

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

Antonio Pedro Nogueira Guimarães

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CROMO E MANGANÊS NAS FRAÇÕES
BIOACCESSÍVEIS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Juiz de Fora
2018

Antonio Pedro Nogueira Guimarães

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CROMO E MANGANÊS NAS FRAÇÕES
BIOACESSÍVEIS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

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

2018

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

Guimarães, Antonio Pedro Nogueira.

Determinação dos teores de cromo e manganês nas frações bioacessíveis de suplementos alimentares / Antonio Pedro Nogueira Guimarães. -- 2018.

86 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós Graduação em Química, 2018.

1. Bioacessibilidade. 2. Suplementos alimentares. 3. Cromo. 4. Manganês. 5. Espectrometria de absorção atômica. I. Sousa, Rafael Arromba de, orient. II. Título.

Dedico aos meus pais, Antonia Mathildes e José Carlos, e minha irmã, Janaína, pelas orações, orientações, incentivo e compreensão.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes sofrimentos e também de remediá-los.”

Alvo Dumbledore – Harry Potter e as Relíquias da Morte

“When we hit our lowest point, we are open to the greatest change.”

Avatar Aang – A Lenda de Korra

AGRADECIMENTOS

A Deus e Santo Antônio pela minha vida.

À minha família, Antonia Mathildes, José Carlos e Janaína por serem meu porto seguro em momentos que eu sempre me desesperei.

À minha avó Zulmira pelas orações e seu amor incondicional.

À minha tia Ilma por todo o apoio prestado para toda a minha formação educacional.

Ao meu professor e orientador Rafael, pelo acolhimento como seu aluno desde a graduação, pelos conselhos e orientações durante esses três anos de convívio.

Aos meus amigos do Laboratório Baccan, Agatha, Ângela, Aparecida, Felipe, Isabel, Jefferson, Joseane, Náira, Paola, Rafael e Thalles, pelas risadas, lanches e conhecimento compartilhados.

Aos meus amigos do Laboratório NUPIS, Gustavo, Fernanda, Raiane, Fausto, Guilherme, Taimara e Lucas pelas conversas na hora do café, conselhos e experiências trocadas.

Aos amigos do Laboratório GQAQ pela colaboração em várias das etapas do projeto.

Aos professores Júlio, Lílian, Marcone e Denise, pelos ensinamentos no decorrer do projeto e nas disciplinas da pós-graduação.

Aos professores Roberto e Renato, assim como o aluno Jefferson, que auxiliaram em extensões do projeto.

Às técnicas de laboratório Sabrina e Bárbara, pelo fornecimento de vidrarias e reagentes para a execução do projeto.

Aos meus amigos, Júlio, Ana Luísa e Karine por me ouvirem nos meus momentos de debates internos e aconselhamento em muitas das minhas decisões.

À minha equipe de natação, Tiago, Letícia, Mariana, Isabela e Matheus por todo o apoio nos treinos e no meu desenvolvimento no esporte.

Aos meus amigos Nauila, Karmini e Leonardo pelas conversas, festas, conselhos e risadas.

Em especial aos meus amigos Agatha, Thalles, Náira, Isabela e Joyce, que sem a ajuda, conselhos e conversas, teria sido muito mais difícil de seguir em frente.

Em especial, à minha psicóloga Kamila por todas as ferramentas desenvolvidas e paciência nos meus momentos de crise.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de algum jeito contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Este trabalho descreve métodos de determinação de cromo e manganês nas frações bioacessíveis de suplementos alimentares, como hipercalóricos, *whey protein* e *protein bar* por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Para o desenvolvimento dos métodos, as frações bioacessíveis foram submetidas à digestão assistida por radiação micro-ondas e posterior otimização instrumental das temperaturas de pirólise e atomização. Para o manganês, nas amostras de *whey protein* e *protein bar*, obteve-se as mesmas temperaturas de pirólise e atomização: 1100 e 1600 °C, respectivamente; para hipercalóricos foi empregado o uso de modificador químico, $Mg(NO_3)_2$, e suas temperaturas de pirólise e atomização foram de 1200 e 1700 °C, respectivamente. Para o cromo, não foi preciso o uso de modificador e as temperaturas de pirólise e atomização otimizadas foram as mesmas para as três amostras: 1500 e 2300 °C, respectivamente. A exatidão dos métodos foi investigada através de ensaios de adição e recuperação de analito, apresentando para o manganês valores na faixa de 84 a 113% e para o cromo, valores entre 101 e 116%. A precisão dos métodos também foi avaliada, mostrando desvios padrões relativos menores que 15%. A massa característica (m_0), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os métodos de cromo foram de 1,9 pg, 0,07 $\mu g g^{-1}$ e 0,2 $\mu g g^{-1}$, respectivamente; para manganês em hipercalórico os valores obtidos foram de 1,8 pg, 0,03 e 0,08 $\mu g g^{-1}$; já em *whey protein* e *protein bar* os mesmos foram de 4,2 pg, 0,12 $\mu g g^{-1}$ e 0,3 $\mu g g^{-1}$. Os métodos desenvolvidos foram aplicados em 12 amostras de suplementos alimentares, sendo 4 de hipercalóricos, 3 de *whey protein* e 5 de *protein bar*. Foram observados valores de porcentagem de bioacessibilidade para cromo: 12% em *whey protein*, 16% em *protein bar* e, 39 e 49% em hipercalóricos. Em contrapartida, somente uma amostra de *whey protein* apresentou porcentagem bioacessível não significativa para manganês, e os resultados variaram de 6 até 99%.

Palavras-chave: Bioacessibilidade. Suplementos alimentares. Cromo. Manganês. Espectrometria de absorção atômica.

ABSTRACT

This study describes methods for the determination of two minerals, chromium and manganese, in the bioaccessible fractions of food supplements, like hypercaloric, whey protein and protein bars, by graphite furnace atomic absorption spectrometry. For the development of the methods, the bioaccessible fractions were submitted to digestion assisted by microwave radiation and posterior instrumental optimization of pyrolysis and atomization temperatures. For manganese, whey protein and protein bars samples obtained the same pyrolysis and atomization temperatures: 1100 and 1600 °C, respectively; for hypercaloric, the use of the modifier $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ was employed and the pyrolysis and atomization temperatures were 1200 and 1700 °C, respectively. For chromium, it was not necessary the modifier and the pyrolysis and atomization temperatures for the three types of samples were 1500 and 2300 °C, respectively. The accuracy of the methods were investigated through addition and recovery tests; for manganese the study showed recoveries in a range of 84 to 113% and for chromium in a range of 101 to 116%. The precision of the methods was also evaluated and presented relative standard deviation values smaller than 15%. The characteristic mass (m_0), limits of detection (LD) and quantification (LQ) for chromium were 1,9 pg, 0,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively; for manganese, in hypercaloric the values found were 1,8 pg, 0,03 and 0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$; and finally, in whey protein and protein bars the values were 4,2 pg, 0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$. The developed methods were applied to 12 food supplement samples, being 4 of hypercaloric, 3 of whey protein and 5 of protein bars. Four of those samples presented chromium bioaccessible percentage: 49 and 39% in hypercaloric, 12% in whey protein and 16% in protein bars. On the other hand, only one sample of whey protein did not present significant manganese bioaccessible percentage, varying in a range of 6 to 99%.

Keywords: Bioaccessibility. Food supplements. Chromium. Manganese. Atomic absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Limites de detecção típicos para técnicas espectrométricas de análise.....	8
Figura 2 Amostras de suplementos alimentares. A) amostras de hipercalórico B) amostras de whey protein depois do processo de secagem e moagem C) amostras de protein bar.....	16
Figura 3 Esquematização do procedimento de preparo de amostras para determinação de Mn e Cr em frações bioacessíveis de suplementos.....	19
Figura 4 Perfis de absorvância para Cr na análise direta da fração bioacessível de hipercalóricos para introduções consecutivas de amostra no atomizador. A) Primeira queima, em um tubo pirolítico novo; B) segunda, C) terceira e D) quarta queimas de uma mesma amostra no mesmo tubo.....	23
Figura 5 Perfil de absorvância para a análise direta de Mn na fração bioacessível de suplementos.....	25
Figura 6 Superfícies de resposta obtidas com Box-Behnken da absorvância média em função da temperatura de atomização (°C) e massa de modificador (µg), com temperaturas de pirólise fixadas em: A) 700, B) 900 e C) 1100 °C.....	33
Figura 7 Curvas analíticas de calibração externa para Mn em meio ácido e adição de padrão à amostra de hipercalórico.....	34
Figura 8 Efeito do modificador $Mg(NO_3)_2$ nos sinais médios de absorvância integrada normalizados para Cr e Mn em suplementos alimentares: Br – branco; HP – hipercalórico; WP – whey protein; PB – protein bar.....	37
Figura 9 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a solução padrão de $4 \mu g L^{-1}$ Mn e amostra de hipercalóricos (Temperatura usada para a atomização: 1800 °C; $10 \mu g$ de $Mg(NO_3)_2$)	40
Figura 10 Perfil de absorvância para Mn no “mix” de amostra de hipercalóricos.....	40
Figura 11 Curvas de pirólise e atomização para a solução padrão $5 \mu g L^{-1}$ Mn, whey protein e protein bar (Temperatura usada para a atomização: 1800 °C)	41
Figura 12 Perfis de absorvância de Mn no “mix” de amostras de A) whey protein e B) protein bar.....	41
Figura 13 Curvas de pirólise para a solução padrão Cr $6 \mu g L^{-1}$, hipercalóricos, whey protein e protein bar (Temperatura usada para a atomização: 2500 °C).....	42
Figura 14 Perfis de absorvância de Cr do “mix” de amostras de A) hipercalóricos B) whey protein e C) protein bar.....	42
Figura 15 Comparação entre a curva de calibração externa (CE) e curva de adição de padrão (AP HP) para Mn em hipercalóricos – curvas realizadas com o emprego de modificador químico.....	46

Figura 16 Comparação entre a curva de calibração externa (CE) e as curvas de adição de padrão para Mn em whey protein (AP WP) e protein bar (AP PB).....	47
Figura 17 Comparação entre as curvas de calibração em meio aquoso (CE) e adição de padrão para Cr nas frações bioacessíveis de suplementos digeridas.....	47
Figura 18 Curva de calibração externa de Mg para determinação em frações bioacessíveis de hipercalóricos.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características dos sistemas (aberto e fechado) para a decomposição de amostras.....	11
Tabela 2 Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante e empregadas no desenvolvimento dos métodos para a determinação de Cr e Mn por GFAAS.....	15
Tabela 3 Programa de aquecimento empregado no equipamento de micro-ondas para a digestão de amostras de suplementos alimentares.....	18
Tabela 4 Matriz codificada e níveis utilizados para a triagem.....	26
Tabela 5 Erros dos efeitos e intervalos de confiança.....	28
Tabela 6 Variáveis independentes e seus níveis avaliados no Box-Behnken para determinação de Mn em hipercalóricos por GF AAS.....	30
Tabela 7 Coeficientes, erros e intervalos de confiança do planejamento Box-Behnken.....	31
Tabela 8 Análise de variância para o ajuste da superfície de resposta para a determinação de Mn na fração bioacessível de hipercalóricos.....	31
Tabela 9 Programa de aquecimento para a determinação de Mn em hipercalóricos por GF AAS.....	33
Tabela 10 Comparação entre calibração externa e adição de padrão.....	34
Tabela 11 Valores médios de absorvância integrada obtidos para Mn após digestão com ácido nítrico concentrado e ácido nítrico misturado com peróxido de hidrogênio.....	36
Tabela 12 Programa de aquecimento utilizado para a determinação de Mn e Cr nos digeridos das frações bioacessíveis de suplementos alimentares.....	43
Tabela 13 Valores de F calculados para comparação de variâncias de concentrações de Mn e Cr nas amostras de suplemento.....	45
Tabela 14 Comparação das concentrações médias de Mn ($n = 2$) obtidas nas frações bioacessíveis de suplementos empregando calibração externa (CE) e adição de padrão (AP).....	48
Tabela 15 Comparação das concentrações médias de Cr ($n = 2$) obtidas nas frações bioacessíveis de suplementos empregando calibração externa (CE) e adição de padrão (AP).....	48
Tabela 16 Resultados estatísticos para análise de regressão linear dos modelos de calibração para Mn e Cr.....	49

Tabela 17 Resultados médios de recuperação de Cr e Mn em amostras de suplementos alimentares (n = 2) após digestão.....	50
Tabela 18 Limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e valores de massa característica (m ₀) para determinação dos teores bioacessíveis de Cr e Mn em suplementos alimentares por GF AAS.....	52
Tabela 19 Teores totais de Cr e Mn e a correlação com os respectivos valores de IDR.....	54
Tabela 20 Valores dos teores e porcentagens bioacessíveis médios (n = 2) para Cr e Mn.....	64
Tabela 21 Comparação dos teores e porcentagens bioacessíveis de Mn em hipercalóricos, com e sem o emprego de modificador químico.....	64
Tabela 22 Revisão bibliográfica dos valores bioacessíveis para Cr e Mn em amostras de alimento e parâmetros de ensaio de bioacessibilidade.....	66
Tabela 23 Composição de compostos orgânicos majoritários das amostras de suplementos segundo informado nas embalagens e comparação dos teores bioacessíveis de Cr e Mn.....	67
Tabela 24 Massa média de Mg nas frações bioacessíveis digeridas de suplementos.....	70

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Lei de Lambert Beer.....	8
Equação 2 Cálculo para a porcentagem recuperada nos ensaios de adição e recuperação de analito.....	20
Equação 3 Cálculo para a estimativa do desvio padrão relativo.....	20
Equação 4 Fórmulas para cálculo dos limites de detecção.....	21
Equação 5 Fórmulas para cálculo dos limites de quantificação.....	21
Equações 6 Mecanismos de formação de metais no estado gasoso no processo de atomização.....	24
Equações 7 Reações de formação de carbetos.....	24
Equações 8 Reações de decomposição de carbetos.....	24
Equação 9 Obtenção matricial dos fatores da triagem.....	27
Equação 10 Equação matricial para erro padrão em planejamentos.....	27
Equação 11 Modelo quadrático para superfície de resposta.....	28
Equação 12 Modelo quadrático para superfície de reposta na forma matricial.....	28
Equação 13 Coeficientes do modelo quadrático na forma matricial.....	28
Equação 14 Equação da superfície de resposta construída para a absorvância média de Mn na fração bioacessível de hipercalóricos em função da temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA) e massa de modificador (Mod).....	28
Equação 15 Teste F (Fischer-Snedecor).....	45
Equação 16 Cálculo de t de Student não-pareado com variância agrupada.....	45
Equação 17 S_{agrupado} para o cálculo de t de Student.....	46
Equação 18 Porcentagem Bioacessível.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EDPR	Estimativa do desvio padrão relativo
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>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
HP	Hipercalóricos
WP	<i>Whey Protein</i>
PB	<i>Protein Bar</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m_0	Massa característica
R^2	Coefficiente de determinação
IDR	Ingestão diária recomendada
pH	Potencial hidrogeniônico
TB	Teor bioacessível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivos Gerais	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. PARTE EXPERIMENTAL	14
4.1 VIDRARIAS E UTENSÍLIOS	14
4.2 REAGENTES	14
4.3 EQUIPAMENTOS	14
4.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	14
4.4 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	15
4.5 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	15
4.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS	16
4.7 ENSAIO DE BIOACESSIBILIDADE.....	17
4.8 DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	18
4.9 DIGESTÃO EM CHAPA DE AQUECIMENTO	18
4.10 FIGURAS DE MÉRITO	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5.1 TESTES PRELIMINARES	22
5.1.1 Análise direta de Cromo/Manganês	22
5.2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA EM GF AAS DAS SOLUÇÕES MINERALIZADAS EM CHAPA DE AQUECIMENTO	25
5.2.1 Triagem.....	25
5.2.2 Planejamento Box-Behnken	28
5.2.3 Curva analítica e tratamento estatístico para a otimização multivariada.....	34
5.3 REAGENTES PARA A MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM RADIAÇÃO MICRO-ONDAS	35
5.3.1 Modificador químico	36
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO GF AAS	38
5.4.1 Temperaturas de pirólise	38
5.4.2 Temperaturas de atomização	39

5.5 CURVA ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	43
5.6 FIGURAS DE MÉRITO	50
5.6.1 Exatidão	50
5.6.2 Precisão.....	51
5.6.3 Limites de detecção, de quantificação e massa característica	51
6. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS	54
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO I. Determinação De Magnésio Nos Teores Bioacessíveis De Suplementos Alimentares Utilizando F AAS.....	70
ANEXO II. Produção Bibliográfica.....	71

1. INTRODUÇÃO

I. Suplementos alimentares

Desde a era clássica na Grécia antiga, o ser humano se preocupa com estética corporal e a visão de “corpo perfeito”. Atualmente, a busca por procedimentos clínicos, práticas esportivas e produtos que favoreçam este resultado é cada vez mais intensa (SCHMITZ, 2010). O investimento de esforços para o embelezamento do corpo, no entanto, vai além do uso de cosméticos e sujeição a cirurgias plásticas, e envolve ainda a manutenção de um corpo saudável por meio de alimentação e exercícios (MACEDO *et al.*, 2003). A conscientização sobre a importância da prática de exercícios físicos pela população tem aumentado a procura de academias de ginástica, cada vez mais populares (FERRAZ *et al.*, 2015).

Embora a condução de uma alimentação de forma saudável promova todos os nutrientes necessários para que frequentadores de academia tenham uma melhora de desempenho e uma redução do tempo de recuperação, há uma adesão significativa do consumo de suplementos alimentares (FERRAZ *et al.*, 2015).

Geralmente os suplementos são comercializados com os mais diferentes propósitos. Basicamente, eles são procurados pelas suas capacidades de melhorar a performance do exercício, aumentar a massa muscular, diminuir a gordura corporal, ajudar no controle ou na perda de peso, prevenir doenças, tratar problemas patológicos, aumentar a imunidade, aumentar o alerta e a atividade mental e, também, por diminuir o estresse. Em suma, são “produtos milagrosos” que prometem resultados absurdamente eficientes em um curto período de tempo (GOSTON & TOULSON, 2010). E na verdade, a eficiência que esses suplementos têm na vida cotidiana de pessoas frequentadoras de academia é em grande parte substituída pela ação de uma alimentação regular e equilibrada.

Nesse contexto, existe uma necessidade em se alcançar padrões de beleza estereotipados de forma imediata levando: i) à utilização de suplementos alimentares, para que se atinja a quantidade necessária dos nutrientes requeridos de forma eficiente e “mais rápida”; ii) à ingestão de alimentos funcionais; e, iii) à prática de exercícios físicos mais intensos que proporcionem rapidamente os resultados desejados.

A suplementação alimentar para atletas, segundo a regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), se classifica em suplementos: i) hidroeletrólitos; ii)

energéticos; iii) proteicos; iv) substitutos parciais de refeições; v) de creatina; e, vi) predominante em cafeína e chá verde, i.e. termogênicos (ROCHA & PEREIRA, 1998; BRASIL, 2010; CASTRO, 2013; FERRAZ *et al.*, 2015).

Dentre todas essas opções, destacam-se os suplementos do tipo ii, iii e iv. Os suplementos do tipo ii tem em sua composição majoritária carboidratos, enquanto os do tipo iii, a maior parte de sua composição é de proteínas. Os do tipo iv devem possuir 50-70% do seu valor energético correspondente a carboidratos e 13-20% correspondente a proteínas. Tipos comuns de suplementos desses três tipos são os hipercalóricos (tipo ii), as proteínas do soro do leite, conhecidas como *whey protein* e albumina (tipo iii) e por fim, as barrinhas de proteínas, conhecidas como *protein bars*. Vale ressaltar que a *whey protein* possui alto valor nutricional, com elevado teor de cálcio associado, peptídeos ativos e aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada (também conhecidos como BCAA, do inglês *branched-chain amino acids*); dentre esses três tipos de suplemento, a *whey protein* é a mais difundida.

Tanto o consumo de proteínas quanto carboidratos são essenciais para a atividade física. Durante os exercícios, aminoácidos são usados para construção e reparação do tecido muscular assim como suprimento de energia, enquanto carboidratos são a fonte primária de energia para a contração muscular. Em situações as quais aminoácidos ou carboidratos estão em quantidades limitantes durante o curso do exercício, tanto a síntese de proteínas, quanto suas quebras e recuperação muscular podem ser impedidas (BURNLEY *et al.*, 2010). Tipton e colaboradores mostram a diferença entre a ingestão imediata de suplementos mistos, baseados em aminoácidos e carboidratos, antes e depois de um exercício de resistência (TIPTON *et al.*, 2001). Nesse caso, há uma maior produção de síntese de proteínas quando esse suplemento é consumido antes do exercício devido a um maior suprimento de proteínas ao tecido muscular.

II. *Composição mineral dos suplementos alimentares*

De acordo com a ANVISA, esses tipos de produtos podem receber a adição de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre a adição de nutrientes essenciais. Os suplementos alimentares devem estar contidos em um intervalo de 25 a 100%

da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e minerais, sendo proibida a substituição de alimentos por tais produtos e desaprovada a consideração de suplementos como dieta exclusiva (BRASIL, 1998b). Tecnicamente, os suplementos alimentares são produtos que auxiliam na reposição de uma dieta deficitária em nutrientes, micronutrientes e outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico. Neste sentido, eles são recomendados para atletas em atividades físicas de alta intensidade e são essenciais para pessoas que sofram de alguma disfunção fisiológica.

A formulação desses suplementos alimentares possui composição à base de micro e macronutrientes e estes variam de acordo com a finalidade desejada, cuja prescrição deve ser realizada por nutricionistas ou médicos (FERRAZ *et al.*, 2015). Contudo, a composição de alguns desses produtos não está de acordo com a legislação, como mostra um estudo feito pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2014) sobre a composição de macronutrientes em suplementos do tipo *whey protein*, no qual em um conjunto de 15 amostras analisadas, somente uma foi considerada “conforme”.

No estudo de suplementos realizado por Lisboa, avaliou-se a composição mineral dos três tipos de suplementos mencionados anteriormente. Uma varredura foi realizada procurando-se determinar contaminantes e constituintes inorgânicos e os resultados indicaram que somente os elementos cobre, manganês e molibdênio estariam em níveis quantificáveis por técnicas espectrométricas de análise. Nesse contexto, entretanto, apesar do elemento cromo não ter sido identificado inicialmente, 54% das amostras investigadas no trabalho de Lisboa apresentaram este micronutriente e, em alguns casos, em teores acima do esperado.

Dessa forma, a ampla variedade de marcas pode estar “associada”, no mercado, a uma fiscalização precária desses produtos, muito procurados e consumidos (FRESTEDT *et al.*, 2008). Se torna imperativo, assim, investigar regularmente a adequação nutricional desses produtos, focando inclusive nos micronutrientes presentes, como o cromo e o manganês, pois sua ingestão em níveis elevados pode gerar riscos à saúde.

III. Cromo

O cromo recebe tal nome (do grego, significa *cor*) pelo fato de diferentes compostos de cromo serem coloridos. Os estados de oxidação do cromo mais estáveis são os tri e hexavalentes (SILVA, 2003). O cromo está distribuído em diversos tipos de alimentos: o levedo de cerveja, os cereais, a lagosta, mariscos e alguns vegetais (MARTINS, 2003) sendo a ingestão diária adequada e segura estimada entre 25 e 35 µg/dia para mulheres e homens adultos, respectivamente (I.O.M., 2002; GOMES *et al.*, 2005).

O cromo(III) é um elemento traço considerado essencial para os seres vivos devido à sua função no controle de glicose e lipídeos, nos metabolismos de mamíferos, co-atuando com a insulina, de forma que, em casos de deficiência desse metal, há ocorrências de desajuste na manutenção de tolerância à glicose e níveis lipídicos normais. Como a insulina, em combinação com outros hormônios, é responsável pela regulação de armazenamento de gordura e síntese de proteína, mudanças nos níveis de insulina poderiam, em teoria, trazer mudanças na composição corporal. (KOTAŚ & STASICKA, 2000; VINCENT, 2000)

Exercícios físicos aumentam a excreção de cromo, sugerindo que suplementação de Cr compensaria o decaimento da quantidade desse mineral nos organismos de atletas (ANDERSON *et al.*, 1988). Outra característica do cromo é a capacidade de metabolização proteica, tendo sido o seu uso atualmente difundido na suplementação de atletas que buscam a perda de gordura corporal e aumento de massa muscular (GOMES *et al.*, 2005).

Em 1989, Evans reportou o que seria o começo da suplementação de picolinato de cromo e o uso desse composto como agente de perda de peso e desenvolvimento muscular. Picolinatos de cromo, zinco e outros metais são melhores absorvidos do que os sais desses minerais (EVANS, 1989; VINCENT, 2000).

Por outro lado, o Cr(VI) exerce efeitos tóxicos em sistemas biológicos, levando a sérios problemas clínicos. Suas propriedades toxicológicas se devem à livre difusão através da membrana celular e potencial altamente oxidativo, que leva à formação de radicais livres durante a redução de Cr(VI) a Cr(III) (KOTAŚ & STASICKA, 2000). Tais radicais podem iniciar a destruição de membranas biológicas e levar a inativação ou mutação do DNA (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

IV. Manganês

O manganês (do grego, significa *magneto*), tal como o cromo, apresenta ocorrência de compostos coloridos; seus estados de oxidação mais comuns são +2, +3 e +7. É amplamente usado, tendo aplicações na produção do aço, baterias, palitos de fósforo e porcelanas. No quesito exposição alimentar, as maiores concentrações de manganês podem ser encontradas em grãos, em noz e nos cereais, sendo que chás e folhas de vegetais são fontes significativas desse elemento. Outros alimentos, como leite e derivados, carne bovina, peixes, ovos e frutas possuem uma menor quantidade de manganês em sua composição (MARTINS, 2003).

O manganês também é um elemento traço essencial para o ser humano, funcionando como cofator numa variedade de reações enzimáticas. No organismo de um adulto, a quantidade média de Mn é de 10-12 mg, estando incorporado no centro ativo de várias metaloenzimas, como a arginase e a glutamina sintase, presentes na mitocôndria, sendo assim um elemento importante para a respiração celular (HARDY, 2009). Esse mineral também empenha um papel no metabolismo cerebral, sendo assim, adicionado como suplemento para pacientes que recebem dieta parenteral (TRACQUI *et al.*, 1995).

Em indivíduos saudáveis, menos de 5% do Mn ingerido oralmente é absorvido. Isso mantém a homeostase desse elemento para que a alta ingestão não seja um problema. Uma vez absorvido, o manganês é transportado para o fígado onde uma pequena porção complexa com a transferrina e uma grande parte se liga à γ -globulina e albumina (HARDY, 2009). A ingestão diária recomendada para esse elemento segundo a ANVISA é de 2,3 mg/dia (BRASIL, 2005).

A intoxicação crônica por Mn (denominada de manganismo) resulta de extensas exposições de trabalhadores a grandes níveis de manganês, presentes em poeiras e fumos, sendo a via respiratória a principal via de contaminação desse elemento. Os primeiros sistemas do organismo a sofrer a ação do Mn são o respiratório (pulmões) e sistema nervoso central, embora tenha-se observado o efeito desse mineral em outros órgãos (MARTINS, 2003).

Em contrapartida, a deficiência desse elemento tem sido observada em várias espécies de animais com sinais de deficiência, incluindo comprometimento do crescimento e funções reprodutivas, alteração na tolerância à glicose e no metabolismo de carboidratos e lipídeos.

Além desses efeitos, deficiência de manganês também interfere no desenvolvimento esquelético em várias espécies animais (I.O.M., 2002).

V. *Bioacessibilidade*

Nos últimos anos, aumentou-se o interesse no desenvolvimento de estudos que simulem o funcionamento do trato digestivo para a investigação da liberação de componentes bioativos que influenciam na saúde humana (MCCLEMENTS *et al.*, 2008). Neste sentido, além da investigação da composição dos suplementos alimentares, é adequado estudar a bioacessibilidade dos elementos minerais, como o Cr e o Mn mencionados anteriormente.

A bioacessibilidade é conceituada como a fração disponível para a absorção (ensaio *in vitro*) de um composto que apresenta solubilidade no trato gastrointestinal (ETCHEVERRY *et al.*, 2012). Assim, a vantagem de um estudo da bioacessibilidade implica em um conhecimento mais realista da quantidade disponível de um composto depois de um tratamento laboratorial que simule as condições gastrointestinais. O estudo da bioacessibilidade desses minerais em suplementos minerais é escassa, sendo de alta importância para a comunidade científica a disponibilização de dados que forneçam tal informação.

Obviamente que, na prática, um ensaio *in vitro* não alcança toda a complexidade que envolve o processo digestivo em si (COLES *et al.*, 2005). Entretanto, nos últimos anos o foco de muitos pesquisadores foi utilizar modelos de sistemas digestivos *in vitro* para testar as mudanças químicas e estruturais que ocorrem com alimentos, simulando as condições gastrointestinais, embora nenhum desses métodos tenha sido amplamente aceito (HUR *et al.*, 2011).

De modo geral, as condições gastrointestinais *in vitro* assemelham-se às condições fisiológicas de um organismo, incluindo a “sequência de eventos” composta por 2 ou 3 etapas, dependendo do protocolo escolhido para simular o processo digestivo. Os processos com 3 etapas envolvem as etapas bucal, gástrica e intestinal, enquanto que os de 2 etapas incluem somente a gástrica e a intestinal (gastrointestinal).

A avaliação da bioacessibilidade pode ser realizada por meio de dois métodos: solubilidade e dialisabilidade. O primeiro se baseia na centrifugação dos digeridos intestinais (simulação) e na análise do sobrenadante por técnicas de análise elementar, como a

espectrometria de absorção atômica, espectrometria de massas e espectrofotometria no UV-Vis. O segundo se baseia na permeabilidade de espécies de baixa massa molecular através de uma membrana, por meio do mecanismo de equilíbrio de uma diálise (ETCHEVERRY *et al.*, 2012). Dentre esses dois métodos, o primeiro (de solubilidade), foi escolhido para o estudo da bioacessibilidade nesse trabalho. Por outro lado, ambos os métodos envolvem o mesmo tipo de simulação das condições gastrointestinais, como os ajustes de pH, temperatura, tempo de residência e adição de enzimas digestivas.

VI. *Técnicas analíticas para a determinação dos analitos em suplementos alimentares*

Devido ao teor bioacessíveis dos minerais de interesse ser relativamente baixo nas amostras de interesse, necessita-se utilizar uma técnica sensível e seletiva o suficiente para que os resultados tenham precisão e exatidão adequados. As técnicas recomendadas para essa finalidade são a espectrofotometria no UV-Vis e as técnicas espectrométricas de análise (baseadas nos fenômenos de absorção e emissão atômica). Dentre elas, as mais empregadas para a determinação de cromo e manganês são, principalmente, as espectrometrias de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massas acoplada com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e de absorção atômica com chama (F AAS) ou com forno de grafite (GF AAS) (CODEX, 1999).

A opção pelas técnicas de plasma (ICP OES e ICP-MS) se dá pelas vantagens de serem técnicas multielementares, com baixos limites de detecção e ampla faixa dinâmica linear de trabalho. Em contraste, embora seja uma técnica monoelementar, a espectrometria de absorção atômica ganha destaque por ser uma técnica amplamente difundida, pela sua utilização em laboratórios de rotina e pesquisa, como também a capacidade de determinação de elementos metálicos e semimetálicos nas mais diversas matrizes (CORREIA *et al.*, 2003; BORGES, 2005; DA SILVA *et al.*, 2013).

Os fundamentos da técnica de AAS se baseiam na absorção de energia radiante por átomos neutros, em estado fundamental e gasoso. Assim, o processo de absorção atômica obedece a lei geral de absorção, Lei de Lambert-Beer (Equação 1), que relaciona a radiação e a concentração dos átomos presentes do caminho ótico (SKOOG *et al.*):

Equação 1 Lei de Lambert-Beer

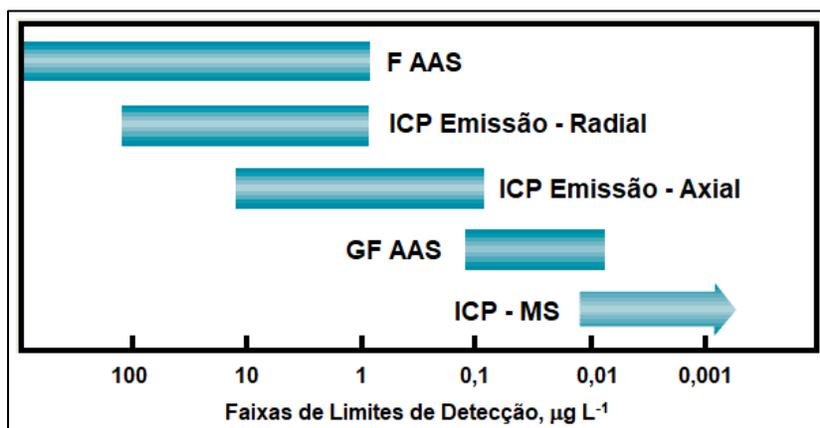
$$\text{Log} \frac{P_o}{P} = A = k.C \quad (1)$$

Na equação, P_o e P são as intensidades do feixe monocromático da radiação de entrada e saída da nuvem atômica, respectivamente, A é a absorvância e C é a concentração da solução usada para a obtenção da nuvem atômica. A constante de proporcionalidade, k , depende de um amplo número de fatores (analito, condições de atomização, instrumento utilizado, etc.), mas permanece invariável para um dado conjunto experimental (DE LA GUARDIA & GARRIGUES, 2015). Utilizando uma fonte de radiação específica e selecionando um comprimento de onda adequado, pode-se determinar um elemento químico na presença de outros.

VII. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

A técnica de GF AAS é bem estabelecida há décadas e seu emprego ocorre de forma ampla para a determinação de elementos em baixas concentrações nas mais diversas amostras, como ambientais, biológicas e alimentícias. Os limites de detecção da técnica são na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, comparáveis com os de outras técnicas usuais para a análise de traços, como mostra a Figura 1 a seguir:

Figura 1 Limites de detecção típicos para técnicas espectrométricas de análise



Fonte: Adaptado de (THERMOELEMENTAL, 2001)

As técnicas de espectrometria de absorção atômica, tanto com atomização por chama (FAAS) quanto eletrotérmica (ETAAS) foram sendo aprimoradas ao longo dos anos, tornando os equipamentos mais robustos e automatizados. Os aprimoramentos, inicialmente propostos por Boris V. L'vov, como o revestimento pirolítico dos tubos de grafite com plataforma e aquecimento transversal e correção de sinal de fundo baseada no efeito Zeeman, foram consolidados por Slavin e colaboradores, resultando nas conceituadas condições STPF (do inglês, *Stabilized Temperature Platform Furnace*) (SLAVIN, 1984).

As condições STPF formam um conjunto de condições instrumentais e operacionais que permitem a obtenção de métodos mais sensíveis e com mínima interferência, assegurando uma adequação da condição analítica ao fazer uso da ETAAS (KOIRTYOHANN & KAISER, 1982).

Tais condições incluem: i) a utilização de tubo de grafite com plataforma de L'vov, que estabelece um ambiente quase isotérmico durante a atomização; ii) o registro dos sinais de absorvância em área, para a minimização dos efeitos das variações cinéticas do processo de atomização; iii) a utilização de atomizadores com revestimento de grafite pirolítico para a redução de perdas por difusão através da parede do atomizador; iv) o aquecimento de forma transversal do tubo de grafite, para que se estabeleça um ambiente isotérmico espacialmente; v) a correção das interferências espectrais por efeito Zeeman; vi) o uso de modificador químico, que aumenta a eficiência do tratamento térmico durante a etapa de pirólise; vii) a interrupção do fluxo de gás durante a atomização, aumentando o período de residência da nuvem atômica na zona de observação; viii) uma elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite, de forma a reduzir a interferência na fase de vapor e favorecendo a formação de uma densa nuvem atômica; e por fim, ix) uma eletrônica adequada que permita uma integração rápida do sinal transiente, para a obtenção do registros dos sinais de absorvância em tempo real (PRUSZKOWSKA *et al.*, 1983).

Em GF AAS é possível controlar o programa de aquecimento utilizado para a análise, o qual se divide em quatro etapas: secagem, pirólise, atomização e limpeza. Na secagem ocorre a evaporação do solvente, e assim, deve ser escolhida a temperatura que mais se aproxima da temperatura de ebulição do mesmo. Na etapa de pirólise é onde ocorre a decomposição dos componentes presentes na matriz; por isso, a temperatura escolhida para essa etapa deve ser a maior possível sem que haja degradação ou eliminação do analito. Na etapa de atomização,

a vazão de gás argônio é interrompida e a medida de absorvância da amostra é realizada após a atomização do analito. Por fim, na etapa de limpeza, o tubo de grafite é submetido a temperaturas mais elevadas para evitar a ocorrência de efeitos de memória e eliminar possíveis resíduos remanescentes das etapas anteriores (WELZ & SPERLING, 1999). Além disso, é possível que a temperatura aumente de forma gradativa durante essas etapas; da etapa de secagem para a etapa de pirólise, uma rampa de temperatura menor é recomendada para evitar projeções da amostra e garantir também a máxima volatilização da matriz. Em contraste, a temperatura da segunda para a terceira etapa é alcançada através de uma rápida rampa de aquecimento, o que aumenta a vida útil do tubo de grafite e também auxilia na sensibilidade analítica.

Nesse contexto, escolheu-se para a execução desse projeto, a utilização da técnica de GF AAS, devido a características como apresentar baixos limites de detecção e, também, pela disponibilidade no Departamento de Química da UFJF.

VIII. Preparo de amostras

A execução da análise das amostras de suplementos alimentares com a técnica escolhida necessita, na maioria dos casos, do tratamento prévio dessas amostras. O objetivo é que tais amostras sejam transformadas em uma forma que seja mais apropriada para a introdução das mesmas no atomizador (forno de grafite) e, também, favorecer a determinação dos analitos com boas precisão e exatidão. Dentre os métodos clássicos de preparo de amostras, destaca-se a mineralização por via úmida (digestão). A digestão das amostras pode ser assistida por radiação micro-ondas (preferencialmente em sistema fechado), como realizou Do Nascimento da Silva e colaboradores para a determinação de Mn no teor bioacessível de amostras de comidas infantis, ou realizada em chapa de aquecimento (sistema aberto) (DA SILVA *et al.*, 2013). A escolha do método de digestão depende da amostra a ser tratada e, principalmente, do(s) analito(s) (KRUG & ROCHA, 2016).

A Tabela 1 mostra uma comparação dos principais parâmetros dos dois tipos de sistemas de decomposição mencionados.

Tabela 1 Características dos sistemas (aberto e fechado) para a decomposição de amostras

Parâmetro	Sistema aberto	Sistema fechado
Massa de amostra	Alta	Média
Consumo de reagentes	Alto	Médio
Eficiência da digestão	Baixa	Alta
Tempo de digestão	Alto	Baixo
Riscos e perdas/contaminação	Alto	Baixo
Custo	Baixo	alto

Fonte: (KRUG & ROCHA, 2016)

Todavia, a análise de algumas amostras podem ser executadas por meio de suspensão, e não são submetidas à etapa de digestão, como o caso de Cabrera-Vique e colaboradores que determinaram os teores de Cr e Mn na fração bioacessível de comidas tipo *fast food* (CABRERA-VIQUE & BOUZAS, 2009). Para a análise dos analitos selecionados, o método de digestão escolhido foi por digestão assistida por radiação micro-ondas, para garantir que as matrizes das amostras fossem totalmente decompostas e não houvesse efeito de matriz significativo.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser adicionado em suplementos alimentares como picolinato, nicotinato ou cloreto de cromo(III), a oxidação de Cr(III) a Cr(VI) pode ocorrer devido a etapas críticas durante a formulação desses produtos, como variação de pH ou também, a presença de compostos oxidantes na própria formulação. Fontes duvidosas de matéria-prima também podem contribuir para o teor de Cr(VI) nesses produtos (UNCETA *et al.*, 2016).

Neste sentido, a comercialização e uso do Cr(VI) é regulado pela Diretiva de Substâncias Perigosas (67/548/CEE) por ser altamente tóxico. Uma exposição oral contínua desse elemento pode causar danos ao trato respiratório, fígado, rins e aos sistemas imunológico e gastrointestinal. Além disso, o Cr(VI) é classificado como espécie altamente tóxica e carcinogênica para seres humanos, segundo a Agência de Proteção Ambiental (em inglês, EPA) e também como espécie carcinogênica Classe I pela Agência Internacional de Estudos de Câncer (em inglês, IARC).

Dessa forma, uma vez que o cromo pode ser considerado como um paradoxo biológico, dado que uma espécie é essencial para o organismo e a outra é considerada carcinogênica, a adição de componentes que contenham cromo em suplementos deve ser realizada de forma criteriosa e cautelosa, como também a análise desses produtos.

A fonte de contaminação de manganês em suplementos ainda necessita de elucidação. Possivelmente, a via de introdução desse elemento em suplementos seria proveniente da matéria prima utilizada para composição desses produtos, como leite e derivados. A quantidade desse mineral em alimentos é pequena e a maior fonte de contaminação é através do ar e geralmente presente em locais industriais e minas (REILY, 2002).

Considerando-se o disposto acima, este projeto visa avaliar os teores de cromo e manganês nas frações bioacessíveis de suplementos alimentares do tipo hipercalóricos, *protein bar* e *whey protein*, verificando se os teores elevados para esses elementos, encontrados por Lisboa neste tipo de amostra, apresentam, de fato, riscos aos consumidores desse tipo de suplemento (LISBOA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os teores de Cr e Mn em suplementos alimentares com base em estudos de bioacessibilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar as condições experimentais para a avaliação dos teores dos analitos na fração bioacessível das amostras de suplementos empregando a técnica de GF AAS;
2. Avaliar parâmetros de mérito para as condições otimizadas em “1”;
3. Aplicar o método estabelecido para obter um perfil para os valores bioacessíveis de Cr e Mn em um conjunto representativo de amostras, dentre suplementos do tipo hipercalórico (4 amostras), *protein bar* (5 amostras) e *whey protein* (3 amostras);
4. Avaliar criticamente os resultados de bioacessibilidade a serem obtidos para as amostras estudadas com base nas recomendações de ingestão declaradas nos rótulos dos produtos e nos valores de ingestão diária recomendados para Cr e Mn.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 VIDRARIAS E UTENSÍLIOS

Utilizou-se béqueres de 25 mL, balões volumétricos de 10,00 mL, tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL, micropipetas de volume variável (20-200 μL e 100-1000 μL), almofariz e pistilo de ágata, seringas descartáveis de 10 mL (*Descarpack Slip*, Joinville, Santa Catarina), papel indicador de pH (J. Prolab), filtro com membrana PTFE modificada 0,45 μm (*Chromafil® Xtra PET-45/25*, Macherey-Nagel).

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

4.2 REAGENTES

Foram utilizadas soluções padrão monoelementares de Cr e Mn 1000 mg L^{-1} (*Qhemis High Purity*, Jundiaí, SP, Brasil), HCl 38 % m/v P.A., H_2O_2 30% m/v, HNO_3 65% m/v P.A. (*Vetec*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.), água deionizada (*Mili-Q®*, ELGA), NaHCO_3 (*Isofar*, Duque de Caxias, Brasil), NaOH (*Vetec*, São Paulo, Brasil), Pepsina (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), Pancreatina (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), Bile (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Soluções de Mg (modificador de matriz) foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ de 10.000 mg L^{-1} (Perkin Elmer).

4.3 EQUIPAMENTOS

Utilizou-se balança analítica (*Mettler Toledo*, modelo ME204), banho termostatizado com agitação (*SOLAB*, modelo Dubnoff SL-157/22), chapa aquecedora (*Warmnest*, modelo DB-IVA 110 V), digestor de amostras por energia Microondas (Berghof, modelo SpeedWave Four) e Espectrômetro de Absorção Atômica no modo forno (*Thermo Scientific*, SOLAAR M5).

4.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

Os métodos para as determinações de teores de Cr e Mn foram estabelecidos utilizando-se o espectrômetro de absorção atômica disponível no Departamento de Química da UFJF, modelo *Thermo Scientific Solaar Serie M5*. O tubo de grafite com revestimento pirolítico foi

utilizado, realizando-se injeções manuais. A faixa de trabalho utilizada foi de 2-10 $\mu\text{g L}^{-1}$. As condições instrumentais utilizadas seguem na Tabela 2:

Tabela 2 Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante e empregadas no desenvolvimento dos métodos para a determinação de Cr e Mn por GFAAS

Parâmetro	Cr	Mn
Corrente da lâmpada (mA)	6	5
Comprimento de onda (nm)	357,9	279,5
Lâmpada (modelo PHOTRON Lamps)	P812	P832
Fenda espectral (nm)	0,2	0,2

Fonte: Autoria Própria

Os parâmetros instrumentais principais, temperatura de pirólise e atomização, foram otimizados de forma univariada e após estabelecidas essas condições, as amostras coletadas foram analisadas após a digestão das mesmas conforme descrito anteriormente. Além disso, para a determinação de manganês em hipercalóricos, foi utilizado 10 μg de nitrato de magnésio, na solução de leitura, como modificador químico.

4.4 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram obtidas a partir de doações de praticantes de atividade física, que são os principais consumidores desse tipo de suplemento.

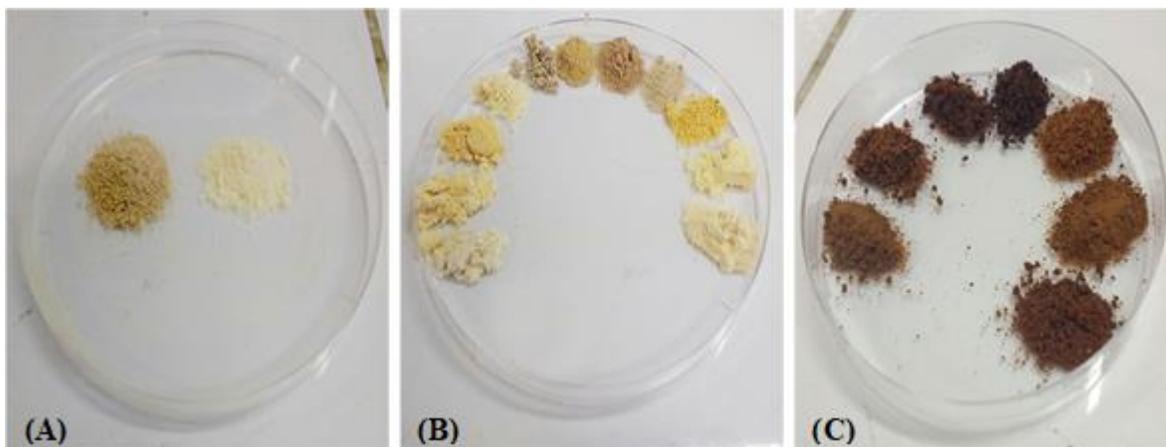
As amostras obtidas constituíram um conjunto de 4 amostras de hipercalórico (HP), 7 amostras de *protein bar* (PB) 14 amostras de *whey protein* (WP) e 1 amostra de *soy protein*.

4.5 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de PB foram trituradas com o auxílio de um “mixer” de alimentos (*Philips Walita Linha Viva Collection 400W*) para a obtenção de uma maior homogeneidade no tamanho das partículas das mesmas. A Figura 2 ilustra o aspecto visual das amostras de HP e WP, como também as de PB depois que as mesmas foram secas e moídas. As amostras de

HP e WP foram armazenadas em frascos de plástico, previamente descontaminados e mantidas em temperatura ambiente até o momento da preparação/análise.

Figura 2 Amostras de suplementos alimentares. A) amostras de hipercalórico B) amostras de *whey protein* depois do processo de secagem e moagem C) amostras de *protein bar*



Fonte: Autoria Própria

As amostras de PB foram sobrepostas em placas de Petri, previamente descontaminadas e levadas à estufa por 24h (com temperatura controlada e pré-estabelecida entre 70-80 °C para a secagem). Elas permaneceram na estufa até que não se observasse variação em suas massas e, em seguida, foram moídas com auxílio de pistilo e almofariz de ágata e armazenadas em frascos plásticos previamente descontaminados. A preparação de uma mistura de amostras (“mix” de amostras) foi também promovida, contendo frações iguais de massa proveniente de todas amostras do mesmo tipo. Deste modo, foram preparados três tipos de “mix” de amostra referente aos três tipos de suplementos que foram avaliados neste trabalho.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS

Os teores totais dos dois analitos estudados nesse trabalho foram determinados previamente no trabalho de Lisboa (2016). As amostras foram submetidas à digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando HNO₃ concentrado e, posteriormente, foram diluídas com água deionizada e analisadas por GF AAS empregando calibração externa e condições instrumentais otimizadas para os analitos nessas amostras.

4.7 ENSAIO DE BIOACESSIBILIDADE

Na comunidade científica, ainda não há o estabelecimento de um método padrão para a determinação dos teores bioacessíveis para metais em alimentos. No trabalho de Campos e colaboradores (CAMPOS *et al.*, 2018), realizado no departamento de Química da UFJF, foi realizada uma otimização das condições mais utilizadas na literatura (massa de amostra e concentração de pepsina) para teores bioacessíveis de ferro em carne de frango. Foram alcançados resultados que foram próximos daqueles obtidos por Lutten e colaboradores, trabalho mais citado sobre teores bioacessíveis de ferro nesse tipo de amostra (LUTTEN *et al.*, 1996). Sendo que as condições otimizadas foram mais brandas (menor quantidade de enzimas), esse mesmo procedimento foi empregado para o estudo realizado neste projeto.

Partindo das condições experimentais otimizadas no referido trabalho, adaptou-se o método estabelecido reduzindo-se as quantidades utilizadas, proporcionalmente em termos de massa para as amostras de interesse, pois a quantidade das amostras era escassa. Neste contexto, pesou-se aproximadamente 3,75 g de amostra, adicionou-se 12,5 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹, ajustou-se o pH para 2 com uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ e, em seguida, adicionou-se 1,6 mL de pepsina (6 % m/v) antes de incubar a mistura em banho metabólico com agitação (Nível 5) durante 2 horas e à temperatura de 37 °C. Esta etapa corresponde à etapa gástrica do processo digestório. Após o período de incubação, iniciou-se a simulação da etapa intestinal. Para isso, ajustou-se o pH da mistura para 7 com adição de solução de NaHCO₃ 1 mol L⁻¹ e adicionou-se 2,5 mL de uma solução mistura de Bile (2,5 % m/v) e Pancreatina (0,4 % m/v). Novamente, a mistura foi incubada por mais 2 horas nas mesmas condições da incubação anterior e os extratos obtidos (chamado de quimo) foram filtrados com papel filtro comum e armazenados em tubos Falcon previamente descontaminados.

Em seguida, os quimos foram acondicionados no congelador para que a atividade enzimática fosse minimizada até o momento da filtração com filtros de 0,45 µm de porosidade. Finalmente, os quimos filtrados (fração bioacessível) retornaram ao congelador até o momento da digestão assistida por radiação micro-ondas.

4.8 DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

A digestão da fração bioacessível foi realizada em digestor micro-ondas, adaptando um método relatado na literatura de amostras de comidas para bebês (DA SILVA *et al.*, 2013). O programa de aquecimento se encontra na Tabela 3. A digestão consistiu na pesagem de aproximadamente 0,100 g dos quimos diretamente nos frascos de Teflon® e adicionando 6 mL de ácido nítrico, deixando a mistura em pré-digestão por 1 hora. Os digeridos foram avolumados para 30 mL com água deionizada.

Tabela 3 Programa de aquecimento empregado no equipamento de micro-ondas para a digestão de amostras de suplementos alimentares

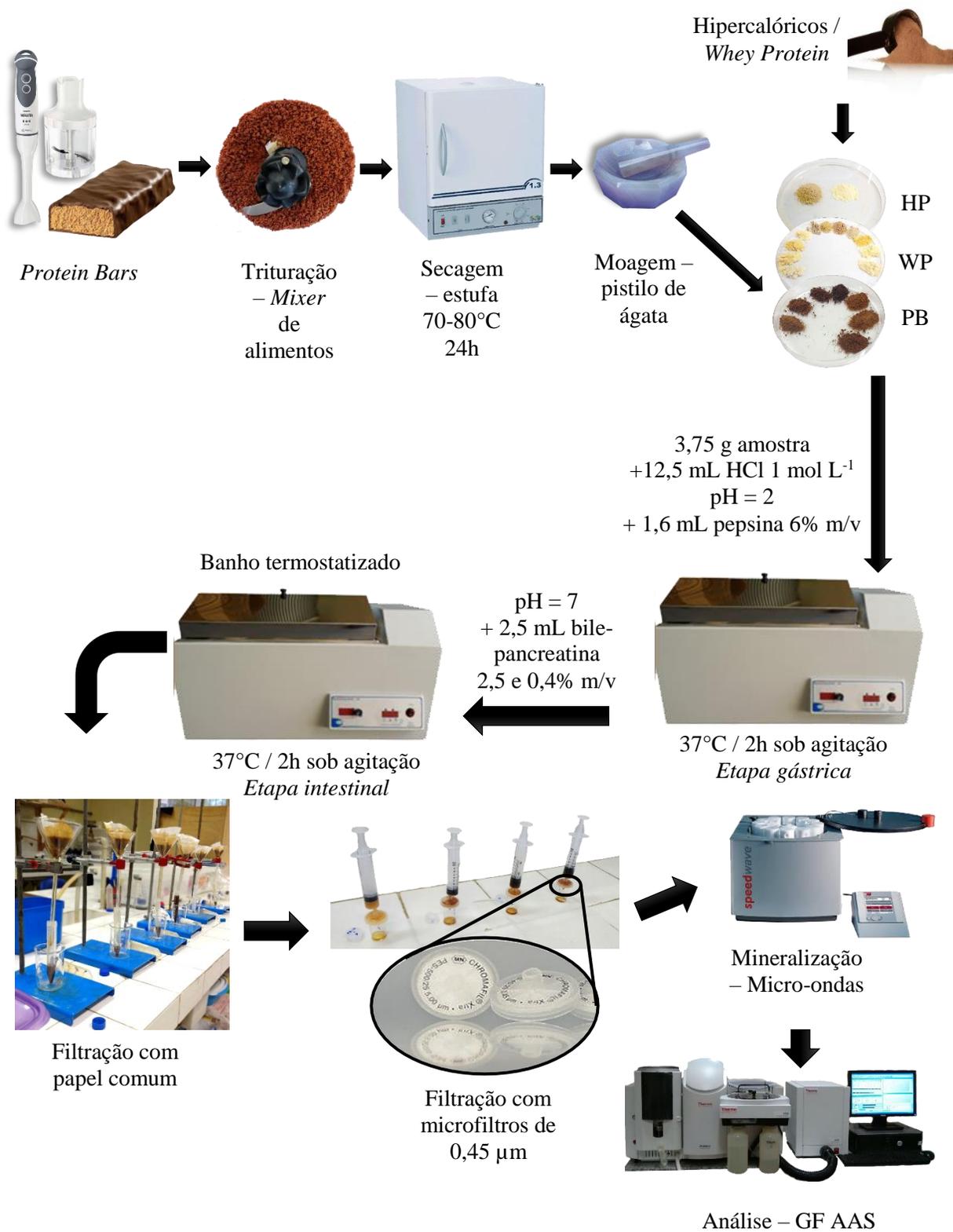
Temperatura (°C)	Tempo de alcance – Rampa (min)	Tempo de Residência (min)	Potência (%)
80	6	2	90
120	3	6	90
180	6	10	90

Fonte: Autoria Própria

4.9 DIGESTÃO EM CHAPA DE AQUECIMENTO

As amostras de hipercalórico foram pesadas, aproximadamente 0,5 g, em béqueres de 25 mL descontaminados em banho de HNO₃. Foram adicionados inicialmente 3 mL de HNO₃ concentrado, 65 % v/v, à essas massas e as misturas foram submetidas ao aquecimento com auxílio de chapa de aquecimento com temperatura em torno de 85 a 90 °C, com um sistema de refluxo composto pela sobreposição de vidros de relógio em cima dos béqueres. Foram feitas, no geral, mais duas adições sucessivas de ácido nítrico de 3 mL, até que se cessasse o desprendimento de vapores nitrosos. Os digeridos finais foram avolumados para balões volumétricos de 10,00 mL com água deionizada.

Figura 3 Esquemática do procedimento de preparo de amostras para determinação de Mn e Cr em frações bioacessíveis de suplementos



Fonte: Autoria Própria

4.10 FIGURAS DE MÉRITO

Segundo a IUPAC (do inglês, *International Union Of Pure and Applied Chemistry*), caso o estudo não apresente uma amostra de referência a qual possa ser utilizada para avaliar a exatidão do método (como foi o caso neste estudo), o ensaio de adição e recuperação pode ser uma boa alternativa (THOMPSON *et al.*, 1999). Neste contexto, a exatidão do método foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação de analito, que foram realizados em dois níveis de concentração.

A recuperação relaciona-se com a exatidão, como resultado da avaliação da quantidade de analito recuperada no processo ao qual a amostra é submetida. Foram adicionados diferentes volumes de solução padrão de Mn e Cr, ambos a 1 g L^{-1} , na fração bioacessível de um “mix” de amostra antes da digestão. Para o nível inferior foram adicionados $30 \text{ }\mu\text{L}$ desse padrão (correspondendo a $1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ na solução de leitura) enquanto para o nível superior foram adicionados $90 \text{ }\mu\text{L}$ (correspondendo à $3 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ na solução de leitura). Calcula-se a quantidade em porcentagem recuperada pelo processo segundo a fórmula da Equação 2 (BRITO *et al.*, 2003), onde C_1 corresponde à concentração do analito na amostra com o padrão adicionado, C_2 corresponde à concentração do analito na amostra e C_3 é a concentração referente à adição do padrão à amostra, na solução de leitura.

Equação 2 Cálculo para a porcentagem recuperada nos ensaios de adição e recuperação de analito

$$Rec \% = \frac{|C_1 - C_2|}{C_3} \times 100 \quad (2)$$

Quanto à precisão do método, a mesma foi avaliada calculando-se a estimativa do desvio padrão relativo (EDPR) de um conjunto de 10 leituras consecutivas ($n = 10$) para uma amostra “mix” digerida referente à fração bioacessível, obtendo-se assim um valor de EDPR para cada um dos tipos de suplementos estudados. A fórmula que expressa o EDPR está indicada na Equação 3, onde s é a estimativa do desvio padrão das medidas e M a média dessas medidas:

Equação 3 Cálculo para a estimativa do desvio padrão relativo

$$EDPR\% = \frac{s}{M} \times 100 \quad (3)$$

Em relação à sensibilidade, o limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança, sem ser necessariamente quantificada (SKOOG *et al.*; DE ANDRADE *et al.*, 2018). O limite de quantificação (LQ), por sua vez, conceitua-se pela menor concentração de analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis. Os limites de detecção e quantificação instrumentais podem ser descritos pelas Equações 4 e 5, respectivamente:

Equações 4 e 5 Fórmulas para cálculo dos limites de detecção e quantificação

$$LD = \frac{3,3 \times s_b}{m} \quad (4) ; \quad LQ = \frac{10 \times s_b}{m} \quad (5)$$

Nas equações 4 e 5, s_b é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração e m é o coeficiente angular dessa mesma curva.

Em GF AAS, a sensibilidade analítica também pode ser expressa em termos de massa, chamada neste caso de "massa característica" (m_0), cuja unidade é em picogramas devido à alta sensibilidade da técnica. A massa característica é aquela cujo sinal equivale à absorção de 1% da radiação, em outras palavras, correspondente a uma absorvância de 0,0044 (SLAVIN, 1988). O valor de m_0 foi calculado dividindo-se o valor de 0,0044 pelo coeficiente angular da curva analítica e multiplicando-o pelo volume da solução de amostra introduzido no tubo (30 μ L para Mn em HP e 20 μ L para o restante) (SLAVIN, 1988; WELZ & SPERLING, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

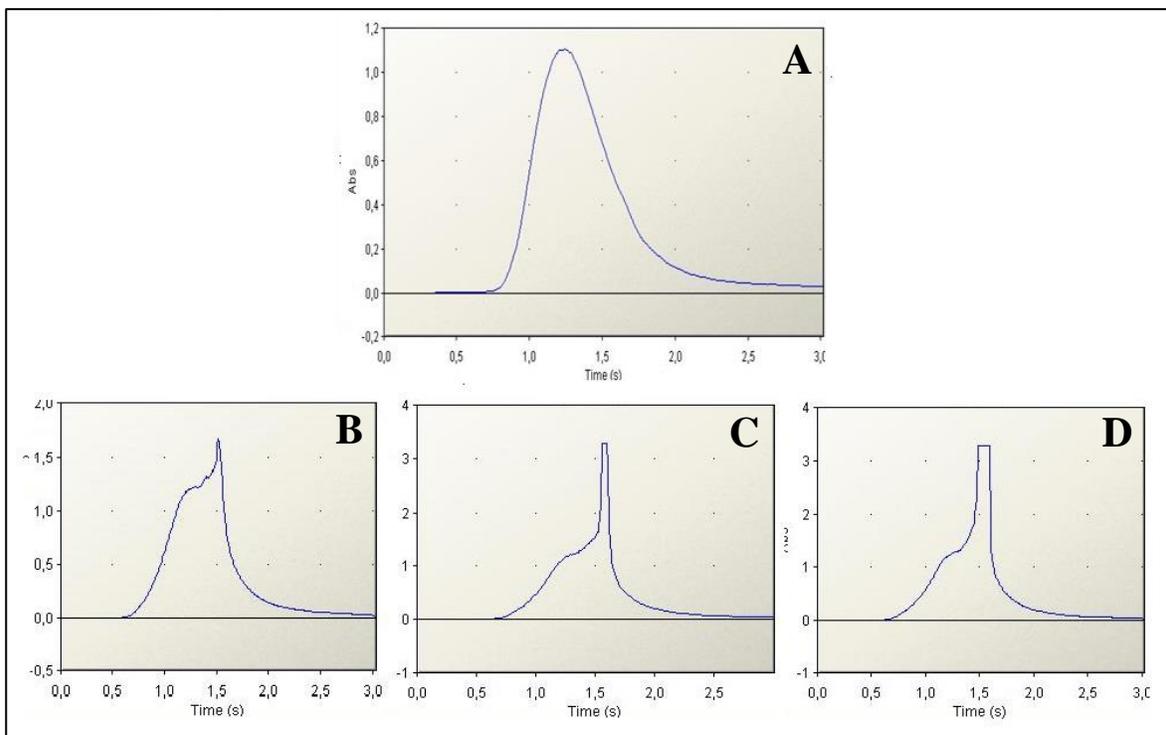
5.1 TESTES PRELIMINARES

5.1.1 Análise direta de Cromo/Manganês

De início, tentou-se realizar a determinação de Cr em hipercalóricos através de análise direta visando-se trabalhar com o menor número possível de etapas no preparo de amostra. Contudo, isso não foi possível provavelmente devido à alta complexidade da matriz dessas amostras. Para tal, seria necessário otimizar parâmetros como temperatura de secagem, tempo e temperatura de pirólise, temperatura de atomização e etapa de limpeza. Uma vez que o foco deste trabalho não foi a investigação dos teores bioacessíveis por análise direta, o estudo desse método mais elaborado foi postergado para etapas futuras.

A análise direta não se mostrou viável conforme indicado pela assimetria dos picos de absorvância, mostra na Figura 4. Como a fração bioacessível possui um alto teor de matéria orgânica, é aceitável inferir que a etapa de pirólise escolhida não tenha sido suficiente para a eliminação dos interferentes. Ao introduzir a amostra da fração bioacessível no atomizador, matéria orgânica não decomposta se depositava no tubo de grafite e também havia nesse momento um desprendimento de um odor característico de açúcar queimado, provavelmente devido ao alto teor de açúcar nas amostras de hipercalórico. Além disso, observou-se nesses ensaios que, com o passar do tempo, houve aumento de sinal analítico, devido ao fato de que a superfície do tubo acumulava resíduos carbonáceos (que aumentavam à medida que se depositava mais amostra). Esses resíduos chegaram a obstruir a passagem de luz pelo tubo e, desta forma, interferiam no resultado da análise.

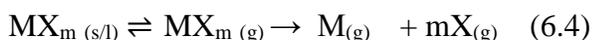
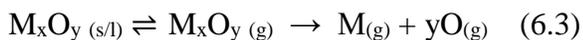
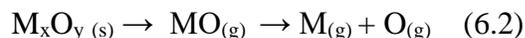
Figura 4 Perfis de absorvância para Cr na análise direta da fração bioacessível de hipercalóricos para introduções consecutivas de amostra no atomizador. A) Primeira queima, em um tubo pirolítico novo; B) segunda, C) terceira e D) quarta queimas de uma mesma amostra no mesmo tubo.



Fonte: Autoria Própria

Como descrito anteriormente, os perfis de absorvância mudavam com o tempo devido ao alto teor da matéria orgânica presente. Analisando o formato do pico, entretanto, há indícios de diferentes mecanismos de atomização do analito, favorecidos na condição de trabalho utilizada. Na literatura, picos duplos têm sido atribuídos a dois mecanismos de atomização do analito. Um mecanismo é a decomposição sólida do óxido metálico proveniente das etapas de secagem e pirólise, M_xO_y , representada na Equação 6.1. Muitos estudos mostram que um grande número de espécies de analito produzem átomos gasosos através das seguintes reações de redução (STURGEON *et al.*, 1976):

Equações 6 Mecanismos de formação de metais no estado gasoso no processo de atomização



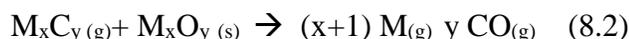
Sendo MX_m e M_xO_y , precursores dos átomos na fase gasosa, que são haletos ou óxidos, de respectivamente de ambos os metais. Como o manganês e cromo são elementos que formam carbetos, as reações que descrevem as interações dos átomos dos metais na forma gasosa ou óxidos metálicos reagindo parcialmente com carbono, formando esses carbetos, estão demonstradas a seguir pelas equações 7:

Equações 7 Reações de formação de carbetos



O M_xC_y é decomposto diretamente (Equação 8.1) ou de acordo com o mecanismo de redução de óxido por carbono (ROC) proposto L'vov para Al (STURGEON *et al.*, 1976), ele reage com $M_xO_y (s)$ (Equação 8.2):

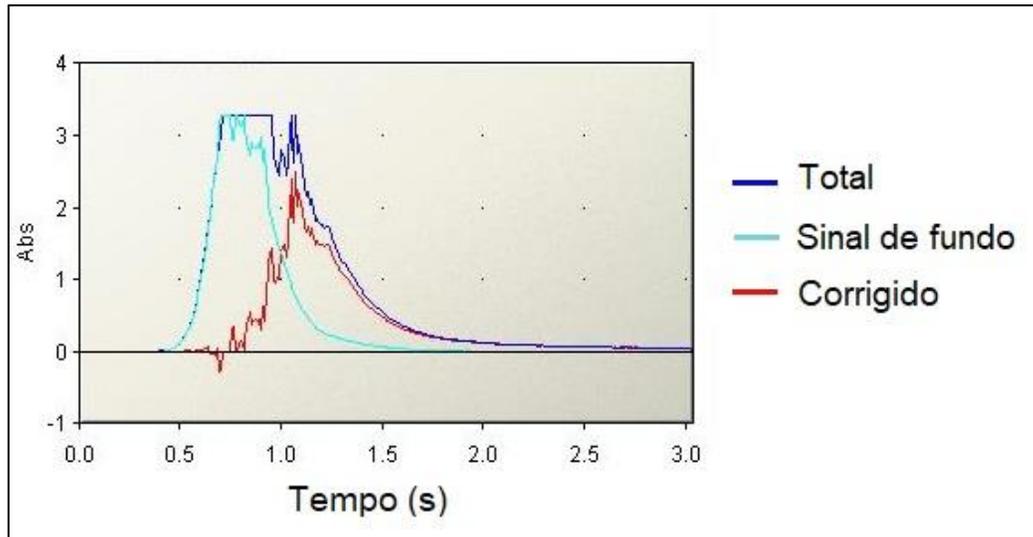
Equações 8 Reações de decomposição de carbetos



O estudo de mecanismos de atomização é um procedimento complicado e difícil de se realizar e, por isso, aqui foram listados alguns dos possíveis mecanismos que podem ocorrer na atomização de Cr e Mn, para tentar justificar a obtenção dos picos duplos observados.

A análise direta da fração bioacessível também foi realizada para o Mn e observou-se que grande parte do sinal analítico era contribuição do sinal de fundo, como mostrado na Figura 5. A correção de fundo utilizada foi a lâmpada de deutério, que não é recomendada para a determinação de Cr (WELZ & SPERLING, 1999).

Figura 5 Perfil de absorvância para a análise direta de Mn na fração bioacessível de suplementos



Fonte: Autorial Própria

Como foi observado que o estudo da determinação de ambos os analitos requeria uma atenção mais detalhada, optou-se pela mineralização ácida das frações bioacessíveis de suplementos alimentares. Poderiam ser empregados dois métodos diferentes para essa mineralização: a chapa de aquecimento e o forno micro-ondas.

Considerando o fácil acesso da chapa de aquecimento para digestão de amostras, neste momento da execução do projeto, avaliou-se a viabilidade da sua utilização como parte do método. Para isso, os parâmetros instrumentais do GF AAS, como temperaturas de pirólise, atomização e a massa de modificador, foram otimizados em conjunto com o preparo de amostras de forma multivariada, empregando-se planejamentos fatoriais.

5.2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA EM GF AAS DAS SOLUÇÕES MINERALIZADAS EM CHAPA DE AQUECIMENTO

5.2.1 Triagem

Para a otimização dos parâmetros instrumentais relativos a determinação dos níveis de manganês na fração bioacessível de suplementos alimentares por GF AAS, realizou-se primeiramente uma triagem com um planejamento de experimentos do tipo fracionário de 2^4 ¹. Os parâmetros escolhidos foram as temperaturas de pirólise (x_1) e atomização (x_2), a massa de modificador químico, $MgNO_3$, (x_3) e o tempo de pirólise (x_4), definidos em dois níveis e

sendo aplicados em 8 experimentos com 3 repetições no ponto central. É sabido que tais parâmetros podem contribuir para uma mudança do sinal avaliado quando alterados, e, por isso, eles foram escolhidos para investigar se apresentariam significância nos resultados do sistema.

Uma vez escolhidos os parâmetros para investigação, os valores a serem utilizados na triagem foram pesquisados na literatura e no manual do equipamento de GF AAS. Os valores centrais para pirólise e atomização foram adquiridos pelo manual e variou-se as temperaturas para que abrangesse um intervalo maior que encontrado na literatura. Nesse contexto, as temperaturas de pirólise e atomização variariam de 700 a 1100 °C e 1500 a 1800 °C, respectivamente. O tempo de pirólise e massa de modificador foram escolhidos similarmente, variando de 10 a 30 s e 0 a 10 µg respectivamente.

Os experimentos foram realizados utilizando-se uma amostra digerida da fração bioacessível do “mix” de amostras, de forma aleatória (por sorteio) e os dados gerados foram computados e calculados através do *software* Microsoft Excel. A matriz codificada contendo os níveis selecionados assim como os valores de resposta obtidos (absorvância integrada média, n = 3) estão compilados na Tabela 4.

Tabela 4 Matriz codificada e níveis utilizados para a triagem

Ensaio	Temperatura de Pirólise °C (x_1)	Temperatura de Atomização °C (x_2)	Massa de modificador µg (x_3)	Tempo de Pirólise s (x_4)	Média de sinal	RSD (%)
1	(-1) 700	(-1) 1500	(-1) 0	(-1) 10	0,898	6,1
2	(1) 1100	(-1) 1500	(-1) 0	(1) 30	0,936	3,0
3	(-1) 700	(1) 2100	(-1) 0	(1) 30	0,701	3,1
4	(1) 1100	(1) 2100	(-1) 0	(-1) 10	0,747	6,0
5	(-1) 700	(-1) 1500	(1) 10	(1) 30	0,752	0,3
6	(1) 1100	(-1) 1500	(1) 10	(-1) 10	0,876	9,0
7	(-1) 700	(1) 2100	(1) 10	(-1) 10	0,647	4,4
8	(1) 1100	(1) 2100	(1) 10	(1) 30	0,770	5,0
9	(0) 900	(0) 1800	(0) 5	(0) 20	0,636	4,0
10	(0) 900	(0) 1800	(0) 5	(0) 20	0,663	6,3
11	(0) 900	(0) 1800	(0) 5	(0) 20	0,646	8,2

Fonte: Autoria Própria

Para o cálculo dos efeitos, utilizou-se a multiplicação da forma transposta da tabela de coeficiente de contraste (\mathbf{X}^t) pela matriz de resultados obtidos em cada experimento (\mathbf{Y}). A composição da tabela é dada pela primeira coluna correspondendo à média (m), com sinal unitário +1, mais três colunas correspondendo aos efeitos principais x_1 a x_4 com sinais referentes aos níveis utilizados e as outras três colunas correspondendo à interação dos efeitos entre si e sendo seus valores unitários a multiplicação dos valores dos efeitos. O resultado dessa multiplicação é a matriz com o valor da estimativa de cada efeito e suas interações, como descrito na Equação 9 a seguir:

Equação 9 Obtenção matricial dos fatores da triagem

$$\begin{array}{c}
 X^t Y = \\
 \left[\begin{array}{cccccccc|c}
 m & x_1 & x_2 & x_3 & x_4 & x_1 x_2 & x_1 x_3 & x_1 x_4 & Y \\
 \hline
 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 0,898 \\
 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 0,936 \\
 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0,701 \\
 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 0,747 \\
 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 0,752 \\
 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 0,876 \\
 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 0,647 \\
 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0,770 \\
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,636 \\
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,663 \\
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,646
 \end{array} \right] = \begin{array}{l}
 \\ \\ \\
 m \\
 x_1 \\
 x_2 \\
 x_3 \\
 x_4 \\
 x_1 x_2 \\
 x_1 x_3 \\
 x_1 x_4 \\
 \\
 \end{array} \begin{array}{l}
 \\ \\ \\
 0,752 \\
 0,041 \\
 -0,075 \\
 -0,030 \\
 -0,001 \\
 0,001 \\
 0,020 \\
 0,022 \\
 \\
 \end{array}
 \end{array}$$

Fonte: Autoria Própria

A significância de cada fator é determinada pelo erro padrão dos valores obtidos no ponto central e o intervalo de confiança. O cálculo do erro padrão para cada efeito é dado pela Equação 10:

Equação 10 Equação matricial para erro padrão em planejamentos

$$\text{Erro padrão} = \sqrt{(X^t X)^{-1} s^2} \quad (10)$$

Onde s é erro padrão do ponto central. O intervalo de confiança é então calculado pelo produto do ponto da distribuição de Student, $t_{(2, 0,025)} = 4,303$, e o erro padrão, e está expresso na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5 Erros dos efeitos e intervalos de confiança

<i>Parâmetros</i>	Erros padrão	Intervalo de confiança	
<i>m</i>	0,0042	0,770	0,734
<i>x₁</i>	0,0049	0,063	0,020
<i>x₂</i>	0,0049	-0,054	-0,096
<i>x₃</i>	0,0049	-0,008	-0,051
<i>x₄</i>	0,0049	0,020	-0,022
<i>x₁x₂</i>	0,0049	0,022	-0,020
<i>x₁x₃</i>	0,0049	0,042	-0,001
<i>x₁x₄</i>	0,0049	0,043	0,001

Fonte: Autoria Própria

Os efeitos significativos são somente aqueles cujas as estimativas são superiores em valor absoluto ao produto do erro padrão pelo ponto da distribuição de Student. Ou seja, são significativos aqueles que tiveram os intervalos de confiança que não passavam pelo zero. Neste sentido, conclui-se com a triagem realizada que os efeitos significativos foram os correspondentes às temperaturas de pirólise e atomização e a massa de modificador. O tempo de pirólise e a interação dos fatores não se mostraram significativas.

5.2.2 Planejamento Box-Behnken

Uma vez realizada a triagem, foi realizado um estudo mais aprofundado sobre os fatores significativos para a determinação de Mn nas amostras de quimo de hipercalórico em GF AAS. A etapa de triagem oferece um modelo com uma visão limitada do que acontece no sistema e, por isso, é necessário que se encontre um modelo que melhor corresponda a relação das variáveis de entrada, os fatores de estudo, e a variável de saída, y . Neste contexto, o planejamento Box-Behnken foi escolhido para elucidar esse modelo.

Um modelo quadrático pode ser utilizado para a metodologia de superfície de resposta, Equação 11:

Equação 11 Modelo quadrático para superfície de resposta

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (11)$$

Onde x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores investigados que influenciam na resposta y ; β_0, β_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$), β_{ij} ($j = 1, 2, \dots, k$), são parâmetros desconhecidos e ε é um erro aleatório. A Equação 11 pode ser expressa na forma de matriz (Equação 12):

Equação 12 Modelo quadrático para superfície de resposta na forma matricial

$$y = bX + \varepsilon \quad (12)$$

Onde y é definido como a matriz de valores coletados, X a matriz de variáveis independentes, b a matriz de coeficientes do modelo e ε o erro. A matriz b pode ser obtida pela Equação 13:

Equação 13 Coeficientes do modelo quadrático na forma matricial

$$b = (X^t X)^{-1} X^t Y \quad (13)$$

Assim, os fatores escolhidos foram aqueles que foram significativos na triagem, nos mesmos níveis aplicados na triagem, exceto pelo modificador. Os níveis deste último fator foram escolhidos baseando-se no valor do coeficiente encontrado para x_3 na triagem, que foi muito próximo de zero. Assim, escolheu-se o valor de 5 μg como nível inferior, 7,5 e 10 μg como central e superior, respectivamente. A matriz codificada contendo os novos níveis selecionados, assim como os valores de resposta obtidos (média da absorvância integrada, $n = 2$), estão compilados na Tabela 6. Foram realizados 15 ensaios dos quais 3 foram referentes ao ponto central.

Os coeficientes da Equação 12, os erros e os intervalos de confiança a 95% de confiança ($t_{(1, 0,025)} = 12,706$) estão expressos na Tabela 6. Neste sentido, a relação matemática que conecta as variáveis avaliadas com as respostas obtidas no GF AAS para a determinação de Mn em hipercalóricos está expressa na Equação 14.

Equação 14 Equação da superfície de resposta construída para a absorvância média de Mn na fração bioacessível de hipercalóricos em função da temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA) e massa de modificador (Mod).

Absorbância média

$$= (0,536 \pm 0,0082) + (-0,003 \pm 0,005)TP + (-0,084 \pm 0,005)TA + (-0,084 \pm 0,005)Mod + (-0,013 \pm 0,007)TP^2 + (0,049 \pm 0,007)TA^2 + (0,065 \pm 0,007)Mod^2 + (0,030 \pm 0,007)TP.TA + (-0,005 \pm 0,007)TP.Mod + (-0,011 \pm 0,007)TA.Mod \quad (14)$$

Tabela 6 Variáveis independentes e seus níveis avaliados no Box-Behnken para determinação de Mn em hipercalóricos por GF AAS

Ensaio	Temperatura de Pirólise °C (x ₁)	Temperatura de Atomização °C (x ₂)	Massa de modificador µg (x ₃)	Sinal médio	RSD (%)
1	(-1) 700	(-1) 1500	(0) 7,5	0,731	4,64
2	(1) 1100	(-1) 1500	(0) 7,5	0,637	1,55
3	(-1) 700	(1) 2100	(0) 7,5	0,498	2,56
4	(1) 1100	(1) 2100	(0) 7,5	0,524	3,38
5	(-1) 700	(0) 1800	(-1) 5	0,701	17,82
6	(1) 1100	(0) 1800	(-1) 5	0,734	4,05
7	(-1) 700	(0) 1800	(1) 10	0,505	1,96
8	(1) 1100	(0) 1800	(1) 10	0,517	0,96
9	(0) 900	(-1) 1500	(-1) 5	0,786	17,13
10	(0) 900	(1) 2100	(-1) 5	0,643	20,03
11	(0) 900	(-1) 1500	(1) 10	0,679	6,25
12	(0) 900	(1) 2100	(1) 10	0,493	2,15
13	(0) 900	(0) 1800	(0) 7,5	0,552	5,89
14	(0) 900	(0) 1800	(0) 7,5	0,534	0,40
15	(0) 900	(0) 1800	(0) 7,5	0,524	0,95

Fonte: Autoria Própria

Tabela 7 Coeficientes, erros e intervalos de confiança do planejamento Box-Behnken

	Coeficientes	Erro	Intervalos de confiança	
m	0,536	0,008	0,641	0,431
b₁	-0,003	0,005	0,061	-0,067
b₂	-0,084	0,005	-0,020	-0,149
b₃	-0,084	0,005	-0,020	-0,148
b₁₁	0,013	0,007	0,107	-0,082
b₂₂	0,049	0,007	0,143	-0,046
b₃₃	0,065	0,007	0,160	-0,029
b₁₂	0,030	0,007	0,121	-0,061
b₁₃	-0,005	0,007	0,085	-0,096
b₂₃	-0,011	0,007	0,080	-0,102

Fonte: Autoria Própria

A análise de variância foi realizada para avaliação numérica do ajuste do modelo proposto e os resultados se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 Análise de variância para o ajuste da superfície de resposta para a determinação de Mn na fração bioacessível de hipercalóricos

Fonte de variação	Soma Quadrática	N° de G. L.	Média Quadrática	Falta de ajuste	Significância
Regressão	0,136	9	0,0151	$F_{faj-calc} = 2,71$	$F_{reg-calc} = 15,3$
Resíduos	0,004	5	0,000985		
Falta de ajuste	0,007	3	0,00249	$F_{faj-tab} = 5,41$	$F_{reg-tab} = 0,29$
Significância	0,002	2	0,000919		
Total	0,140	14			
% Variação explicada			97,79		
% Máxima de variação explicável			98,67		

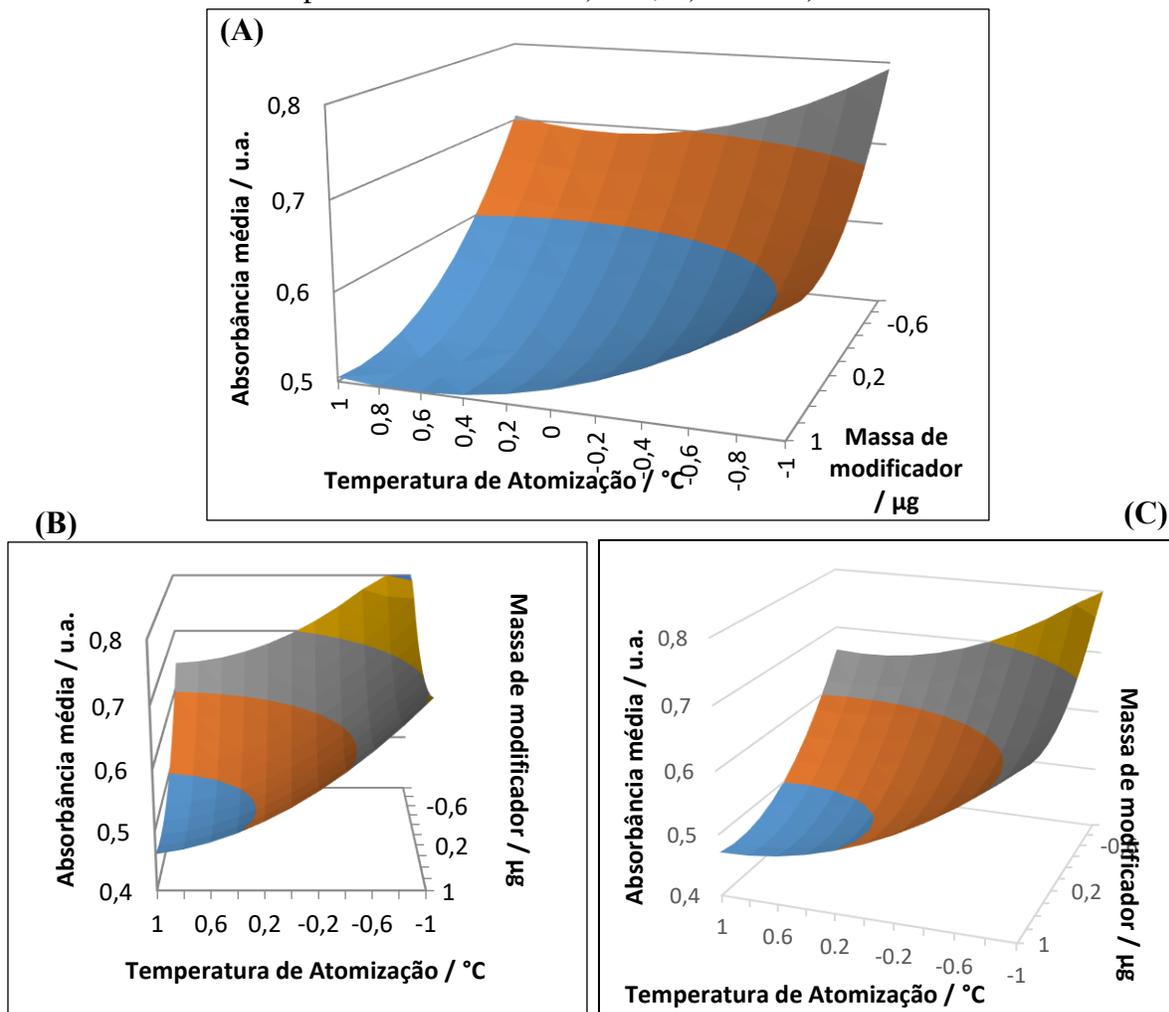
Fonte: Autoria Própria

Os resultados indicam uma ausência de falta de ajuste a 95% de confiança, uma vez que o valor de F calculado, $F_{\text{faj-calc}}$, foi menor que o valor tabelado. Há também a indicação da existência de uma relação quadrática entre as variáveis, como resultado do valor $F_{\text{reg-calc}}$ ser maior do que o valor de $F_{\text{reg-tab}}$, conferindo assim uma boa significância para o modelo.

Como pode se observar pela Tabela 6, os únicos intervalos de confiança que não passaram pelo zero foram os referentes aos coeficientes b_2 e b_3 , temperatura de atomização e massa de modificador respectivamente. Neste contexto, superfícies de resposta foram criadas fixando o parâmetro de temperatura de pirólise, x_1 , e variando os outros dois. A temperatura de pirólise foi fixada nos níveis -1, 0 e 1, criando-se assim três superfícies de resposta.

As superfícies de resposta na Figura 6 mostram que as melhores respostas, ou seja, os maiores valores para a absorvância média se dão quando os valores de temperatura de atomização e massa de modificador vão para os seus menores níveis, 1500 °C e 5 µg. Os maiores valores de absorvância obtidos foram para temperatura de pirólise de 700 e 900 °C, 0,847 e 0,807 respectivamente. No entanto, maiores temperaturas de pirólise são melhores de serem utilizadas para completa decomposição da matriz a ser analisada no GF AAS; além disso, o coeficiente b_1 tem um valor muito próximo de 0, indicando assim que a melhor temperatura de pirólise a ser utilizada seria a de 900 °C. Assim, as condições definidas e otimizadas para a determinação de Mn em hipercalóricos estão definidas na Tabela 9, além da adição de 5 µg de modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Figura 6 Superfícies de resposta obtidas com Box-Behnken da absorbância média em função da temperatura de atomização ($^{\circ}\text{C}$) e massa de modificador (μg), com temperaturas de pirólise fixadas em: A) 700, B) 900 e C) 1100 $^{\circ}\text{C}$



Legenda: ■ 0,4-0,5 ■ 0,5-0,6 ■ 0,6-0,7 ■ 0,7-0,8

Fonte: Autoria Própria

Tabela 9 Programa de aquecimento para a determinação de Mn em hipercalóricos por GF AAS

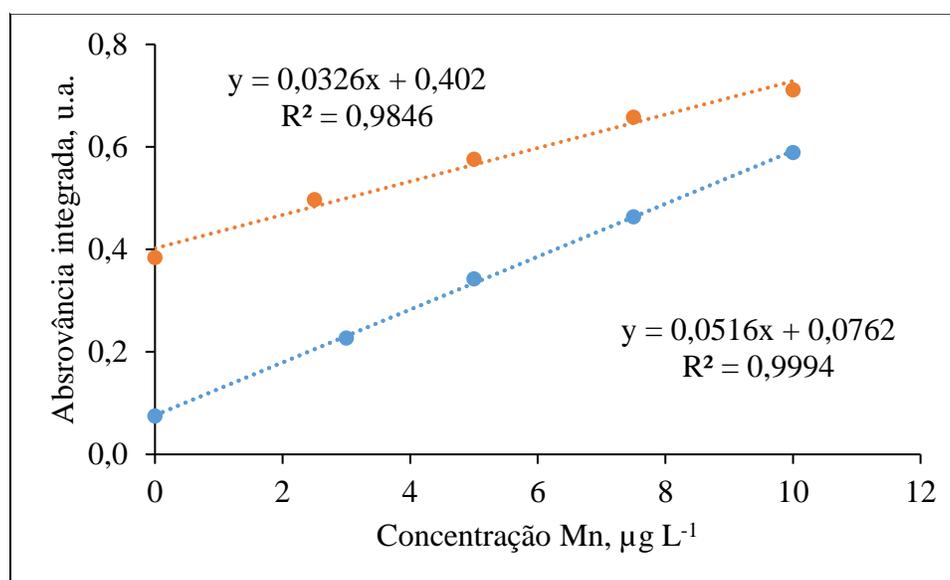
Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Tempo / s	Rampa / $^{\circ}\text{C s}^{-1}$	Vazão de gás / L min^{-1}
100	30	10	0,2
900	20	120	0,2
1500	3	0	0
2500	3	0	0,2

Fonte: Autoria Própria

5.2.3 Curva analítica e tratamento estatístico para a otimização multivariada

Comparou-se as curvas de calibração externa e simulação de matriz com uma faixa de trabalho de 3 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir de uma solução padrão estoque de manganês 1000 mg L^{-1} , ajustada com ácido nítrico destilado para 2% v/v. A preparação da curva de simulação de matriz foi realizada com adições de 2,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de manganês à 500 μL de amostra “mix” da fração bioacessível digerida, em triplicatas autênticas. Ambas as curvas foram graficamente comparadas na Figura 7.

Figura 7 Curvas analíticas de calibração externa para Mn em meio ácido e adição de padrão à amostra de hipercalórico



Fonte: Autoria Própria

Tabela 10 Comparação entre calibração externa e adição de padrão

Curva Analítica	Equação da reta	Concentração Mn / $\mu\text{g L}^{-1}$
Simulação de matriz	$(0,033 \pm 0,002).x + (0,40 \pm 0,01)$	$(11,3 \pm 0,6)$
Calibração externa	$(0,052 \pm 0,001).x + (0,077 \pm 0,008)$	$(6,0 \pm 0,6)$

Fonte: Autoria Própria

A comparação entre as duas curvas de calibração permitiu constatar que há uma diferença significativa entre os resultados, indicando interferências de matriz. Este resultado está relacionado com a complexidade amostral, que se deve provavelmente às altas concentrações de açúcares, impossibilitando o uso da calibração externa. Isso indica que o emprego ácido nítrico concentrado e a chapa de aquecimento não foram suficientes para a digestão completa da amostra.

Neste contexto, um melhor preparo de amostra, como a digestão assistida por radiação micro-ondas, seria o mais adequado para que esse tipo de análise. Outra observação relevante relaciona-se ao programa de aquecimento otimizado de forma multivariada: embora esteja presente na literatura trabalhos que o utilizem em GF AAS, não se obteve êxito neste trabalho, o que pode estar relacionado a baixa temperatura de pirólise, que é uma etapa importante para eliminação de efeitos de matriz.

5.3 REAGENTES PARA A MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

Foi feita uma comparação entre uma mistura de ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio, com o uso de apenas ácido nítrico concentrado, ambos utilizados para a mineralização das frações bioacessíveis de um “mix” de amostras de WP e PB. As amostras foram deixadas em pré-digestão para máximo desprendimento de vapores nitrosos antes da introdução dos frascos no equipamento, evitando que a pressão no interior dos vasos não atingisse valores muito elevados durante a digestão. Para a combinação HNO_3 e H_2O_2 , o sinal se mostrou um pouco maior em relação ao digerido com ácido nítrico concentrado; contudo, o sinal do branco também se mostrou elevado, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 Valores médios de absorvância integrada obtidos para Mn após digestão com ácido nítrico concentrado e ácido nítrico misturado com peróxido de hidrogênio

Amostra	HNO ₃ + H ₂ O ₂	HNO ₃
Branco	0,327 ± 0,01	0,086 ± 0,06
WP	0,633 ± 0,03	0,581 ± 0,05
PB	0,555 ± 0,01	0,518 ± 0,03

Fonte: Autorial Própria

Uma vez que esse teste comparativo foi realizado para a mineralização dos suplementos no trabalho de Lisboa (2016) e obteve-se resultados similares, inferiu-se a possibilidade de impurezas presentes no H₂O₂ e o uso desse reagente no processo de mineralização foi descartado, optando-se pela mineralização das amostras fazendo uso de HNO₃.

5.3.1 Modificador químico

Os modificadores químicos são conceituados por “compostos que são introduzidos no atomizador de grafite simultaneamente com uma amostra teste e diminuem drasticamente os efeitos de matriz”. O emprego do modificador químico possui a finalidade de reduzir, ou mesmo eliminar, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra (VOLYNSKII, 1975).

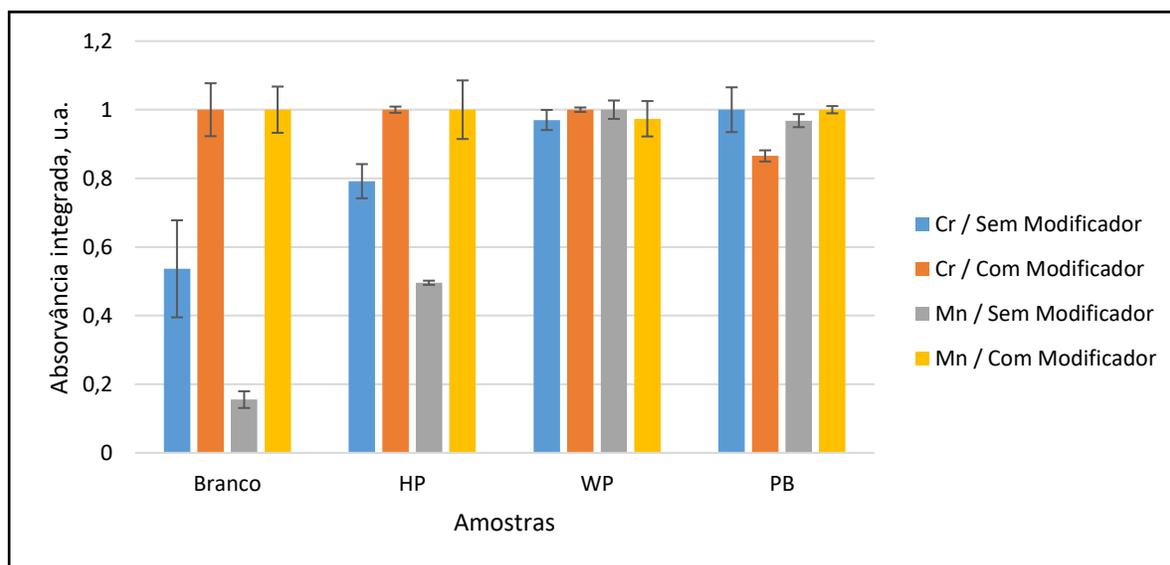
O mecanismo de ação da maioria dos modificadores consiste na conversão das espécies da matriz em componentes mais voláteis ou na diminuição da volatilização dos compostos dos analitos. Isto permite a utilização de temperaturas mais elevadas na etapa de pirólise, favorecendo a separação do analito da matriz, sem afetar a atomização do analito de interesse (VOLYNSKII, 1975; WELZ & SPERLING, 1999).

Existem um grande número de compostos que são usados como modificadores. No entanto, os modificadores mais utilizados na literatura são o nitrato de magnésio, Mg(NO₃)₂ e a mistura de paládio com nitrato de magnésio (conhecida como “modificador universal”) (VOLYNSKII, 1975).

Nesse contexto, foi realizado um teste com o modificador $Mg(NO_3)_2$ utilizando as soluções da fração bioacessível mineralizada do “mix” de amostras. Isso foi feito para cada um dos grupos de suplemento alimentar, adicionando-se $10 \mu g$ de modificador na solução de leitura (para ambos os analitos). Essa quantidade foi escolhida com base em dados da literatura para amostras de alimentos (PAES, 2007; SOARES *et al.*, 2010).

Como disposto no gráfico da Figura 8, os sinais de absorvância para cromo e manganês não se diferem de forma expressiva nas amostras “mix” de WP e PB quando se faz uso do modificador. No entanto, existe uma variação relativamente pequena para o cromo em HP, que pode ser inferido ao próprio sinal do modificador, como pode-se observar na diferença de sinais ocorrida no branco correspondente. Já para o manganês, a variação de sinais foi maior em HP, em torno de 50% a mais. Por outro lado, também não foram observadas diferenças significativas para as demais amostras. Este comportamento foi similar ao reportado no trabalho de Paes, que utilizou a mesma quantidade de modificador em amostras de mel (PAES, 2007).

Figura 8 Efeito do modificador $Mg(NO_3)_2$ nos sinais médios de absorvância integrada normalizados para Cr e Mn em suplementos alimentares: Br – branco; HP – hipercalórico; WP – *whey protein*; PB – *protein bar*.



Fonte: Autoria Própria

Para explicar a ausência da diferença expressiva de sinais nos “mixes” de amostra ao utilizar $Mg(NO_3)_2$, a presença do mineral Mg foi investigada nas amostras em estudo. Para isso, empregou-se o modo chama do espectrômetro de absorção atômica já em uso. As

condições de análise no equipamento foram ajustadas segundo a recomendação do fabricante e as concentrações de Mg nas soluções mineralizadas foram determinadas por calibração externa (ANEXO 1). Verificou-se que a quantidade desse elemento nessas soluções de amostra é na ordem de 10 µg, quantidade próxima àquela empregada em outros trabalhos (PAES, 2007) e, também, no manual do equipamento para a determinação de Mn. Neste sentido, as amostras das frações bioacessíveis de suplemento já possuiriam um “modificador químico natural”, não sendo necessário adicionar $Mg(NO_3)_2$ nas soluções de leitura.

Neste contexto, decidiu-se que seria mais adequado realizar as otimizações instrumentais no GF AAS adicionando-se o modificador apenas para o “mix” de amostras de HP, uma vez que somente para esse “mix” de amostras obteve uma diferença expressiva no sinal de absorvância integrado quando da presença do modificador.

5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO GF AAS

As determinações por GF AAS estão sujeitas a diversos problemas experimentais, como perda de analito antes da atomização, resultando queda de sensibilidade em matrizes mais complexas e, às vezes, efeitos de memória. Neste contexto, otimizações principalmente das temperaturas das etapas de pirólise e atomização devem ser realizadas.

5.4.1 Temperaturas de pirólise

Para estabelecer a temperatura de pirólise, fixou-se a temperatura de atomização nos valores propostos pelo manual do equipamento para Cr e Mn (2500 e 1800°C respectivamente), e variou-se os valores de temperatura em uma faixa de acordo com valores já empregados para esses analitos como descritos na literatura. A faixa de pirólise para Mn variou de 700 a 1500°C e para Cr, variou de 800 a 1700°C. Empregou-se o uso de modificador para a otimização de Mn em hipercalóricos.

Assim, os sinais de absorvância integrada foram coletados para os “mixes” das frações bioacessíveis de HP, WP e PB digeridos, bem como para padrões de Cr e Mn em meio aquoso, variando-se as temperaturas de pirólise a cada 100°C. A partir dos valores obtidos, foram construídas curvas de sinal de absorvância em função da temperatura, conforme mostrado nas Figuras 9, 11 e 13.

A escolha das temperaturas ótimas de pirólise baseou-se na busca da maior relação entre sinal analítico obtido antes da queda desse sinal. Comparou-se ainda o perfil das curvas de temperatura das amostras com padrões dos analitos, para que se estabelecesse uma temperatura ótima em ambos os meios e assim, viabilizando a utilização de calibração externa em meio de ácido diluído. Essa estratégia não é usualmente empregada nesse tipo de estudo, uma vez que se deva escolher uma temperatura ótima para a análise das amostras e aplicar essas condições à calibração externa. É importante ressaltar que essa forma de escolha foi realizada primeiramente como um teste, e seria reformulada para outros valores caso os parâmetros de mérito não se mostrassem adequados.

Para a determinação de Mn em HP, foi selecionada a temperatura de pirólise de 1200°C e, em WP e PB foi selecionada a temperatura de 1100°C. Já para o Cr as temperaturas ótimas em todos os suplementos foram de 1500°C.

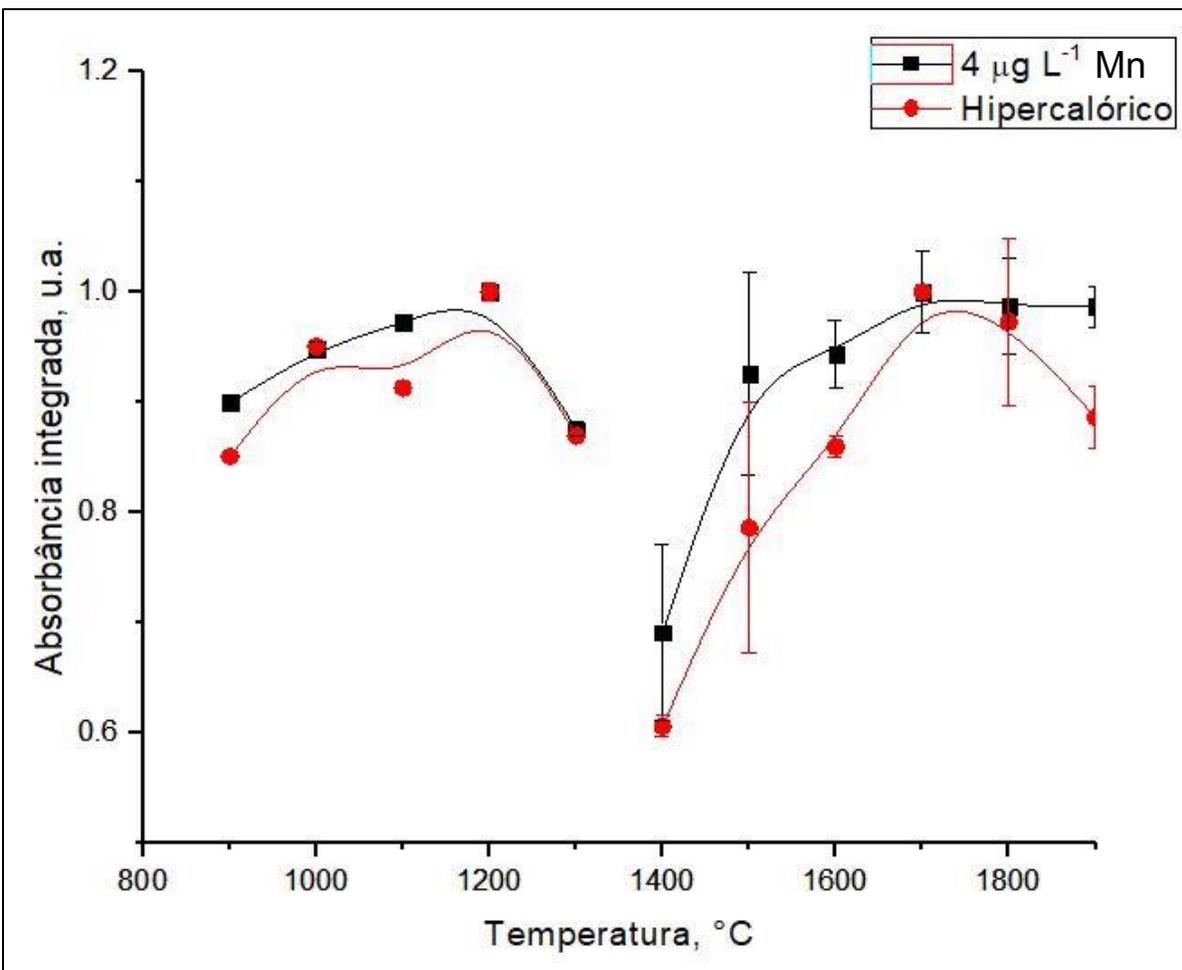
5.4.2 Temperaturas de atomização

As temperaturas de pirólise foram fixadas nos valores ótimos obtidos e variaram-se os valores de temperatura de atomização para a construção de novas curvas de sinal analítico em função da temperatura.

O intervalo de temperatura de atomização o para Mn foi de 1100 a 1800°C e para Cr, a variação foi de 1800 a 2500 °C para todos os três tipos de amostras. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 9, 11 e 13, respectivamente. As temperaturas de atomização selecionadas foram aquelas onde se obteve o maior sinal analítico em uma menor temperatura (condição de compromisso), considerando-se também a precisão das leituras. Dessa forma, visou-se obter uma boa sensibilidade analítica e, ao mesmo tempo, evitar a degradação precoce das paredes do tubo de grafite (CORREIA *et al.*, 2003).

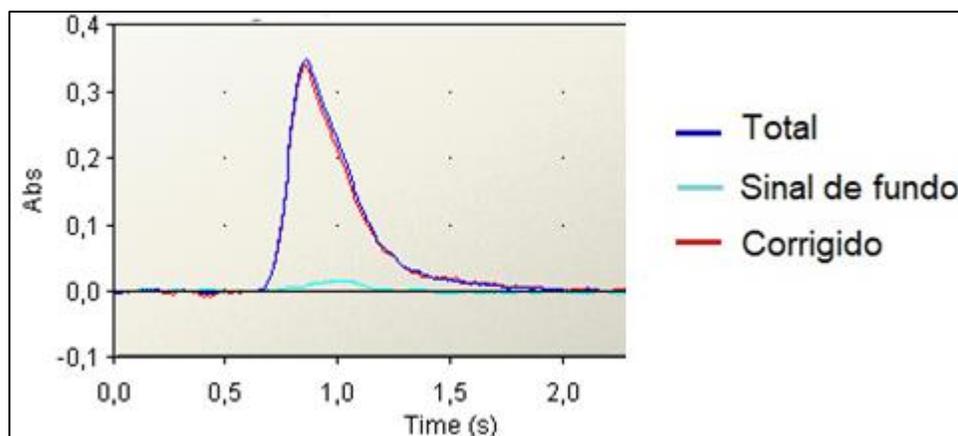
A simetria dos picos também foi levada em consideração, pois picos assimétricos podem indicar a coexistência de diferentes mecanismos de atomização, os quais podem ser diferentes para amostras e padrões, prejudicando a exatidão. Neste sentido, os perfis de absorvância, referentes às temperaturas ótimas escolhidas, estão apresentados nas Figuras 10, 12 e 14 para Mn e Cr, respectivamente.

Figura 9 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a solução padrão de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn e amostra de hipercalóricos (Temperatura usada para a atomização: $1800 \text{ }^\circ\text{C}$; $10 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$)



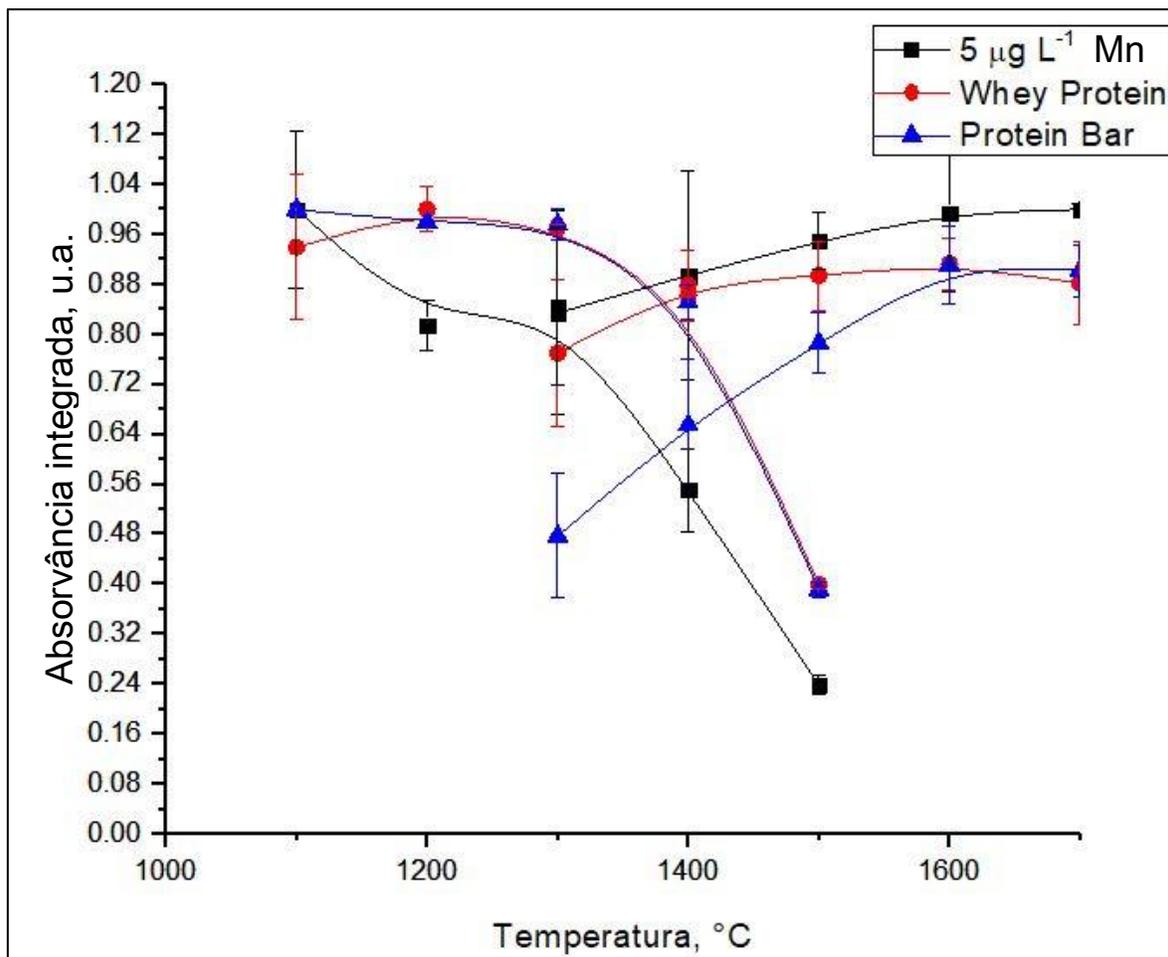
Fonte: Autoria Própria

Figura 10 Perfil de absorvância para Mn no “mix” de amostra de hipercalóricos



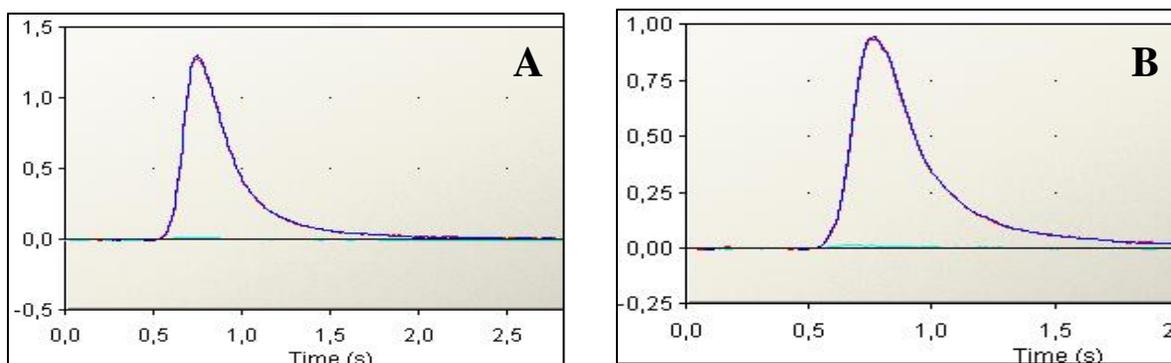
Fonte: Autoria Própria

Figura 11 Curvas de pirólise e atomização para a solução padrão $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Mn}$, *whey protein* e *protein bar* (Temperatura usada para a atomização: $1800 \text{ }^\circ\text{C}$)



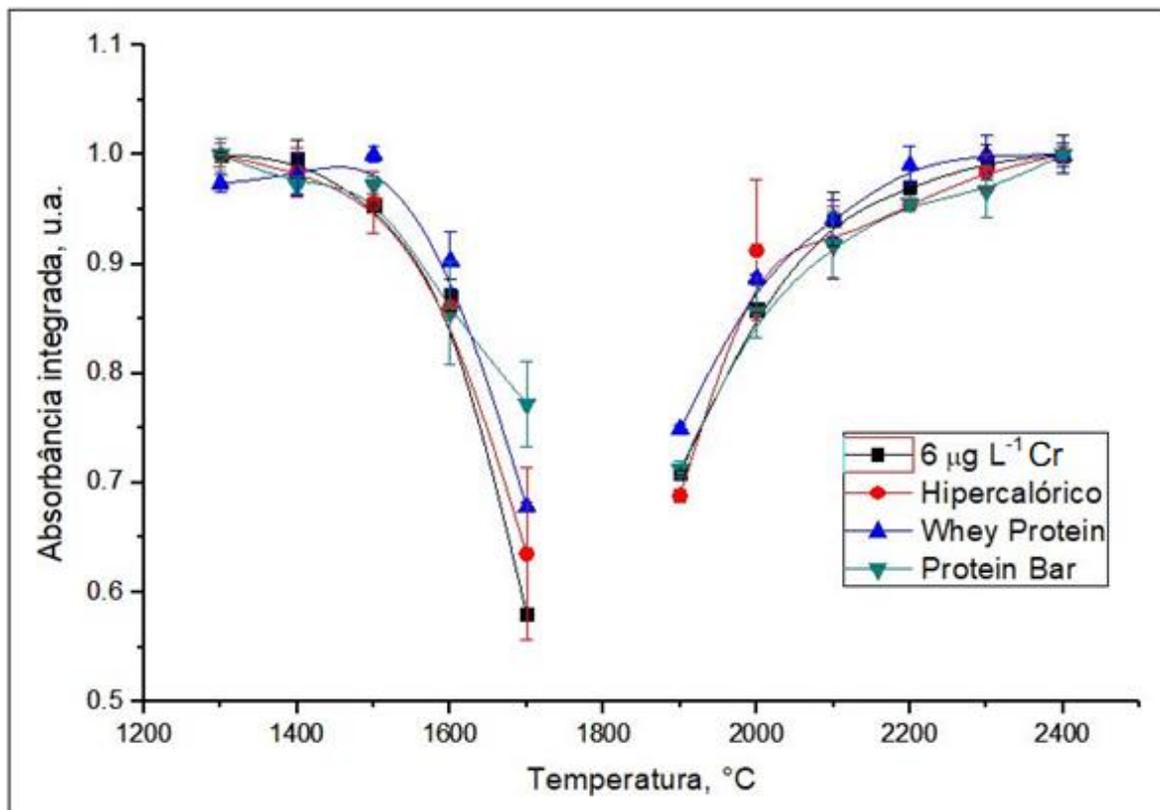
Fonte: Autoria Própria

Figura 12 Perfis de absorvância de Mn no “mix” de amostras de A) *whey protein* e B) *protein bar*



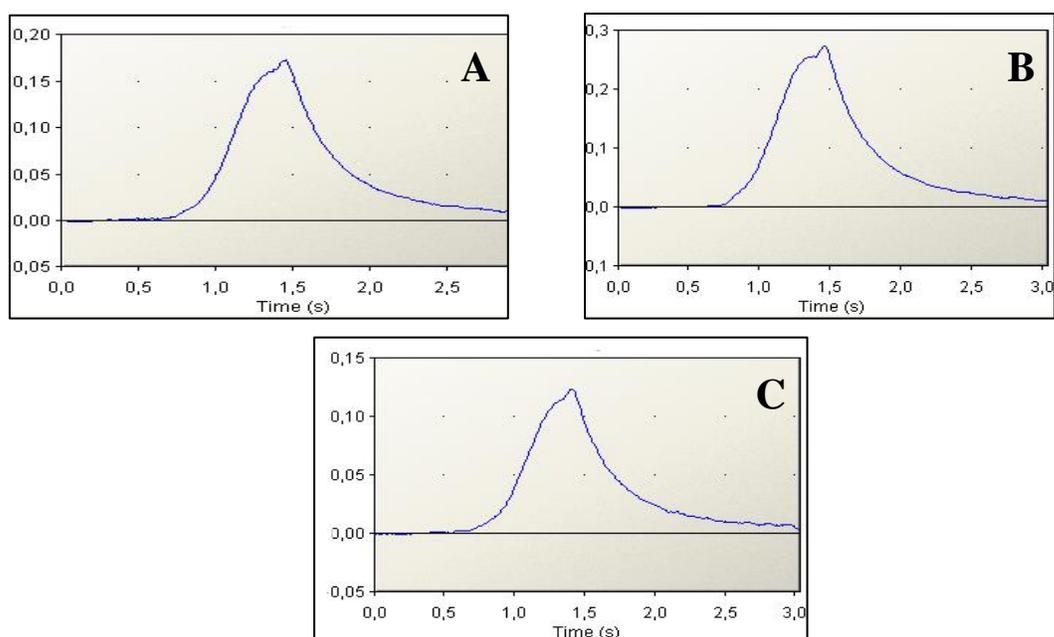
Fonte: Autoria Própria

Figura 13 Curvas de pirólise para a solução padrão Cr $6 \mu\text{g L}^{-1}$, hipercalóricos, *whey protein* e *protein bar* (Temperatura usada para a atomização: $2500 \text{ }^\circ\text{C}$)



Fonte: Autoria Própria

Figura 14 Perfis de absorvância de Cr do “mix” de amostras de A) hipercalóricos B) *whey protein* e C) *protein bar*



Fonte: Autoria Própria

A Tabela 12 mostra o programa de aquecimento otimizado para o Mn e Cr nos diferentes suplementos.

Tabela 12 Programa de aquecimento utilizado para a determinação de Mn e Cr nos digeridos das frações bioacessíveis de suplementos alimentares

Etapa	Temperatura / °C	Tempo / s	Rampa / °C s ⁻¹	Vazão de gás / L min ⁻¹
Secagem	100	30	10	0,2
Pirólise	1200 ^a /1100 ^b /1500 ^c	20	120	0,2
Atomização	1600 ^{a,b} /2300 ^c	3	0	0
Limpeza	2500	3	0	0,2

^aMn em Hiper-calóricos, ^bMn em *Whey Protein* e *Protein Bar*, ^cCr em todos os três tipos de amostras de suplementos.

Fonte: Autoria Própria

5.5 CURVA ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Nas análises instrumentais em GF AAS a amostra gera um sinal de absorvância, cuja magnitude é proporcional à quantidade de analito presente na mesma (HARVEY, 2000). Esse sinal se relaciona com a concentração por meio de um método de calibração.

Assim, os resultados analíticos são determinados com base nas respostas observadas para a curva de calibração, que constitui uma série de soluções do analito com concentração conhecida. A curva de calibração externa é a mais utilizada das calibrações e são preparadas "separadamente das amostras" empregando padrões analíticos que são diluídos em ácido diluído, geralmente. Esse método de calibração oferece uma grande vantagem em laboratórios onde muitas amostras devem ser analisadas ou quando a análise de amostras deve ser obtida de forma rápida, visto que a preparação desse tipo de curva é relativamente simples e rápida (HARVEY, 2000).

A curva de calibração externa, no entanto, oferece uma séria limitação. Assume-se que qualquer diferença na matriz dos padrões e a matriz da amostra não tem efeito na magnitude e/ou perfil do sinal analítico. Logo, a existência dessa diferença (quando ocorre) gera um erro sistemático que pode ser para mais ou menos, em relação à concentração verdadeira do analito (HARVEY, 2000).

Nesse sentido, a curva de adição de padrão diminui a complexidade da combinação da matriz dos padrões com a da amostra, fazendo-se adições crescente de analito (por meio de soluções padrão) à amostra para a construção da curva analítica (HARVEY, 2000). Para a produção dessa curva de calibração, cada ponto (ou padrão) deve ter um mesmo volume de amostra, porém com diferentes quantidades de analito.

A geração dos sinais obtidos em função da concentração dos analitos deve acontecer de forma linear para que a sensibilidade do método seja igual em todos os pontos. No entanto, a existência de erros indeterminados durante as medidas gera a perda de linearidade na calibração. Assim, é necessário que se derive uma curva de calibração que melhor ajuste uma linha reta entre os pontos obtidos, e a análise de regressão utilizando o método dos mínimos quadrados fornece um meio para a obtenção dessa linha (SKOOG, 2008).

Considerando-se esses aspectos, comparações foram realizadas entre as curvas de calibração externa (meio aquoso contendo ácido nítrico a 2% v/v) e de adição de padrão (feitas com 500 μL do digerido da fração bioacessível do “mix” das respectivas amostras). Foram preparadas curvas analíticas monoelementares na faixa de trabalho entre 2 e 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir de soluções padrão estoque de Cr e Mn 1000 mg L^{-1} , diluídas com ácido nítrico destilado de forma a se obter uma acidez final de 2% v/v.

Essas comparações visaram verificar o efeito de matriz, como ilustrado nas Figuras 15 e 16 para Mn e Figura 17 para Cr. Na Figura 13, a curva de calibração externa (CE) e a curva de adição de padrão para HP (AP HP) foram realizadas com adição de modificador químico. Todas as curvas foram realizadas em duplicatas autênticas, ou seja, duas curvas, com 5 níveis de adição de analito foram produzidas separadamente. Seus coeficientes de determinação (R^2) foram todos superiores a 0,9920.

Uma vez coletadas as concentrações dos “mix” de amostras digeridos em cada uma das curvas de calibração, aplicou-se o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as amostras “não-matrizadas” e “matrizadas” poderiam ser consideradas estatisticamente iguais. Esse teste está descrito pela Equação 15:

Equação 15 Teste F (Fischer-Snedecor)

$$F_{calc} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (15)$$

Onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias das concentrações das replicatas das amostras não-matrizadas e matrizadas, pois as “não-matrizadas” apresentam a maior variância. Uma vez calculado o valor de F (F_{calc}), verificou-se o valor crítico tabelado (F_{crit}) com “n-1” graus de liberdade para ambos numerador e denominador, a 95% de confiança. Esse valor correspondeu a 161 e a Tabela 13 aponta quais foram os resultados de F_{calc} para cada elemento nas respectivas amostras de suplemento.

Tabela 13 Valores de F calculados para comparação de variâncias de concentrações de Mn e Cr nas amostras de suplemento

Amostra	Cr	Mn
HP	1,4	5,7
WP	0,9	2,2
PB	1,3	7,9

Fonte: Autorial Própria

Uma vez que os valores de F_{calc} foram menores que os valores de F_{crit} , pode-se inferir que a 95% as variâncias são consideradas iguais e a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios-padrão dos grupos podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student. O cálculo de t é dado pela Equação 16 a seguir:

Equação 16 Cálculo de t de Student não-pareado com variância agrupada

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{agrupado} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (16)$$

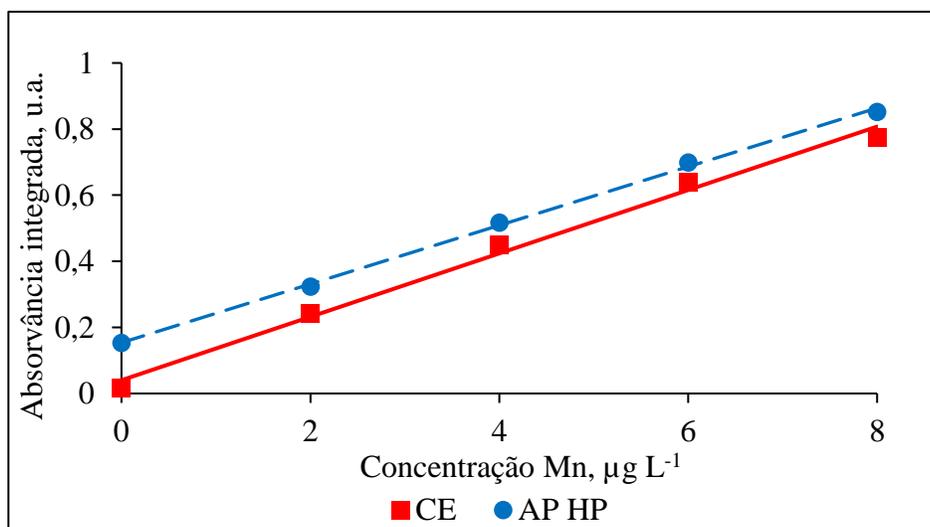
Onde \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias das respostas dos analitos nas amostras matrizadas e não-matrizadas, n_1 e n_2 são o tamanhos das amostras (que no caso de duplicatas, esse número é igual a 2) e $S_{agrupado}$ é definido pela Equação 17 a seguir:

Equação 17 $S_{agrupado}$ para o cálculo de t de Student

$$S_{agrupado} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (17)$$

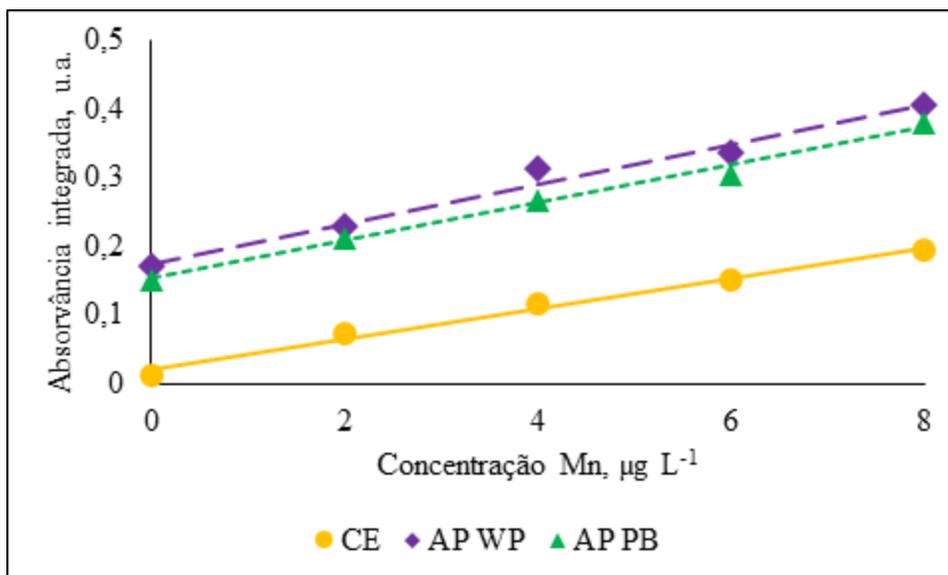
Os valores das concentrações obtidas nas amostras “matrizadas” e “não-matrizadas” estão dispostas nas Tabelas 14 e 15, para Mn e Cr respectivamente, assim como os valores de t_{calc} para cada um dos grupos das amostras.

Figura 11 Comparação entre a curva de calibração externa (CE) e curva de adição de padrão (AP HP) para Mn em hipercalóricos – curvas realizadas com o emprego de modificador químico.



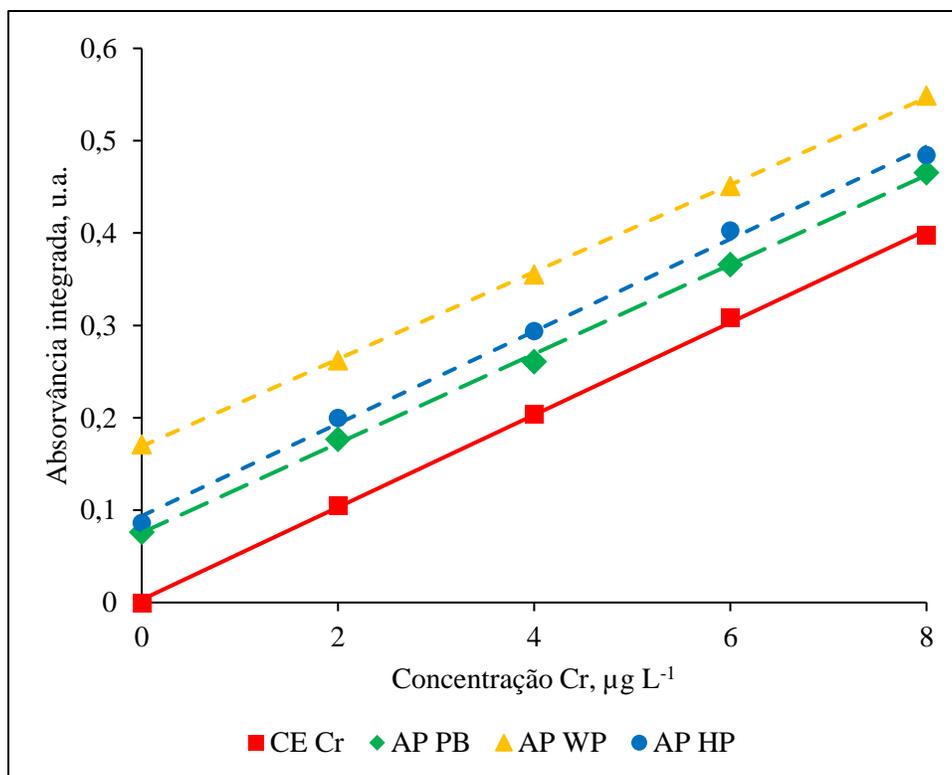
Fonte: Autoria Própria

Figura 12 Comparação entre a curva de calibração externa (CE) e as curvas de adição de padrão para Mn em *whey protein* (AP WP) e *protein bar* (AP PB).



Fonte: Autoria Própria

Figura 13 Comparação entre as curvas de calibração em meio aquoso (CE) e adição de padrão para Cr nas frações bioacessíveis de suplementos digeridas



Fonte: Autoria Própria

Tabela 14 Comparação das concentrações médias de Mn (n = 2) obtidas nas frações bioacessíveis de suplementos empregando calibração externa (CE) e adição de padrão (AP)

Curva Analítica	Concentração Mn / $\mu\text{g L}^{-1}$		
	HP	WP	PB
CE	(1,17 \pm 0,66)	(6,75 \pm 0,22)	(5,83 \pm 0,15)
AP	(1,88 \pm 0,28)	(6,99 \pm 0,15)	(5,87 \pm 0,41)
*t _{calc}	4,289	3,818	0,444
t _{tab}	4,303		

* Intervalos de confiança a 95%.

Fonte: Autoria Própria

Tabela 15 Comparação das concentrações médias de Cr (n = 2) obtidas nas frações bioacessíveis de suplementos empregando calibração externa (CE) e adição de padrão (AP)

Curva Analítica	Concentração Cr / $\mu\text{g L}^{-1}$		
	HP	WP	PB
CE	(1,66 \pm 0,28)	(3,36 \pm 0,17)	(1,55 \pm 0,11)
AP	(1,83 \pm 0,25)	(3,59 \pm 0,17)	(1,58 \pm 0,30)
*t _{calc}	1,942	3,950	0,436
t _{tab}	4,303		

Fonte: Autoria Própria

Uma vez que os valores calculados de t foram menores que o t crítico $t_{\text{crítico}(2,0,025)} = 4,303$, admite-se similaridade de resultados a 95% de confiança.

Os resultados das comparações entre as calibrações externa e adição de padrão sugerem ausência de interferência de matriz significativa para a determinação de Cr e Mn nos digeridos das frações bioacessíveis dos suplementos investigados. Desta forma, escolheu-se a calibração externa como método de calibração e, por isso, a mesma foi usada na avaliação dos parâmetros de mérito.

Em relação às curvas, foram produzidas curvas de 2-10 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicatas autênticas, para ambos os analitos e os resultados da análise de regressão linear se encontram na Tabela 16.

Tabela 16 Resultados estatísticos para análise de regressão linear dos modelos de calibração para Mn e Cr.

Mn - Hipercalóricos		
Teste de Shapiro Wilk	$W_{\text{calc}} = 0,946$	$W_{\text{tab}} = 0,881$
Teste de Cochran	$C_{\text{calc}} = 0,352$	$C_{\text{tab}} = 0,684$
Falta de Ajuste	$F_{\text{faj-calc}} = 1,24$	$F_{\text{faj-tab}} = 3,71$
Regressão	$F_{\text{reg-calc}} = 2336$	$F_{\text{reg-tab}} = 0,004$
R^2 - Ajustado	0,9966	
Equação da Reta	$y = (0,073 \pm 0,001).x + (0,011 \pm 0,007)$	
Mn – Whey Protein e Protein Bar		
Teste de Shapiro Wilk	$W_{\text{calc}} = 0,941$	$W_{\text{tab}} = 0,881$
Teste de Cochran	$C_{\text{calc}} = 0,267$	$C_{\text{tab}} = 0,684$
Falta de Ajuste	$F_{\text{faj-calc}} = 1,57$	$F_{\text{faj-tab}} = 3,71$
Regressão	$F_{\text{reg-calc}} = 1230$	$F_{\text{reg-tab}} = 0,004$
R^2 - Ajustado	0,9939	
Equação da Reta	$y = (0,0207 \pm 0,004).x + (0,002 \pm 0,002)$	
Cr – Hipercalóricos, Whey Protein e Protein Bar		
Teste de Shapiro Wilk	$W_{\text{calc}} = 0,937$	$W_{\text{tab}} = 0,881$
Teste de Cochran	$C_{\text{calc}} = 0,458$	$C_{\text{tab}} = 0,684$
Falta de Ajuste	$F_{\text{faj-calc}} = 3,06$	$F_{\text{faj-tab}} = 3,71$
Regressão	$F_{\text{reg-calc}} = 5752$	$F_{\text{reg-tab}} = 0,004$
R^2 - Ajustado	0,9987	
Equação da Reta	$y = (0,0474 \pm 0,0004).x + (0,001 \pm 0,002)$	

Fonte: Autoria Própria

Verificou-se com o teste de Shapiro-Wilk que os modelos não apresentam evidências, a 95% de confiança, de que haja falta de normalidade na distribuição de resíduos, uma vez que o $W_{\text{calculado}}$ foi maior que o W_{tabelado} . Por meio do teste de Cochran, foi possível verificar a homocedasticidade dos modelos, ou seja, a homogeneidade das variâncias dos resíduos. O resultado do teste indica que a 95% de confiança não há diferenças significativas nas

variâncias uma vez que os valores de $C_{\text{calculado}}$ são menores que os valores de C_{tabelado} e, assim, pode-se empregar o método dos mínimos quadrados a fim de se obter uma regressão linear convencional.

A análise de regressão linear foi então calculada e assume-se que não há falta de ajuste nos modelos, uma vez que o resultado dos valores de $F_{\text{faj-calculado}}$ terem sido menores que os valores de $F_{\text{faj-tabelado}}$. Analogamente, a significância da regressão foi avaliada e devido os valores de $F_{\text{reg-calculado}}$ serem pelos menos 10 vezes maiores que os valores de $F_{\text{reg-tabelado}}$, há evidências estatísticas suficientes para considerar a regressão significativa para as curvas e elas serem apropriadas para fins de previsão (NETO *et al.*, 2001).

5.6 FIGURAS DE MÉRITO

As figuras de mérito avaliadas e estão descritas a seguir.

5.6.1 Exatidão

A exatidão, investigada através do ensaio de adição e recuperação de analito, foi estudada em dois níveis e em duplicata. O teor dos analitos, na solução de leitura, foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ no nível inferior e de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ no nível superior, para ambos analitos, de forma que as adições de analito permanecessem na faixa de trabalho; os resultados se encontram na Tabela 17.

Tabela 17 Resultados médios de recuperação de Cr e Mn em amostras de suplementos alimentares ($n = 2$) após digestão.

Níveis ¹	Amostra	Cr (%)	Mn (%)
$1 \mu\text{g L}^{-1}$	HP	(110 ± 3)	(109 ± 6)
	WP	(101 ± 8)	(107 ± 10)
	PB	(102 ± 1)	(93 ± 1)
$3 \mu\text{g L}^{-1}$	HP	(116 ± 2)	(95 ± 6)
	WP	(107 ± 7)	(85 ± 1)
	PB	(105 ± 5)	(105 ± 6)

Fonte: Autoria Própria

Os valores de recuperação obtidos ficaram entre 101 e 116% para as determinações de Cr e entre 85 até 109% para as determinações de Mn, apresentando um valor médio de 103% considerando ambos os analitos. O intervalo aceitável para analitos com concentração na faixa de 0,5 µg/g é de 60 – 115% (BRITO *et al.*, 2003). Assim, como os valores obtidos nos ensaios de recuperação se enquadram neste intervalo, considera-se que o método desenvolvido apresentou uma boa exatidão, com um erro médio de 5,5%.

5.6.2 Precisão

Em relação à precisão, este parâmetro foi calculado avaliando a repetibilidade de 10 medidas para amostras “mix” das frações bioacessíveis de cada tipo de suplemento digeridas. As médias obtidas para essas amostras apresentaram desvios padrões relativos menores que 15% para ambos os analitos, sendo o valor médio obtido de 13% para as determinações de Cr e de 14% para as determinações de Mn. Mais uma vez, considerando-se a ordem de grandeza das concentrações determinadas, pode-se concluir que o método apresenta uma precisão satisfatória, inclusive porque as injeções foram todas manuais.

5.6.3 Limites de detecção, de quantificação e massa característica

Os limites de detecção (LD), quantificação (LQ) instrumentais e como também a massa característica (m_0) e do método calculados estão expressos na Tabela 18 a seguir:

Tabela 18 Limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e valores de massa característica (m_0) para determinação dos teores bioacessíveis de Cr e Mn em suplementos alimentares por GF AAS

Amostras/Analitos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) instrumental	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) método	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) instrumental	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) método	m_0 (pg)
HP / Mn	0,09	0,03	0,3	0,1	1,8
WP / Mn	0,39	0,12	1,2	0,3	4,2
PB / Mn					
HP / Cr					
WP / Cr	0,24	0,07	0,7	0,2	1,9
PB / Cr					

Fonte: Autoria Própria

No trabalho de Paes (PAES, 2007) mencionado anteriormente, em que a determinação de Mn também foi realizada (ainda que em amostras de mel), o $LQ_{\text{método}}$ e a m_0 foram de $0,120 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,3 \text{ pg}$, respectivamente. Comparando-se os resultados obtidos aqui para hipercalóricos com os do trabalho de Paes, observa-se que os valores de recuperações e $LQ_{\text{método}}$ são concordantes, enquanto a m_0 se mostrou melhor, isto é, menor, neste trabalho.

O estudo de Lisboa (LISBOA, 2016), que precedeu a esta pesquisa, tratou sobre os teores totais de Cr nas mesmas amostras de suplementos utilizadas neste trabalho. Os $LQ_{\text{método}}$ foram $0,150$, $0,218$ e $0,145 \mu\text{g L}^{-1}$ para HP, WP e PB, respectivamente; a m_0 foi de $2,8 \text{ pg}$ para HP e WP e $2,7 \text{ pg}$ para PB. Uma vez que esses valores são muito similares aos do método estabelecido para Cr neste trabalho, verifica-se que mesmo depois do ensaio de bioacessibilidade a que as amostras são submetidas, o método ainda apresenta boa sensibilidade.

Os dados na literatura são escassos em trabalhos envolvendo o estudo da bioacessibilidade de Cr e Mn em suplementos alimentares ou amostras similares, utilizando a técnica de GF AAS. Comparou-se, então, os LQ, LD instrumentais e massa característica com outras técnicas, como ICP-MS e ICP-AES para se ter uma ideia das características dos

métodos desenvolvidos frente a outros já disponíveis para esses mesmos analitos em amostras de alimentos.

Segundo Soares e colaboradores (SOARES *et al.*, 2010), os LQs instrumentais encontrados respectivamente para Cr e Mn em amostras de leite pasteurizado, utilizando GF AAS, foram de 0,14 e 1,96 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto Ioannidou e colaboradores (IOANNIDOU *et al.*, 2005) reportam 17 e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de mel através de ICP-AES. Já Tokalıoğlu e colaboradores relata 1,6 e 370 $\mu\text{g L}^{-1}$ para frações bioacessíveis de suplementos alimentares ricos em minerais utilizando ICP-MS (TOKALIOĞLU *et al.*, 2014). Neste contexto, em alguns casos os LQs deste trabalho concordam com outros resultados, enquanto em outros, eles se mostraram melhores.

Quanto à massa característica, De Andrade e colaboradores relata 4 pg para Cr em amostras de mel (DE ANDRADE *et al.*, 2014), Cabrera-Vique e colaboradores 10 pg para Cr e 2,5 pg para Mn em amostras de alimentos *fast food* e de lojas de conveniências (CABRERA-VIQUE & BOUZAS, 2009), Pereira Lara e colaboradores 1,9 pg para Mn em leite materno (PEREIRA LARA *et al.*, 2009) e Ieggli e colaboradores reporta 4 pg para Mn em chocolates (IEGGLI *et al.*, 2011). Há de ressaltar ainda que para o Cr e para o Mn, as massas características esperadas em atomizadores longitudinalmente aquecidos são de aproximadamente 3 e 2 pg, respectivamente (WELZ & SPERLING, 1999). Desta forma, as massas características encontradas para ambos os elementos relatadas nesse trabalho foram concordantes com a literatura.

Por fim, vale ressaltar que das 12 amostras analisadas, e que continham os analitos de interesse, apenas 4 das amostras não apresentaram teores detectáveis dos analitos nas frações bioacessíveis. Este fato será explorado a seguir, mas também evidencia a potencialidade de uso do método desenvolvido para o estudo dos micronutrientes estudados.

6. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS

A aplicação dos métodos de bioacessibilidade estabelecidos necessita dos valores dos teores totais dos analitos de interesse. Os teores totais de Cr e Mn foram estudados por Lisboa para as mesmas amostras consideradas nesse trabalho e tais valores estão expressos na Tabela 19, como também as porcentagens dos IDR desses minerais, caso um indivíduo consuma a porção recomendada pela embalagem do produto.

Tabela 2 Teores totais de Cr e Mn e a correlação com os respectivos valores de IDR

Amostra	Teor Cr (µg/g)	IDR Cr¹ (%)	Teor Mn (µg/g)	IDR Mn² (%)
HP-1	0,304	60,8	11,1	33,7
HP-2	0,442	126,2	8,60	37,4
HP-3	0,266	161,0	4,95	45,6
HP-4	0,309	229,2	2,0	22,6
WP-6	0,894	102,2	4,9	8,48
WP-7	0,778	66,7	6,3	8,24
WP-8	0,443	41,0	19,1	26,9
PB-1	0,634	59,8	12,7	18,2
PB-2	0,535	45,8	14,9	19,4
PB-3	0,408	35,0	14,8	19,2
PB-4	0,403	46,0	19,3	33,6
PB-5	0,647	83,2	26,0	50,8

¹IDR para Cr de 35 µg/dia. ²IDR para Mn de 2,3 mg/dia

Fonte: (LISBOA, 2016)

Do grupo de amostras selecionado por Lisboa, foram selecionadas para a aplicação do estudo de bioacessibilidade aquelas que promoveriam a ingestão diária mais altas, em vista de que apenas uma dose (para algumas das amostras) já seria suficiente para suprir a IDR. O cálculo dos teores bioacessíveis foi possível de ser realizado a partir dos teores totais dos analitos. A porcentagem bioacessível é calculada através da Equação 18 e dos valores encontrados por Lisboa. A Tabela 20 apresenta os valores médios (calculados em duplicata)

dos teores (TB) e porcentagens bioacessíveis (% Bio) de Cr e Mn para as amostras selecionadas para o estudo de bioacessibilidade:

Equação 18 Porcentagem Bioacessível

$$\text{Porcentagem bioacessível (\%)} = \frac{\text{Teor bioacessível } (\mu\text{g/g})}{\text{Teor total } (\mu\text{g/g})} \times 100\% \quad (18)$$

Tabela 20 Valores dos teores e porcentagens bioacessíveis médios (n = 2) para Cr e Mn

Amostra	TB Cr ($\mu\text{g/g}$)	IDR Cr (%)	% Bio Cr	TB Mn ($\mu\text{g/g}$)	% Bio Mn	IDR Mn (%)
HP-1	0,150 \pm 0,020	43	49,4	0,657 \pm 0,014	5,9	3
HP-2	<LQ	-	%BNS	0,837 \pm 0,042	9,7	4
HP-3	0,114 \pm 0,017	63	39,0	1,69 \pm 0,17	34,2	16
HP-4	<LQ	-	%BNS	<LQ	%BNS	-
WP-6	0,109 \pm 0,012	12	12,2	4,85 \pm 0,41	99,5	8
WP-7	<LQ	-	%BNS	1,21 \pm 0,09	19,2	2
WP-8	<LQ	-	%BNS	1,29 \pm 0,17	6,7	2
PB-1	0,102 \pm 0,008	10	16,1	2,02 \pm 0,34	15,9	3
PB-2	2,56 \pm 0,13	-	>100%	5,17 \pm 0,80	34,8	7
PB-3	1,28 \pm 0,24	-	>100%	3,88 \pm 0,32	26,3	5
PB-4	0,825 \pm 0,244	-	>100%	7,70 \pm 0,42	39,8	13
PB-5	4,28 \pm 0,10	-	>100%	5,32 \pm 0,71	20,5	10

*%BNS – Porcentagem bioacessível não significativa. EDPR menor que 15%. TB – teor bioacessível

Fonte: Autoria Própria

As amostras analisadas que não tiveram os seus teores bioacessíveis relatados demonstraram um sinal na mesma ordem de grandeza do que o do branco do método, indicando assim, que esses teores estão fora do LD do método. Foram observadas porcentagens maiores que 100% em quatro das amostras de PB para cromo, e isso se deve possivelmente à distribuição desse elemento na amostra (homogeneidade) e/ou uma

contaminação do processo de preparo de amostras. O valor de porcentagem de IDR para ambos os elementos foram calculados utilizando a porção recomendada pelo fabricante dos produtos. Verificou-se a quantidade bioacessível dos elementos apresentou em grande maioria um valor baixo (e por assim dizer, seguro para o consumidor). Porém, duas delas apresentaram valores em torno de 50% para cromo. Visto que os suplementos não são a única fonte de cromo em uma dieta balanceada, deve-se ter cautela ao ingerir esse tipo de produto.

Os desvios padrões relativos em todas as amostras com porcentagens bioacessíveis significativas foram menores que 18%. A precisão intermediária foi avaliada em uma das amostras, WP-6, em um intervalo de tempo de seis meses; a variação do teor de bioacessibilidade de ambos os analitos foi menor que 14%.

No conjunto de amostras de hipercalóricos, Mn foi determinado na presença e ausência de modificador, para verificar se haveria alguma diferença entre as concentrações e se seria necessário ou não o uso de modificador.

A determinação de Mn em hipercalóricos foi então realizada utilizando-se os parâmetros otimizados para *whey protein* e *protein bars*, como mostra a Tabela 12. A Tabela 21 mostra que os valores obtidos para Mn com ou sem modificador são similares, indicando assim, que o uso de modificador para a determinação desse elemento na fração bioacessível poderia ser descartado.

Tabela 21 Comparação dos teores e porcentagens bioacessíveis de Mn em hipercalóricos, com e sem o emprego de modificador químico

Amostra	Teor Bioacessível Mn (µg/g) com modificador	% Bioacessível Mn	Teor Bioacessível Mn (µg/g) sem modificador	% Bioacessível Mn
HP-1	0,657 ± 0,014	5,9	0,667 ± 0,053	6,0
HP-2	0,837 ± 0,042	9,7	0,894 ± 0,147	10,4
HP-3	1,69 ± 0,170	34,2	1,91 ± 0,123	38,6

Fonte: Autoria Própria

Foram comparados os resultados obtidos nesse trabalho com os trabalhos dispostos na literatura. Tanto os valores de bioacessibilidade quanto as enzimas e tempos de digestão utilizados no ensaio de bioacessibilidade utilizado nesse trabalho estão de acordo com os reportados na literatura, os quais são mostrados pela Tabela 22 a seguir:

Tabela 22 Revisão bibliográfica dos valores bioacessíveis para Cr e Mn em amostras de alimento e parâmetros de ensaio de bioacessibilidade

Amostras	Analitos	Enzimas/Sais	Tempos de digestão	Teor Bioacessível	Técnica Analítica	Referência
Legumes	Mn	Pepsina	1h	104-130%	ICP OES	(SANTOS <i>et al.</i> , 2018)
		Pancreatina Sal de bile	4h			
Chocolate em pó	Cr	Pepsina	2h	5-19%	GF AAS	(PEIXOTO <i>et al.</i> , 2016)
	Mn	Pancreatina Sal de bile	2h	19-59%	ICP OES	
Suplementos nutricionais	Cr	Pepsina	1h	6-65%	ICP-MS	(TOKALI OĞLU <i>et al.</i> , 2014)
	Mn	Pancreatina Sal de bile (entre outros)	1h	83-94%	ICP OES	
Queijo	Mn	Pepsina	4h	26-30%	ICP-MS	(KHOUZAM <i>et al.</i> , 2011)
		Pancreatina Sal de bile Amilase	4h			
Fast foods	Cr	Pepsina	2h	0,4-1,1%	GF AAS	(CABRERA-VIQUE & BOUZAS, 2009)
	Mn	Pancreatina Sal de bile	2h	8-16%		
Alimentos infantis	Mn	Saliva	5min	19-91%	ICP-MS	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2013)
		Pepsina Pancreatina Sal de bile	2h 2h			
Mel	Mn	Pepsina	2h	85-100%	F AAS	(POHL <i>et al.</i> , 2012)
		Pancreatina Sal de bile	2h			
Nozes e sementes	Mn	Pepsina	1h	10-13%	ICP-AES	(KAFAOGLU <i>et al.</i> , 2016)
		Pancreatina Sal de bile (entre outros)	4h			
Vegetais	Cr	Pepsina	2h	24-62%	ICP-MS	(HU <i>et al.</i> , 2013)
		Pancreatina Sal de bile Amilase	4h			
Moluscos	Cr	Saliva	5min	24-85%	ICP-MS	(HE & WANG, 2013)
	Mn	Pepsina Pancreatina Sal de bile	2h 2h	46-91%		

Fonte: Autoria Própria

A Tabela 23 relaciona a composição informada pelos rótulos dos produtos com as porcentagens de bioacessibilidade encontradas nesse trabalho.

Tabela 23 Composição de compostos orgânicos majoritários das amostras de suplementos segundo informado nas embalagens e comparação dos teores bioacessíveis de Cr e Mn

Amostra	% Carboidratos	% Proteínas	% Gorduras totais	% Fibras	% Bio Cr	% Bio Mn
HP-1	70,0	20,0	1,0	0,0	49,4	5,9
HP-2	81,4	10,0	5,7	0,0	%BNS	9,7
HP-3	82,1	9,4	1,2	0,0	39,0	34,2
HP-4	81,3	10,0	5,0	1,9	%BNS	%BNS
WP-6	12,5	72,5	8,5	1,4	12,2	99,5
WP-7	5,3	80,0	6,7	0,0	%BNS	19,2
WP-8	4,4	69,4	8,6	0,0	%BNS	6,7
PB-1	0,0	22,7	10,0	3,6	16,1	15,9
PB-2	40,0	33,3	17,0	0,0	>100%	34,8
PB-3	33,3	36,7	10,0	0,0	>100%	26,3
PB-4	35,0	40,0	9,3	0,0	>100%	39,8
PB-5	33,3	31,1	12,0	6,7	>100%	20,5

*%BNS – Porcentagem bioacessível não significativa.

Fonte: Autoria Própria

Peixoto e colaboradores investigaram os efeitos de diferentes parâmetros que influenciariam na bioacessibilidade de alguns minerais, incluindo Cr e Mn, para diferentes tipos de amostras de chocolate em pó. Estão incluídos nesses parâmetros: a variação da concentração de bile, a presença de lipase no ensaio *in vitro* e adição de componentes dietéticos, como pectina (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Os resultados indicaram que ao aumentar drasticamente a quantidade da concentração de bile no ensaio *in vitro*, houve a diminuição significativa de porcentagem bioacessível de Mn, mas não gerou uma diferença expressiva na bioacessibilidade de Cr. A alta concentração de bile influencia na melhor digestão de lipídeos da matriz ou interage melhor com íons metálicos, e assim, levaria à formação de complexos insolúveis e à diminuição da

porcentagem bioacessível (PEIXOTO *et al.*, 2016). Outro fato que influenciaria para explicar a queda de bioacessibilidade de Mn é o processo natural da excreção desse elemento pela bile no nosso organismo, o qual é mimetizado no ensaio *in vitro* (HARDY, 2009).

Foi observado também pelo estudo de Peixoto que houveram maiores frações bioacessíveis na presença de componentes dietéticos, como a pectina, uma fibra solúvel. A explicação desse aumento da solubilidade seria a formação de complexos solúveis entre os elementos e a pectina (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Neste sentido, todas as amostras que foram submetidas à aplicação do método interagiram com a mesma quantidade de bile, e, por conseguinte, aquelas que possuíam maior quantidade de gorduras totais, segundo a análise de Peixoto, apresentariam uma maior bioacessibilidade de Mn. De maneira similar, suplementos com maior quantidade de fibras, indicariam um maior teor bioacessível dos minerais.

Comparando as amostras de *whey protein* entre si, WP-6 em relação a WP-7 e WP-8 poderia ter sua porcentagem bioacessível de Mn aumentada devido à presença de fibra em sua composição. Em contraste, para as amostras de hipercalóricos, HP-9 que apresenta a maior quantidade de fibra, possui o menor teor bioacessível de Mn.

Em relação à bioacessibilidade de Mn em hipercalóricos, observa-se que a conclusão de Peixoto não se aplica no quesito de que menores quantidades de gordura diminuiriam a bioacessibilidade do mineral. Inclusive, esse comportamento se mostra totalmente paradoxal em relação à bioacessibilidade de Cr, uma vez que as amostras que tiveram os menores teores de gorduras, apresentaram a maior porcentagem bioacessível.

Não foi possível traçar um comportamento que correlacionasse a composição “esperada” das amostras de suplemento com os teores bioacessíveis de Cr e Mn encontrados. Mesmo encontrando dados na literatura que ajudariam na elucidação dessa relação, seria mais prudente determinar experimentalmente a composição centesimal dos suplementos e, ainda, utilizar um conjunto amostral maior juntamente com uma ferramenta matemática, como PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) que permitisse encontrar a relação entre todas essas variáveis, caso exista.

7. CONCLUSÕES

A determinação de manganês e cromo nas frações bioacessíveis de suplementos alimentares foi possível de ser realizada com boas precisão, exatidão e detectabilidade empregando o método otimizado e, portanto, proposto neste trabalho.

Um tratamento das amostras (fração bioacessível) foi necessário, previamente às análises no GF AAS. E para esta etapa, o emprego do ácido nítrico concentrado e da chapa de aquecimento não foram suficientes para uma digestão completa da matriz. Empregando-se, então, a digestão assistida por radiação micro-ondas, que se mostraram adequadas para todas as amostras testadas, pois não foram observadas interferências de matriz significativas durante as análises.

Em relação às condições instrumentais, o emprego do modificador químico $Mg(NO_3)_2$ foi necessário somente para a determinação de Mn em HP, possivelmente como resposta ao fato de que já existe uma quantidade suficiente desse modificador para a estabilização do analito durante a pirólise.

Uma vez que foi verificada a falta de interferências de matriz para ambas as determinações estudadas, foi definido como o método de calibração a calibração externa em meio de ácido diluído e sob as condições instrumentais otimizadas. Os modelos de calibração propostos foram analisados estatisticamente e se provaram adequados para fins de previsão. Os parâmetros de mérito foram avaliados para a calibração externa e, no geral, estão concordantes com dados encontrados na literatura e fornecidos pelo fabricante do equipamento de absorção atômica.

Os métodos estabelecidos puderam, então, ser aplicados com o objetivo de quantificar e avaliar os teores bioacessíveis de Cr e Mn em amostras comerciais de suplementos.

Considerando o conjunto estudado, composto por 12 amostras, observou-se que não existe um padrão/ perfil que possa ser traçado com base nos resultados obtidos. 33% das amostras não apresentaram teores bioacessíveis significativos de Cr, enquanto 8% não o apresentaram para Mn. Por outro lado, os teores mais elevados foram encontrados nas amostras de hipercalóricos e *whey protein*, correspondendo a 49 e 99%, respectivamente, dos teores totais.

Esse resultado mostra que o entendimento do perfil bioacessível dos minerais é um assunto complexo e, por isso, merece outros e novos estudos. Por outro lado, no que diz respeito às amostras estudadas que apresentaram teores elevados (e possivelmente inapropriados) desses minerais, os teores bioacessíveis encontrados (baixos, em geral) permitem sugerir que os suplementos são seguros em relação aos seus teores de Cr e Mn, ainda que elevados do ponto de vista dos teores totais.

Propostas Futuras

O estudo da bioacessibilidade de elementos minerais em alimentos é um campo muito vasto e ainda pouco explorado e conhecido. Diferentes recursos instrumentais precisam ser avaliados com foco nas peculiaridades das amostras e, principalmente, possibilitando a determinação dos nutrientes traços, cujas concentrações nas soluções de leitura são ainda menores. Com base no trabalho realizado, alguns outros pontos, que merecem ser desenvolvidos, são listados a seguir.

- Avaliar a análise direta do quimo dos suplementos, estudando e/ou otimizando os seguintes parâmetros experimentais: diluição das amostras e etapas do programa de aquecimento do forno de grafite.

- Implementar outros métodos de mineralização das amostras que sejam mais acessíveis economicamente do que a digestão assistida por radiação micro-ondas. Neste sentido pode-se sugerir o estudo de diferentes combinações de reagentes e aquecimento em bloco digestor. Isso poderia diminuir o custo das análises e possibilitar que um número maior de laboratórios pudesse trabalhar com amostras de alimentos e estudos de bioacessibilidade.

- Aplicar os métodos estabelecidos nesse trabalho em outras amostras de suplemento, para que assim se consiga traçar um perfil para a composição mineral e, principalmente, a bioacessibilidade de micronutrientes em suplementos, ainda pouco estudada.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. A. et al. *Exercise effects on chromium excretion of trained and untrained men consuming a constant diet.* **Journal of Applied Physiology**, v. 64, n. 1, p. 249-252, 1988.

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

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

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada, RDC No-269 - Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.** Brasília, DF: Diário Oficial da União. 269 2005.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada, RDC No-18 Alimentos para atletas.** Brasília, DF: Diário Oficial da União. 18 2010.

BRITO, N. M. et al. **Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão.** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. Curitiba. 13: 129-146 p. 2003.

BURNLEY, E. C. D. et al. *Impact of Protein Supplements on Muscle Recovery After Exercise-induced Muscle Soreness.* **Journal of Exercise Science & Fitness**, v. 8, n. 2, p. 89-96, 2010.

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.

CAMPOS, N. d. S. et al. *Multivariate approach to assess in vitro Fe bioaccessibility in chicken meat.* **Food Science and Technology**, v. 38, p. 157-163, 2018.

CASTRO, G. O. **Suplemento alimentar: um tema para o ensino de química.** 2013. Monografia (Licenciatura em Química) Instituto de Química, Universidade de Brasília

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

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. *In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simplestomached animals*. **Animal Food Science and Technology**, v. 123, p. 421-444, 2005.

CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. d. *Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas*. **Revista Analytica**, v. 2, n. 5, p. 52-59, 2003.

DA SILVA, E. N. et al. *Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods*. **Talanta**, v. 117, p. 184-188, 2013.

DE ANDRADE, C. K. et al. *Determination of Cu, Cd, Pb and Cr in yogurt by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry: A case study for Brazilian yogurt*. **Food Chemistry**, v. 240, n. Supplement C, p. 268-274, 2018.

DE ANDRADE, C. K. et al. *Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166-173, 2014.

DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Handbook of mineral elements in food**. Espanha: 2015.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. *Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B(6), B(12), D, and E*. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 317, 2012.

EVANS, G. W. *The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans*. **International Journal of Biosocial and Medical Research**, v. 11, p. 163-180, 1989.

FERRAZ, B. d. S. et al. *Consumo de suplementos alimentares por praticantes de atividade física em academias de ginástica: um artigo de revisão*. **Journal of Amazon Health Science**, v. 1, n. 2, p. 19, 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRESTEDT, J. L. et al. *A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study*. **Nutrition & Metabolism**, v. 5, p. 8, 2008.

GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. *Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico*. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 11, n. 5, p. 262-266, 2005.

GOSTON, J. L.; TOULSON, M. I. D. C. *Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors*. **Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 604-611, 2010.

HARDY, G. *Manganese in Parenteral Nutrition: Who, When, and Why Should We Supplement?* **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, Supplement, p. S29-S35, 2009.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. Estados Unidos da América: DePauw University, 2000. 816.

HE, M.; WANG, W.-X. *Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 627-636, 2013.

HU, J. et al. *Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an in vitro gastrointestinal model*. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 455-461, 2013.

HUR, S. J. et al. *In vitro human digestion models for food applications*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

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

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**. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, I. E. C. E. Rio de Janeiro, RJ 2014.

IOANNIDOU, M. D. et al. *Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. **Talanta**, v. 65, n. 1, p. 92-97, 2005.

KAFAOGLU, B. et al. *Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 58-65, 2016.

KHOUZAM, R. B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. *Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables*. **Talanta**, v. 86, p. 425-428, 2011.

KOIRTYOHANN, S. R.; KAISER, M. L. *Furnace atomic absorption - a method approaching maturity*. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 1515A-1524A, 1982.

KOTAŚ, J.; STASICKA, Z. *Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation*. **Environmental Pollution**, v. 107, n. 3, p. 263-283, 2000.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Método de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo: EditSBQ, 2016. 572.

LISBOA, T. P. **Determinação de Micronutrientes Minerais em Amostras de Suplemento Alimentar por Espectrometria de Absorção Atômica**. 2016. 88 (Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

LUTEN, J. et al. *Interlaboratory Trial on the Determination of the In Vitro Iron Dialysability from Food*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 4, p. 415-424, 1996.

MACEDO, C. d. S. G. et al. *Benefícios do exercício físico para a qualidade de vida*. **Revista Brasileira de Atividade Física**, v. 8, n. 2, p. 9, 2003.

MARTINS, I. *Metais: gerenciamento da toxicidade*. In: AZEVEDO, F. A. D. e CHASIN, A. A. D. M. (Ed.). **Metais: gerenciamento da toxicidade**, 2003. cap. 3, p.67-97.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. *Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 48-67, 2008.

NETO, B. d. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP: Unicamp, 2001.

PAES, L. C. **Determinação de Cobre, Manganês E Cádmio em mel por Espectrometria De Absorção Atômica com Forno De Grafite.** 2007. 71 Dissertação (Mestrado). DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

PEIXOTO, R. R. A. et al. *Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder.* **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 41-47, 2016.

PEREIRA LARA, P. C. et al. *Direct Determination of Mn in Breast Milk by GF AAS After Multivariate Optimization.* **Analytical Letters**, v. 42, n. 7, p. 923-934, 2009.

POHL, P. et al. *Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys.* **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 392-396, 2012.

PRUSZKOWSKA, E.; CARNRICK, G. R.; SLAVIN, W. *Direct determination of cadmium in coastal seawater by atomic absorption spectrometry with the stabilized temperature platform furnace and Zeeman background correction.* **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 182-186, 1983.

REILY, C. **Metal contamination of food: its significance for food quality and human health.** Reino Unido: 2002.

ROCHA, L. P. d.; PEREIRA, M. V. L. *Consumo de suplementos nutricionais por praticantes de exercícios físicos em academias.* **Revista de Nutrição**, v. 11, n. 1, p. 7, 1998.

SANTOS, W. P. C. et al. *Bioaccessibility assessment of toxic and essential elements in produced pulses, Bahia, Brazil.* **Food Chemistry**, v. 240, p. 112-122, 2018.

SCHMITZ, D. S. **Estética facial e corporal : uma revisão bibliográfica.** 2010. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade do Vale do Itajaí

SILVA, C. S. d. Cromo. In: AZEVEDO, F. A. D. e CHASIN, A. A. D. M. (Ed.). **Metais: gerenciamento da toxicidade:** Editora Atheneu, 2003. cap. 2, p.35-66.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica.** 8^a. Thomson.

SKOOG, D. A. W., D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SLAVIN, W. **Graphite Furnace AAS: A Source Book**. Perkin-Elmer Corporation, 1984.

_____. *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 Paraiba region (Brazil)*. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 45-49, 2010.

STURGEON, R. E.; CHAKRABARTI, C. L.; LANGFORD, C. H. *Studies on the mechanism of atom formation in graphite furnace atomic absorption spectrometry*. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 1792-1807, 1976.

THERMOELEMENTAL. **Differences between GF AAS, F AAS and ICP**. Estados Unidos da América 2001.

THOMPSON, M. et al. *Harmonised Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

TIPTON, K. D. et al. *Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise*. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 2, p. E197-E206, 2001.

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.

TRACQUI, A. et al. *Determination of manganese in human brain samples*. **Forensic Science International**, v. 76, n. 3, p. 199-203, 1995.

UNCETA, N. et al. *A novel strategy for Cr(III) and Cr(VI) analysis in dietary supplements by speciated isotope dilution mass spectrometry*. **Talanta**, v. 154, p. 255-262, 2016.

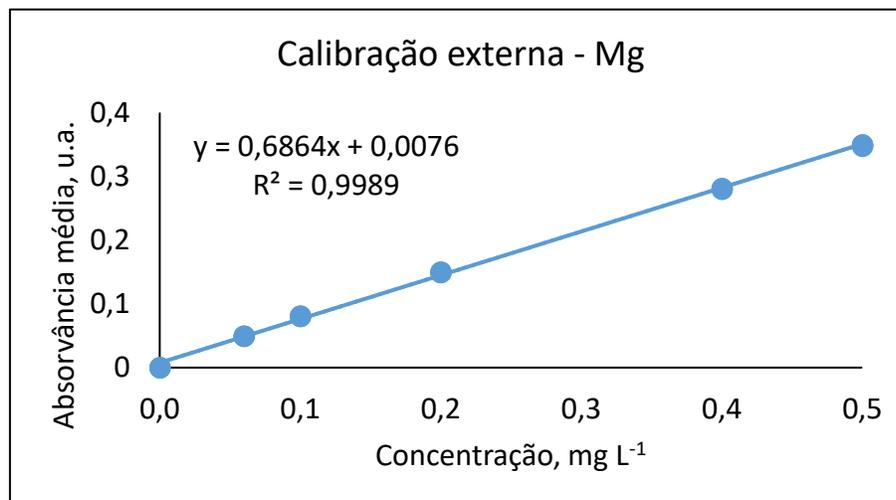
VINCENT, J. B. *The biochemistry of Chromium*. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 715-718, 2000.

VOLYNSKII, A. B. *Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*. **Atomic Absorption Newsletter**, v. 58, n. 10, p. 17, 1975.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. Third, Completely Revised Edition. Wiley-VHC, 1999. 956.

ANEXO I. Determinação De Magnésio Nos Teores Bioacessíveis De Suplementos Alimentares Utilizando F AAS

Figura 18 Curva de calibração externa de Mg para determinação em frações bioacessíveis de hipercalóricos



Fonte: Autoria Própria

Concentração média de Mg nas soluções das frações bioacessíveis digeridas de “mix” de amostras para cada suplemento:

Tabela 3 Massa média de Mg nas frações bioacessíveis digeridas de suplementos

Amostra	Absorvância média	Concentração média / mg L ⁻¹	Massa média Mg* / µg
Hipercalórico	0,175	0,243 ± 0,011	7,3
Br HP	0,037	-	-
Whey Protein	0,325	0,463 ± 0,027	13,9
Br WP	0,031	-	-
Protein Bar	0,240	0,339 ± 0,004	10,2
Br PB	0,047	-	-

*Solução de leitura com o volume médio de 30 mL Fonte: Autoria Própria.

Com a determinação de Mg nas soluções digeridas de fração bioacessível, encontrou-se que a quantidade desse elemento é próximo de 10 µg, a mesma quantidade que é reportado na literatura para adição de modificador Mg(NO₃)₂.

Sendo assim, pode-se inferir que os suplementos já tenham uma quantidade de “modificador natural”, que justificaria a ausência do uso do modificador químico estudado nesse trabalho para a determinação de Cr e Mn nas frações bioacessíveis.

ANEXO II. Produção Bibliográfica

1) Disciplinas Cursadas

- ✓ 212005 - Métodos de Separação
- ✓ 212028 - Planejamento e otimização de experimentos
- ✓ 212039 - Química Analítica Avançada

2) Participação em Eventos

- ✓ 14th Rio Symposium on Atomic Spectrometry – Vitória – Espírito Santo.
- ✓ Workshop de Preparo de Amostras – Piracicaba – São Paulo.

3) Trabalhos Apresentados

LISBOA, T.P.; GUIMARÃES, A.P.N.; SILVA, F.F.; SOUSA, R.A.; *Determinação de Cr em amostras de suplementos alimentares por GF AAS após digestão ácida. 14th Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, Vitória, Espírito Santo, 2017.