas por espectrometria de emissão atômica em chama, foi necessário avaliar diferentes alternativas de calibração. O efeito de matriz constatado nessas análises levou ao uso do método de adição de padrão, que permitiu determinar as concentrações dos nutrientes nas amostras de suplementos com boa exatidão. Ressalta-se que a legislação vigente obriga os fabricantes a declararem a informação do teor de sódio em produtos alimentares e para as amostras avaliadas foram observadas diferenças significativas entre os valores informados e os valores encontrados. Para algumas amostras de *protein bar*, por exemplo, foram constatadas diferenças de 380 e 700%. Para o potássio também foram observadas diferenças semelhantes.

Foi calculada a razão Na/K e observou-se que os valores permaneceram abaixo de 1, conforme indicação da OMS para dietas saudáveis. Porém, há de se ressaltar que foram observadas também diferenças entre as concentrações reais de micronutrientes e as informações nutricionais declaradas, de maneira que mesmo que a razão Na/K apresente-se abaixo do limite recomendado o consumo de sódio e potássio pode estar permanecendo elevado.

Os resultados apresentados neste trabalho comprovam a importância do estudo realizado, assim como nos remete à necessidade de realizar novos estudos que visem a determinação de outros nutrientes em amostras de suplementos alimentares e também à necessidade de um estudo de especificação do cromo presente nessas amostras, visto que outro aspecto relacionado aos suplementos alimentares é que, geralmente, seu consumo é realizado sem acompanhamento profissional adequado, combinado ainda com outros produtos e, até mesmo em doses excessivas.

REFERÊNCIAS

ABENUTRI. FiSA 2015. 2015. Disponível em: < <http://www.abenutri.org/fisa-2015/> >. Acesso em: 01/10/2015.

ADROGUÉ, H. J.; MADIAS, N. E. Sodium surfeit and potassium deficit: Keys to the pathogenesis of hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 8, n. 3, p. 203-213, 2014.

ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Uso de suplementos alimentares por adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 85, p. 287-294, 2009.

ANVISA. **Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais**. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 2005a.

ANVISA. **Rotulagem Nutricional Obrigatória - Manual de Orientação às Indústrias de Alimentos**: 44 p. 2005b.

ANVISA. Anvisa alerta para risco de consumo de suplemento alimentar. Portal Anvisa, 2012. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar> >. Acesso em: 15/09/2014.

ANVISA. **Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**: Diário Oficial da União. RDC nº 32, de 29 de agosto de 2013 2013.

ANVISA. **Resolução-RE Nº 728, de 28 de fevereiro de 2014**: Diário Oficial da União. Seção 1, Nº 42, sexta-feira, 28 de fevereiro de 2014 2014.

ASCHERIO, A. et al. Intake of Potassium, Magnesium, Calcium, and Fiber and Risk of Stroke Among US Men. **Circulation**, v. 98, n. 12, p. 1198-1204, 1998.

AVULA, B. et al. Quantitative Determination of Multiple Elements in Botanicals and Dietary Supplements Using ICP-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8887-8894, 2010.

AZEVEDO, F. A. D.; CHASIN, A. A. D. M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. 1. 2003.

BARBOSA JR, F. et al. Evaluation of electrodeposited tungsten chemical modifier for direct determination of chromium in urine by ETAAS. **Microchemical Journal**, v. 78, n. 1, p. 7-13, 2004.

BERNER, T. O.; MURPHY, M. M.; SLESINSKI, R. Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 1029-1042, 2004.

BISI MOLINA, M. D. C. et al. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 743-750, 2003.

BOLZAN, R. C. **Determinação de Arsênio e Cromo em Insumos Farmacêuticos contendo Enxofre por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite e Análise Direta de Amostras Sólidas**. 2007. 125 (Doutorado em Química Analítica). Universidade Federal de Santa Maria

BRASIL. **Níveis de Dosagens Diárias de Vitaminas e Minerais em Medicamentos**: Diário Oficial da União. Portaria nº 40, de 13 de janeiro de 1998 1998a.

BRASIL. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais**: Diário Oficial da União. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998 1998b.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Série A. Normas e Manuais Técnicos: 2010 p. 2006.

BRITO, N. M. et al. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 18, 2003.

BRIZIO, P. et al. Heavy metals occurrence in Italian food supplements. **E3S Web Conference**, v. 1, p. 3, 2013.

BRUHN, C. G. et al. Study of chemical modifiers for the determination of chromium in biological materials by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 364, n. 3, p. 273-278, 1999.

BUNNER, S. P.; MCGINNIS, R. Chromium-Induced Hypoglycemia. **Psychosomatics**, v. 39, n. 3, p. 298-299,

C.C.E. **Métodos de Amostragem e de Análise para o Controle Oficial dos Teores de Chumbo, Cádmio, Mercúrio, Estanho na Forma Inorgânica, 3-MCPD e Benzo(a)pireno nos Gêneros Alimentícios**: Comissão das Comunidades Europeias (CCE). Regulamento CE, nº 333, de 28 de março de 2007 2007.

CABRERA-VIQUE, C.; BOUZAS, P. R. Chromium and manganese levels in convenience and fast foods: In vitro study of the dialyzable fraction. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 757-763, 2009.

CERULLI, J. et al. Chromium Picolinate Toxicity. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, n. 4, p. 428-431, 1998.

CODEX. **Codex Alimentarius. Recommended Methods for Analysis and Sampling. CODEX STAN 234**. Commission, C.A. WHO Food Standards Programme: 48 p. 1999.

COŞKUN, N.; AKMAN, S. Direct determination of manganese in vitamin–mineral tablets using solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 496-500, 2004.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4ª Edição. 2012.

DA SILVA, D. G. et al. A procedure using slurry sampling for the determination of manganese in corn flour by ET AAS. **Analytical Methods**, v. 3, n. 11, p. 2625-2629, 2011.

DE LA FUENTE, M. A.; GUERRERO, G.; JUAREZ, M. Manganese and Zinc Analysis in Milk by Microwave Oven Digestion and Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2406-2410, 1995.

DOBROWOLSKI, R.; PAWLOWSKA-KAPUSTA, I.; DOBRZYNSKA, J. Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 597-602, 2012.

DU, S. et al. Understanding the patterns and trends of sodium intake, potassium intake, and sodium to potassium ratio and their effect on hypertension in China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 2, p. 334-343, 2014.

EVANS, E. H. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 6, p. 779-800, 2013.

F.D.A. **Dietary Supplement Health and Education Act of 1994**. Public Law 103-417. 103rd Congress: US Food and Drug Administration 1994.

FOWLER, J. F. Systemic contact dermatitis caused by oral chromium picolinate. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 9, n. 1, p. 62, 1998.

G.M.C. **Limites Máximos de Tolerância para Contaminantes Inorgânicos**: Grupo Mercado Comum. Resolução MERCOSUL, N° 102 1994.

GARCÍA-RICO, L.; LEYVA-PEREZ, J.; JARA-MARINI, M. E. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1599-1605, 2007.

GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, p. 262-266, 2005.

GOMES, R. M. L. **Consumo de Suplementos Alimentares em Frequentadores de Ginásio na Cidade de Coimbra**. 2010. 70 (Mestrado em Medicina do Desporto). Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

GOSTON, J. L. **Prevalência do uso de suplementos nutricionais entre praticantes de atividade física em academias de Belo Horizonte: Fatores associados.** 2008. 75 (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. D.; PAULA, H. D. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 479-488, 2006.

HARO, M. I. G.; VÁZQUEZ, M. N. B.; PACHECO, R. M. C. Contenido de cromo en alimentos y estimación de su ingestión dietaria en el noroeste de México. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 1, p. 11, 2001.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67A-76A, 1982.

HOSSEINI, M. S.; BELADOR, F. Cr(III)/Cr(VI) speciation determination of chromium in water samples by luminescence quenching of quercetin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, n. 1-3, p. 1062-1067, 2009.

I.O.M. **DRI - Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.** Whashington, D.C. National Academy Press: Institute of Medicine 510-521 p. 2002.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz: 1020 p. 2008.

IEGGLI, C. V. S. et al. Determination of aluminum, copper and manganese content in chocolate samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a microemulsion technique. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 465-468, 2011.

INMETRO. **Relatório Final sobre a Análise em Suplementos Proteicos para Atletas - Whey Protein.** Programa de Análise de Produtos 2014.

KORFALI, S. I.; HAWI, T.; MROUEH, M. Evaluation of heavy metals content in dietary supplements in Lebanon. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 10-10, 2013.

KOVÁCS, R. et al. Investigation of chromium content in foodstuffs and nutrition supplements by GFAAS and determination of changing Cr(III) to Cr(VI) during baking and toasting bread. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1209-1213, 2007.

KRAWCZYK, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 377-384, 2014.

KREJČOVÁ, A. et al. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 171-178, 2006.

KREJČOVÁ, A. et al. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 588-596, 2012.

KRZYSIK, M.; GRAJETA, H.; PRESCHA, A. Chromium content in selected convenience and fast foods in Poland. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 208-212, 2008.

LINHARES, T. C.; LIMA, R. M. Prevalência do uso de suplementos alimentares por praticantes de musculação nas academias de Campos dos Goytacazes/RJ, Brasil. **Vértices**, v. 8, n. 1/3, p. 22, 2006.

MALTEZ, H. F.; CARASEK, E. Chromium speciation and preconcentration using zirconium(IV) and zirconium(IV) phosphate chemically immobilized onto silica gel surface using a flow system and F AAS. **Talanta**, v. 65, n. 2, p. 537-542, 2005.

MARRERO, J. et al. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate? **Microchemical Journal**, v. 108, p. 81-86, 2013.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Second Edition. Elsevier Health - UK, 2003.

MERTZ, W.; ROGINSKI, E. E. Effects of Chromium(III) Supplementation on Growth and Survival Under Stress in Rats Fed Low Protein Diets. **The Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 531-536, 1969.

MILLER-IHLI, N. J. Slurry sampling for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 3, p. 271-274, 1990.

MINAMI, H. et al. Direct Determination of Chromium in Biological Materials by Solid-Sampling Atomic Absorption Spectrometry: Application of Three-Point Estimation-Standard Addition Method. **Microchemical Journal**, v. 49, n. 2-3, p. 126-135, 1994.

MORET, S.; PREVARIN, A.; TUBARO, F. Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1232-1238, 2011.

NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 2ª Edição. Campinas-SP: 2001.

NUBLAT, J. **Anvisa retira do mercado lotes de 20 suplementos com 'whey protein'**. Folha de São Paulo 2014.

OGUNBILEJE, J. O. et al. Lead, mercury, cadmium, chromium, nickel, copper, zinc, calcium, iron, manganese and chromium (VI) levels in Nigeria and United States of America cement dust. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2743-2749, 2013.

OLIVEIRA, E. D. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.

ÖZCAN, M.; AKMAN, S. Investigation of the effect of some inorganic salts on the determination of tin in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 5, p. 509-515, 2000.

PHAM, T. H. N. et al. Solid-State Structural Studies of Chromium(III) Nicotinato Nutritional Supplements. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 10685-10694, 2014.

PRAAMSMA, M. L.; ARNASON, J. G.; PARSONS, P. J. Monitoring Mn in whole blood and urine: a comparison between electrothermal atomic absorption and inorganic mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 6, p. 1224-1232, 2011.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Speciation of chromium by in-capillary derivatization and electrophoretically mediated microanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1113, n. 1-2, p. 244-250, 2006.

REIS, F. D. D. **Síntese e Estudos Espectroscópicos e Estruturais de Esquarainas Derivadas da Isoniazida**. 2014. 87 Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora

SANTOS, A. Sódio, potássio, cloro e bicarbonato da dieta: efeitos na pressão arterial edoença cardiovascular. 2009.

SARACOGLU, S. et al. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 280-285, 2007.

SCHWARZ, K.; MERTZ, W. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 515-518, 1957.

SILVA, A. S. et al. Direct determination of chromium in infant formulas employing high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and solid sample analysis. **Talanta**, v. 144, p. 39-43, 2015.

SLAVIN, W. Trace Element Analysis in Biological Materials Graphite furnace AAS for biological materials. **Science of The Total Environment**, v. 71, n. 1, p. 17-35, 1988.

SOARES, V. A. et al. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 45-49, 2010.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I. Chromium content in different kinds of Spanish infant formulae and estimation of dietary intake by infants fed on reconstituted powder formulae. **Food Additives And Contaminants**, v. 23, n. 11, p. 1157-1168, 2006.

SORIANO, S.; NETTO, A. D. P.; CASSELLA, R. J. Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms

or tablets after an acidic extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 304-310, 2007.

STEARNS, D. M. et al. Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1643-8, 1995.

SUKSOMBOON, N.; POOLSUP, N.; YUWANAKORN, A. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of chromium supplementation in diabetes. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 3, p. 292-306, 2014.

SUN, Y. et al. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 129-136, 2000.

THOMAIDIS, N. S.; PIPERAKI, E. A. Effect of chemical modifiers on the kinetic parameters characterizing the electrothermal atomization of chromium. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 6, p. 611-627, 2000.

TINGGI, U.; REILLY, C.; PATTERSON, C. Determination of manganese and chromium in foods by atomic absorption spectrometry after wet digestion. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 123-128, 1997.

TOKALIOĞLU, Ş. et al. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v. 150, p. 321-327, 2014.

TOKMAN, N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, n. 1-2, p. 87-94, 2007.

TOMAZONI, T.; SIVIERO, J. Consumo de potássio de idosos hipertensos participantes do Programa Hipertensão do município de Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 5, 2009.

TSALEV, D. L. et al. Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry — advances, anticipations and reality. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 5, p. 473-490, 2000.

VIÑAS, P. et al. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of molybdenum, aluminium, chromium and manganese in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 356, n. 2-3, p. 267-276, 1997.

VINCENT, J. B. The Biochemistry of Chromium. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 715-718, 2000.

VINCENT, J. The Potential Value and Toxicity of Chromium Picolinate as a Nutritional Supplement, Weight Loss Agent and Muscle Development Agent. **Sports Medicine**, v. 33, n. 3, p. 213-230, 2003.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. Third, Completely Revised Edition. Weinheim, New York, Chichester, Toronto, Brisbane, Singapore: 1999.

WHO. WHO issues new guidance on dietary salt and potassium. 2013. Disponível em: <
http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt_potassium_20130131/en/>.
Acesso em: 06/06/2016.

XI, L. et al. Associations between serum potassium and sodium levels and risk of hypertension: a community-based cohort study. **Journal of Geriatric Cardiology : JGC**, v. 12, n. 2, p. 119-126, 2015.

ZHANG, Z. et al. Association between Usual Sodium and Potassium Intake and Blood Pressure and Hypertension among U.S. Adults: NHANES 2005-2010. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75289, 2013.

ZHURAVLEV, A. et al. Direct atomic absorption spectrometry determination of arsenic, cadmium, copper, manganese, lead and zinc in vegetable oil and fat samples with graphite filter furnace atomizer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 62-68, 2015.

**ANEXO 1. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS OTIMIZADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS
ALIMENTARES**

Durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado o espectrômetro de absorção atômica que vinha sendo utilizado apresentou problemas técnicos e necessitou de manutenção especializada. Infelizmente por razões de ordem técnica e limitações logísticas, não foi possível concluir o estudo que já estava em curso, sobre a determinação de manganês nas amostras de suplementos alimentares. A seguir estão dispostos os dados que puderam ser coletados, relativos ao desenvolvimento do método analítico.

Avaliando os resultados referentes aos testes preliminares, verificou-se a presença de manganês em algumas amostras, justificando assim o desenvolvimento de um método para determinação deste micronutriente. Com objetivo de avaliar as melhores condições instrumentais do programa de aquecimento a ser utilizado foi aplicado um planejamento fatorial 3^2 , dois fatores (pirólise e atomização) e três níveis, com triplicata no ponto central totalizando 11 experimentos.

Tabela 22 – Planejamento experimental para determinação das temperaturas de pirólise e atomização de manganês em amostras de suplementos alimentares

Experimento	Fator Pirólise (X₁)	Fator Atomização (X₂)
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	1
9	1	-1
10	1	0
11	1	1

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR

Os níveis avaliados foram determinados a partir de pesquisa bibliográfica onde observou-se as temperaturas ótimas de pirólise e atomização para diversos tipos de matrizes como, por exemplo: leite e leite desnatado (DE LA FUENTE *et al.*, 1995; TINGGI *et al.*, 1997; VIÑAS *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2010), suplementos multivitamínicos e minerais (COŞKUN & AKMAN, 2004; TOKMAN, 2007; KRAWCZYK, 2014), chocolate (IEGGLI *et al.*, 2011), sangue e urina (PRAAMSMA *et al.*, 2011), óleo e gordura vegetal (ZHURAVLEV *et al.*, 2015), entre outros (DA SILVA *et al.*, 2011; OGUNBILEJE *et al.*, 2013). Foram definidas as temperaturas 700, 1050 e 1400°C como níveis -1, 0 e 1, respectivamente, para o fator “pirólise”. Enquanto, para o fator “atomização” os níveis -1, 0 e 1, corresponderam às temperaturas 1800, 2150 e 2500°C, respectivamente. Para a obtenção dos sinais de absorvância integrada, destaca-se que os experimentos foram realizados de forma randômica para cada tipo de suplemento, sem utilização de modificador químico e em tubo de grafite com revestimento pirolítico.

Tabela 23 – Valores de absorvância integrada obtida para as amostras de suplementos alimentares após realização do planejamento de experimento

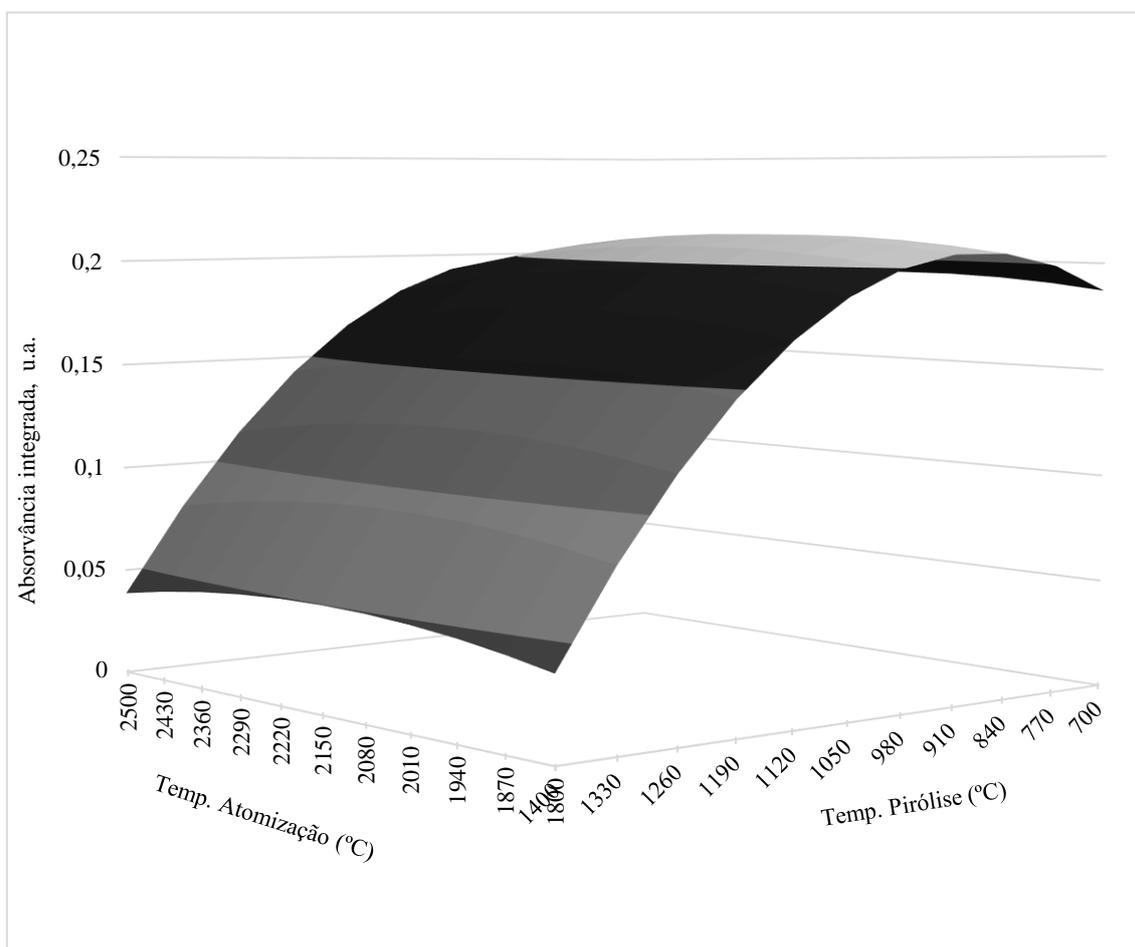
Experimentos	Absorvância Integrada (u.a.)		
	Hipercalórico	Whey Protein	Protein Bar
1	0,1883	0,1241	0,1130
2	0,1952	0,1064	0,1133
3	0,1712	0,1340	0,1200
4	0,1773	0,1475	0,1144
5	0,1819	0,1336	0,1192
6	0,0481	0,0264	0,0423
7	0,0361	0,0399	0,0566
8	0,0428	0,0384	0,0522
9	0,2028	0,1482	0,1153
10	0,1943	0,1459	0,1220
11	0,2019	0,1471	0,1193

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os sinais de resposta obtidos, absorvância integrada, expostos na Tabela 22, foram empregados nos cálculos referentes ao planejamento experimental escolhido. Como

resultado foram obtidas três superfícies de resposta correlacionadas a cada tipo de suplemento alimentar estudado. Utilizando as equações dessas superfícies e a partir de avaliação crítica de suas curvaturas foram extraídos os valores de temperatura ótima para os fatores temperatura de pirólise e temperatura de atomização. Nos Gráficos 6, 7 e 8 a seguir estão dispostas as superfícies de resposta.

Gráfico 5 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de hipercalórico

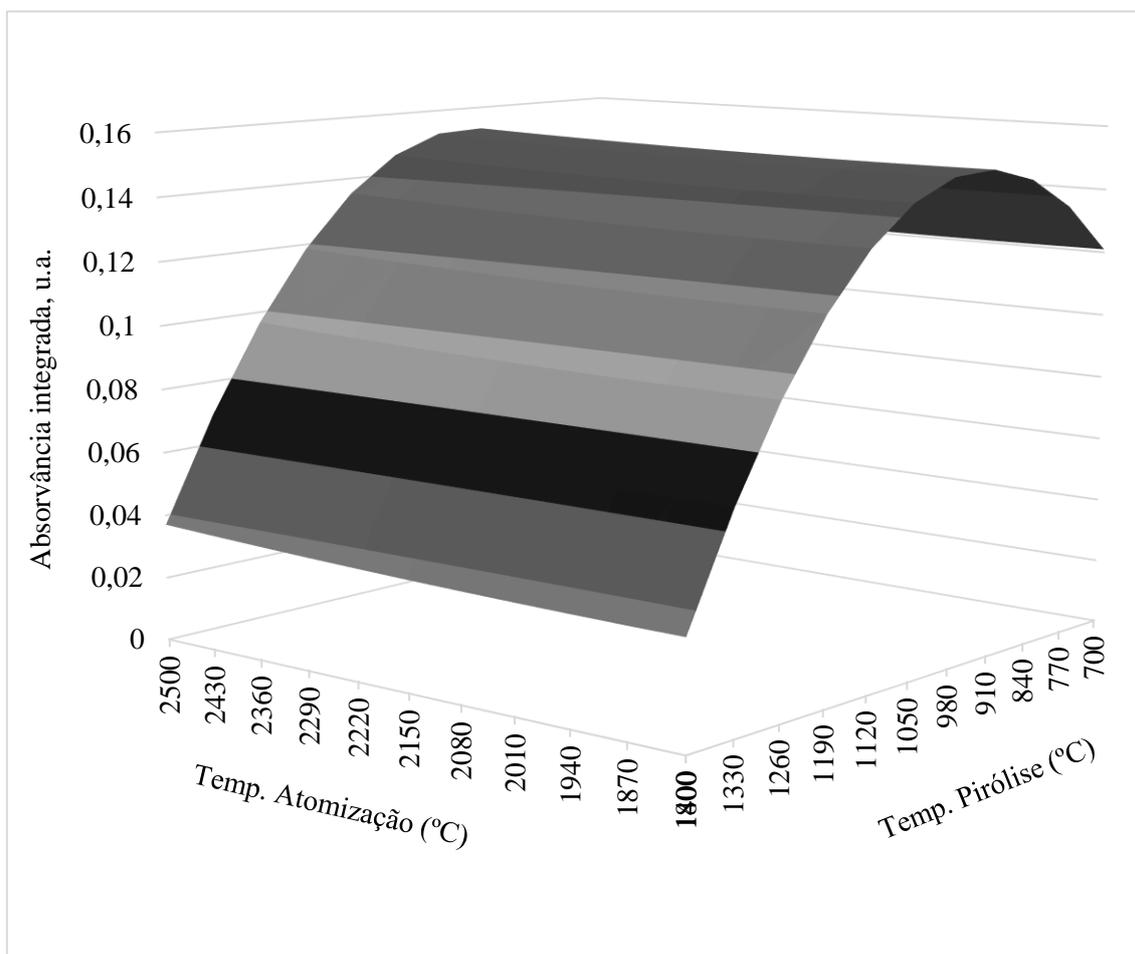


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O tratamento de dados para a amostra de hipercalórico evidencia que apenas os coeficientes da equação da superfície de resposta relativos ao fator temperatura de pirólise são significativos, ou seja, a variação da temperatura de atomização não exerce influência sobre o sinal de resposta e nem sobre a temperatura do primeiro fator. Observando a superfície, pode-se verificar que com aumento de temperatura de atomização não há

variação significativa na absorvância integrada onde o máximo observado fica próximo a uma temperatura de pirólise de 900°C. Dessa forma, a partir dos dados equacionais, foram calculadas como ótimas as temperaturas de 885 e 2175°C para pirólise e atomização, respectivamente.

Gráfico 6 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de *whey protein*

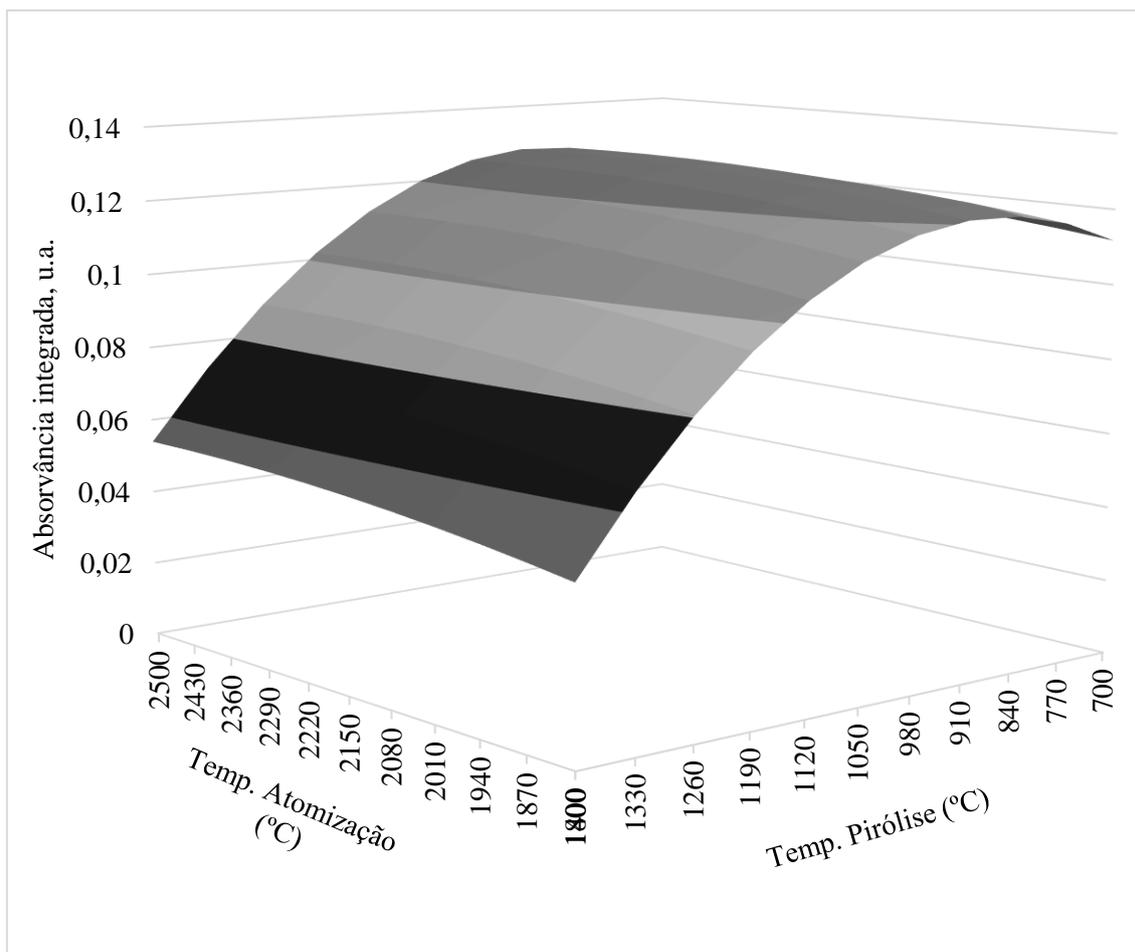


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De forma semelhante às amostras de hipercalórico, para as amostras de *whey protein* e *protein bar* o tratamento de dados evidencia que apenas os coeficientes da equação da superfície de resposta relativos ao fator temperatura de pirólise são significativos, o que pode ser verificado através do formato das superfícies onde não se observa dependência da temperatura de pirólise com a temperatura de atomização e a absorvância integrada tem máximo observado também próximo a temperatura de pirólise

de 900°C. Para a amostra de *whey protein* os cálculos indicam temperatura ótima de pirólise de 935°C e atomização de 1920°C, enquanto que para a amostras de *protein bar* 885 e 2370°C para pirólise e atomização, respectivamente.

Gráfico 7 – Superfície de resposta para o planejamento experimental para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização em amostras de *protein bar*



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Através da análise de regressão, os modelos foram avaliados onde verificou-se que os valores de $F_{calculado}$ apresentaram-se menores que os valores de $F_{tabelado}$, 19,2, assumindo-se assim que não houve falta de ajuste nos métodos propostos. Foi avaliada também a significância das regressões observando que os valores de $F_{calculado}$ foram consideravelmente superiores aos valores tabelados, 5,05. Na Tabela 23 a seguir estão dispostas as equações das superfícies de respostas apresentadas acima e os valores de F calculados. Como os valores calculados para a significância da regressão foram no

mínimo 10 vezes os valores tabelados, pode-se considerar que a regressão é altamente significativa e útil para fins de previsão (NETO *et al.*, 2001).

Tabela 24 – Equações das superfícies de resposta para otimização das condições instrumentais para determinação de manganês em amostras de suplemento alimentar e valores de F calculado para falta de ajuste e regressão

Hipercalórico	
Equação	$Y = 0,196 - 0,071X_1 - 0,003X_2 - 0,075X_1^2 - 0,011X_2^2 + 0,003X_1X_2$
$F_{falta\ de\ ajuste}$	0,6667
$F_{regressão}$	92,58
Whey Protein	
Equação	$Y = 0,144 - 0,043X_1 + 0,001X_2 - 0,066X_1^2 + 0,001X_2^2 + 0,0005X_1X_2$
$F_{falta\ de\ ajuste}$	0,6667
$F_{regressão}$	36,51
Protein Bar	
Equação	$Y = 0,119 - 0,033X_1 + 0,004X_2 - 0,034X_1^2 - 0,003X_2^2 + 0,001X_1X_2$
$F_{falta\ de\ ajuste}$	0,6667
$F_{regressão}$	121,4

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Considerando que para os modelos desenvolvidos a temperatura de atomização não representa um fator significativo para a obtenção de sinal de resposta máximo, optou-se pela utilização de uma temperatura menor que aquelas calculadas, 1950°C, como alternativa para preservação da vida útil do tubo de grafite. Para os diferentes tipos de amostras avaliados temperaturas próximas a 900°C representam a região da superfície de resposta onde são obtidos os maiores sinais de resposta, dessa forma recomenda-se testar esta temperatura de pirólise para os três tipos de amostras estadadas.

Por fim, destaca-se a necessidade de se realizar ainda ensaios de adição e recuperação de analito para assim aplicar o método às amostras de *whey protein*, hipercalórico e *protein bar*. Estes ensaios deverão mostrar se as temperaturas propostas para o aquecimento do forno estão realmente adequadas para uma análise com boas exatidão e precisão.

ANEXO 2. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

CONGRESSOS

SOUSA, R.A., LISBOA, T.P., “Determinação de Fe e Zn em queijos *petit suisse*: aspectos analíticos e teores encontrados em amostras comerciais”. Trabalho apresentado na forma de painel no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, novembro de 2014.

ARTIGOS PUBLICADOS

SOUSA, R. A.; LISBOA, T.P. “Determinação de Fe e Zn em queijos *petit suisse*: aspectos analíticos e teores encontrados em amostras comerciais”, *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 70, p. 35, 2015.

OLIVEIRA, M.A.L.; PORTO, B.L.S.; BASTOS, C.A.; SABARENSE, C.M.; VAZ, F.A.S.; NEVES, L.N.O.; DUARTE, L.M.; CAMPOS, N.S.; CHELLINI, P.R.; SILVA, P.H.F.; SOUSA, R.A.; MARQUES, R.; SATO, R.T.; LISBOA, T.P.; MENDES, T.O.; RIOS, V.C. “Analysis of amino acids, proteins, carbohydrates and lipids in food by capillary electromigration methods: a review”, *Analytical Methods (Print)*, v. 8, p. 3649-3680, 2016.

ENTREVISTAS

LISBOA, T.P.; SOUSA, R.A. Pesquisa constata excesso de mineral em suplemento alimentar. Pesquisa e Inovação, UFJF Notícias, Portal UFJF, 2016. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/noticias/2016/02/18/pesquisa-constata-excesso-de-mineral-em-suplementos-alimentares/>>

LISBOA, T.P.; SOUSA, R.A. Muito cromo em suplementos. Vida Mais – Tribuna de Minas, 21 de fevereiro de 2016. Disponível em: <<http://www.tribunademinas.com.br/muito-cromo-em-suplementos/>>