



GRASIELA DE SOUZA COSTA DA SILVA

FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ALIMENTOS

GRASIELA DE SOUZA COSTA DA SILVA

FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS

Orientador (a): Profa. Dra. Juliana A. L. Pallone

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
GRASIELA DE SOUZA COSTA DA SILVA, APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 28/08/2012, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JULIANA A. L.
PALLONE

Assinatura do orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Si38f Silva, Grasiela de Souza Costa da, 1975-
Ferro e zinco em pães industrializados / Grasiela de
Souza Costa da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Juliana Azevedo Lima Pallone.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ferro. 2. Zinco. 3. Pão. 4. Espectrometria de
absorção atômica. I. Pallone, Juliana Azevedo Lima. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Iron and zinc in industrialized bread

Palavras-chave em inglês:

Iron

Zinc

Bread

Atomic absorption spectrometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliana Azevedo Lima Pallone [Orientador]

Alessandra Borin

Helena Teixeira Godoy

Data da defesa: 28/08/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone – FEA UNICAMP
Presidente

Dra. Alessandra Borin – PUC Campinas
Titular

Dra. Helena Teixeira de Godoy – FEA UNICAMP
Titular

Dr. Marcelo Alexandre Prado – FEA UNICAMP
Suplente

Dra. Gisele Leticia Alves – INSTITUTO ADOLFO LUTZ, IAL, BRASIL
Suplente

Dedicatória

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, meu marido Márcio, companheiro de todas as horas, que sem sua ajuda este trabalho não teria sido possível.

Dedico também a minha filha Bruna que deu um sentido especial a minha vida e me tem dado grandes momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de conhecer e poder conviver com pessoas admiráveis;

A Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos e em especial ao Laboratório de Análises de Alimentos pela oportunidade do desenvolvimento do meu trabalho.

A Prof. Dra. Juliana A. L. Pallone por ter sido mais que uma orientadora, uma grande amiga,

Ao meu chefe e amigo Ronaldo pelo apoio e pela ajuda nas alterações no meu horário de trabalho.

A Prof. Dra. Alessandra Borin pelas conversas e pela ajuda com os cálculos.

Ao prof. Dr. Baraçal pela enorme ajuda na parte estatística deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho da PUC-Campinas Paula, Henrique, Luciana, Dulce, Liamar, Eduardo, Juliana, Giovana e Lígia por estarem ao meu lado me apoiando e torcendo por mim nestes anos de mestrado.

A Oneida, Clovis e Solange pela ajuda na resolução de alguns problemas durante a execução da parte experimental.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos, seu Dirceu pela ajuda com a lavagem das vidrarias e a técnica Mirian.

A Daniela, Paula, Alice, Lucíola, pelas risadas e desabafos durante a realização de nossas análises.

A Cris que foi muito mais que uma estagiária, uma grande amiga!

A Tati pela grande ajuda no inglês.

A turma do fondue: Danda, João, Vera, Sônia, Adriana pelo carinho e amizade.

As minhas companheiras de graduação Emanuela, Simone e Rachel pelo apoio e torcida.

Aos meus amigos e vizinhos Jaqueline, Alessandro, Luciana e Ricardo pelo incentivo e paciência neste tempo de mestrado.

A minha grande amiga e irmã do coração Adriana que sempre participou de todos os momentos da minha vida.

Em especial a minha mãe Eloisa pela educação, carinho, apoio, pelo exemplo de mulher e mãe e também por ficar com a Bruna enquanto eu precisava estar na Unicamp.

A minhas irmãs Fabiana e Janaina e meu cunhado Magno pelo apoio, carinho e ajuda nos momentos difíceis.

A tia Elza e a Cida por ficarem com a Bruna quando eu precisava mudar meus horários.

Ao meu marido Márcio, grande companheiro neste período de mestrado, que me ajudou, apoiou, que torceu por mim, se alegrando com meus acertos e me incentivando nos momentos em que eu queria desistir. Agradeço por você ter estado comigo em todos estes momentos.

A minha filha Bruna sempre carinhosa e apesar de tão pequena soube entender minha ausência.

Enfim a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

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

Albert Einstein

RESUMO GERAL

Com o objetivo de diminuir a anemia ferropriva a fortificação de alimentos com ferro tem se tornado uma prática comum em todo o mundo. De acordo com estimativas do Ministério da Saúde, cerca de 45% das crianças brasileiras de até 5 anos (10 milhões de pessoas) têm anemia. Entretanto, trabalhos científicos apontam que a ingestão excessiva de ferro pode estar associada a danos oxidativos em células e tecidos e tem sido relacionado com a incidência de doenças como Parkinson, acidente vascular cerebral, Alzheimer, esclerose múltipla, catarata, cardiopatias, artrite e diabetes, entre outras. Além disso, outros estudos sugerem que a suplementação com ferro, pode comprometer o aproveitamento do zinco no organismo humano, levando a outros problemas, como nanismo, má cicatrização, cirrose hepática, menstruação irregular, depressão e deficiência no sistema imune dentre outros. As farinhas fortificadas com ferro já estão disponíveis no mercado nacional desde 2004, porém, são poucos os dados sobre o controle dos níveis de ferro, bem como a razão molar entre ferro e zinco (naturalmente presente), em alimentos elaborados com farinhas fortificadas, sendo a razão molar desejada cerca de 4:1 para não prejudicar o aproveitamento do zinco pelo organismo. Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar ferro, zinco e umidade em pães industrializados elaborados com farinhas fortificadas. Para as análises do teor dos minerais foi utilizada a Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) e para umidade, secagem em estufa. Para validação parcial, foram analisados os parâmetros sugeridos pelo INMETRO. Os resultados obtidos para linearidade através do coeficiente de correlação foi de 0,9994 para ferro e 0,9996 para zinco. A precisão apresentou um coeficiente de variação para ferro e zinco menor que 6%. A exatidão apresentou faixa de recuperação entre 91 a 109% para ferro e 87 a 108% para zinco. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,04 e 0,15 mg L⁻¹ para ferro e 0,07 e 0,24 mg L⁻¹ para zinco, respectivamente, demonstrando que o método escolhido é sensível, eficiente e preciso. Os resultados obtidos para repetitividade na determinação de umidade não ultrapassam o coeficiente de variação 2,0%, mostrando que o método é adequado. Os teores de ferro e zinco

nas amostras de pães variaram de 2,2 a 6,0 mg 100 g⁻¹ (4,1 mg 100 g⁻¹ em média) e 0,3 a 1,0 mg 100g⁻¹ (0,7 mg 100 g⁻¹ em média) no pão tradicional; de 1,8 a 4,1 mg 100 g⁻¹ (3,0 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,4 a 2,3 mg 100 g⁻¹ (1,9 mg 100 g⁻¹ em média) no pão integral; de 1,8 a 6,8 mg 100 g⁻¹ (4,3 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,7 a 2,8 mg 100 g⁻¹ (2,3 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 7 grãos; de 3,0 a 3,8 mg 100 g⁻¹ (3,4 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,8 a 3,0 mg 100 g⁻¹ (2,4 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 9 grãos; de 2,0 a 4,2 mg 100 g⁻¹ (3,1 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,4 a 2,5 mg 100 g⁻¹ (2,0 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 12 grãos, respectivamente. Os resultados indicaram, em geral, falta de uniformidade no teor de ferro e zinco entre lotes da mesma marca e entre marcas do mesmo tipo de pão. No pão tradicional esta falta de homogeneidade, provavelmente, ocorra pela dificuldade na adição da pré-mistura (ácido fólico e ferro) na farinha, ingrediente principal na produção de pães, enquanto que nos pães especiais, o comportamento observado pode ser explicado pela variedade e quantidade de grãos adicionados. A razão molar Fe:Zn variou de 5:1 a 12:1 no pão tradicional; 2:1 a 3:1 no integral; 1:1 a 3:1 no 7 grãos; de 1:1 a 2:1 no 9 grãos e no pão 12 grãos não houve variação, sendo a razão molar 2:1. No pão tradicional foi encontrado uma razão molar Fe:Zn maior que 4:1, podendo assim prejudicar o aproveitamento do zinco pelo organismo.

Palavras-chave: anemia, fortificação alimentar, ferro, zinco, FAAS, validação.

ABSTRACT

Iron food's fortification has become a common practice around the world in order to reduce anemia caused by iron deficiency. Ministry of Health estimates that approximately 45% of Brazilian children up to 5 years (10 million people) have anemia. However, scientific studies indicate that excessive intake of iron may be associated with oxidative damage to cells and tissues has been associated with the incidence of diseases like Parkinson's, stroke, Alzheimer's, multiple sclerosis, cataracts, heart disease, arthritis and diabetes, among others. Also, other studies suggest that iron supplementation may compromise the use of zinc in the human body, leading to other problems such as stunting, poor wound healing, liver cirrhosis, irregular menstruation, depression and disability in the immune system among others. The flour fortified with iron are available in the market since 2004, however, there are few data on the control of iron levels, as well as the molar ratio between iron and zinc (naturally present), foods made with fortified flour, being desired molar ratio about 4:1 to not damage the recovery of zinc by the body. This research was developed to assess iron, zinc and humidity in industrial bread made with fortified flour. For minerals analysis were used atomic absorption spectrometry with flame (FAAS) and humidity, drying in an oven. For partial validation, we analyzed the parameters suggested by INMETRO. Results of linearity was obtained by the correlation coefficient of 0,9994 and 0,9996 for iron and zinc, respectively. The accuracy showed a coefficient of variation for iron and zinc less than 6%. The accuracy showed recovery range between 91 to 109% for iron and 87 to 108% for zinc. The limits of detection and quantification were 0,04 and 0,15 mg L⁻¹ for iron and 0,07 to 0,24 mg L⁻¹ for zinc, showing that the chosen method is sensitive, accurate and efficient. The results obtained to determination of repeatability humidity were not greater than the coefficient of variation 2,0%, showing that the method is appropriate. The levels of iron and zinc in samples of breads varied from 2,2 to 6,0 mg 100 g⁻¹ (4,1 mg 100 g⁻¹ on average) and 0,3 to 1,0 mg 100g⁻¹ (0,7 mg 100 g⁻¹ on average) in traditional bread; 1,8 to 4,1 mg 100 g⁻¹ (3,0 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,4 to 2,3 mg 100 g⁻¹ (1,9 mg 100 g⁻¹ on average) in whole wheat bread; 1,8 to 6,8 mg 100 g⁻¹ (4,3 mg 100 g⁻¹ on average)

and 1,7 to 2,8 mg 100 g⁻¹ (2,3 mg 100 g⁻¹ on average) in 7 grain bread ; 3,0 to 3,8 mg 100 g⁻¹ (3,4 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,8 to 3,0 mg 100 g⁻¹ (2,4 mg 100 g⁻¹ on average) in 9 grain bread; 2,0 to 4,2 mg 100 g⁻¹ (3,1 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,4 to 2,5 mg 100 g⁻¹ (2,0 mg 100 g⁻¹ on average) in 12 grain bread, respectively. The results showed, in general, lack of uniformity in the content of iron and zinc between batches of the same brand and between brands of the same type of bread. In traditional bread this lack of homogeneity, probably occurs by the difficulty in adding premix (folic acid and iron) in the flour, the main ingredient in bread production, while in specialty breads, the behavior can be explained, variety and amount of grain added. The molar ratio of Fe: Zn ranging from 5:1 to 12:1 in traditional bread; 2:1 to 3:1 in whole wheat bread; 1:1 to 3:1 in 7 grain bread; 1:1 to 2:1 in 9 grain bread and 12 grain bread did not change, and the molar ratio of 2:1. Has been found in traditional bread molar ratio Fe Zn greater than 4:1 and can thus damage the recovery of zinc by the body.

Keywords: anemia, food fortification, iron, zinc, FAAS, validation.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	3
ARTIGO 1 - FERRO, ZINCO E FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR: UMA REVISÃO	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. Introdução	9
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Ferro	12
2.2.1 Mecanismo de oxidação do ferro	16
2.2. Zinco.....	17
2.3. Interação competitiva entre ferro e zinco.....	20
2.4. Fortificação de alimentos com ferro	24
2.5. Consumo de farinhas e pães fortificados	27
3. Agradecimentos	28
4. Referências Bibliográficas	29
ARTIGO 2 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS) PARA AVALIAÇÃO DE FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. Introdução	40
2. Materiais e Métodos	45
2.1. Produtos analisados	45
2.2.1. Reagentes e padrões	45
2.2.2. Equipamentos	46
2.2.3. Limpeza das vidrarias.....	46
2.3. Metodologia.....	46
2.3.1 Amostragem	46
2.3.2. Mineralização das amostras.....	47
2.3.3. Determinação Quantitativa de Ferro e Zinco	47
2.3.4. Curvas analíticas de ferro e zinco por FAAS	48
2.3.5. Repetitividade.....	48
2.3.6. Exatidão por taxa de recuperação.....	48
2.3.7. Sensibilidade: limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	48
2.4. Análise Estatística	49
3. Resultados e Discussão	49
3.1. Validação do Método de Análise de Ferro e Zinco por FAAS em pães industrializados.....	49
3.1.1. Linearidade.....	49
3.1.2. Precisão: repetitividade	52
3.1.3. Exatidão: taxa de recuperação	58
3.1.4. Sensibilidade: limites de detecção (LD) e quantificação (LD).....	60

4. Conclusão	61
5. Agradecimentos	62
6. Referências Bibliográficas	63
ARTIGO 3 - FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS	66
RESUMO	67
ABSTRACT	69
1. Introdução	71
2. Parte Experimental	74
2.1. Produtos analisados	74
2.2. Determinação de Umidade dos pães	75
2.3. Determinação de ferro e zinco	75
2.3.1. Reagentes	75
2.3.2. Equipamentos	75
2.3.3. Limpeza das vidrarias	76
2.3.4. Amostragem	76
2.3.5. Mineralização das amostras	76
2.3.6. Determinação Quantitativa de Ferro e Zinco	77
2.4 Análise Estatística	77
3. Resultados, Análise Estatística e Discussão	77
3.1 Determinação de ferro e zinco	77
3.2. Determinação Umidade	86
3.3. Análise de PCA	89
4. Conclusões	92
5. Agradecimentos	93
6. Referências Bibliográficas	94
CONCLUSÕES GERAIS	98

INTRODUÇÃO GERAL

O pão é um alimento que resulta do cozimento de uma massa feita com farinha de certos cereais, como trigo ou cevada, água e sal (ZIGLIO *et al.*, 2007). Acredita-se que ele tenha surgido há milhares de anos A.C. na Mesopotâmia, sendo fabricado com farinha de cevada e água, dando origem a um pão achatado, duro, seco e amargo (COTRIM, 2002). Para ser ingerido, o pão era lavado em água quente e depois assado sobre pedras (EMPÓRIO, 2009).

O pão pode ser considerado um produto popular, sendo consumido na forma de lanches ou com refeições. Ele é apreciado devido ao seu sabor, preço e sua disponibilidade em milhares de padarias e supermercados do país (ESTELLER, 2004). No Brasil em 2005, os produtos de panificação, dentre eles o pão, ocuparam a terceira colocação na lista de compras do brasileiro, que destinou, em média, 12% do orçamento familiar para alimentação (ABIP, 2005), onde o pão industrializado representou 4% dos pães consumidos (ABIP, 2009).

Seguindo a tendência mundial em se adicionar micronutrientes nos alimentos e dos possíveis benefícios do enriquecimento ou fortificação alimentar levaram o Brasil, desde 2002, a instituir a resolução número 344 que objetiva a adição de ácido fólico (150 µg/100g) e de ferro (4,2 mg/100g) em farinhas de trigo e milho, já que a farinha é utilizada em alimentos considerado de grande consumo pela população brasileira, com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia ferropriva (ANVISA, 2002), sendo esta o problema nutricional mais comum em todo mundo. Segundo WHO (World Health Organization) em 2001 existiam, 2 bilhões de anêmicos no mundo, sendo a maioria por deficiência de ferro. O risco de deficiência é maior quando os requerimentos de ferro são maiores como na primeira infância, adolescência e durante a gestação (LYNCH, 2005).

A absorção de compostos inorgânicos com características químicas (configuração eletrônica) semelhantes ao do ferro como Co, Ni, Mn, Zn e Cd podem contribuir para a carência em ferro, pois podem compartilhar o mesmo sistema de absorção. Contudo, com exceção do zinco, há pouca evidência de que essa competição seja importante do ponto de vista nutricional em relação aos

micronutrientes no ser humano (LEE, 2001; COZZOLINO, 2005).

No organismo o ferro pode participar de processos oxidativos e como consequência causar algumas doenças como Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, catarata, entre outras (FERREIRA, MATSUBARA, 1997) e em excesso pode causar um possível aumento do fígado, desenvolvimento de diabetes, hipogonadismo, inflamação das articulações, doença cardíaca potencialmente fatal (COZZOLINO, 2005), pode também diminuir a biodisponibilidade de outros minerais, como por exemplo, o zinco podendo causar um desequilíbrio na razão molar Fe:Zn que deve ser de 4:1 (PEDROSA E COZZOLINO, 1993; COZZOLINO, 2005).

O zinco é cofator na produção de superóxido dismutase, que corresponde a uma família de enzimas. É responsável pela primeira linha de defesa do organismo contra os radicais livres do oxigênio, que podem prejudicar a integridade celular e pode levar a morte celular. Através da competição com o ferro e o cobre o zinco pode diminuir a produção de radicais livres e a geração de radical hidroxila por aumentar a síntese de superóxido dismutase.

A deficiência de zinco pode causar várias deficiências como nanismo, má cicatrização, cirrose hepática, menstruação irregular, depressão e deficiência no sistema imune dentre outras (PÓVOA FILHO, 1995; OKIGAMI, 1996; PRASAD, 1996;).

Assim este trabalho teve como objetivo adequar e validar um método por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) para a verificação dos teores de ferro e zinco em pães industrializados com farinhas fortificadas, estabelecer a relação molar Fe:Zn nas amostras, verificar o teor de umidade dos pães industrializados (tradicional e especiais) produzidos com farinhas fortificadas com ferro.

Referências Bibliográficas

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Análise do mercado de pães, 2002/2003, **2005**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em 01/06/2005.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Pães Consumidos no Brasil, **2009**. Disponível em: <http://www.abip.org.br/perfil> . Acesso em 21/05/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 344, de 13 de dezembro de **2002**. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm. Acesso em 10/11/2009

COTRIM, G. História global - Brasil e geral. São Paulo: Saraiva, p. 41, **2002**.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole; v.1. p. 878, **2005**.

EMPÓRIO VILLA BORGHESE. História do pão. **2009**. Disponível em: <http://www.emporiovillaborghese.com.br/curiosidades/018_historia_do_pao.htm>. Acesso em: 23 out. 2009.

ESTELLER, M.S. Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento, p. 248. São Paulo, Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), **2004**.

FERREIRA, A.F.A., Matsubara, L.S. *Rev. Ass.Med.*, 43(1): 61-68, **1997**.

LEE, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 5ª edição. Editora Edigar Blucher, Ltda. São Paulo, p. 381, 425, **2001**.

LYNCH, S. R. *Best Prac. Res. Clin. Hemat.*, 18(2): 333-346, **2005**.

OKIGAMI, H. J. *Biomolec. Med. Free Rad.*, Vol. 2, Nº 2 , **1996**.

PEDROSA, L.F.; Cozzolino, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v.27, n.4, p.266-270, **1993**.

PÓVOA, Filho, H . *Radicais livres em patologia humana*. Ed. Imago. **1995**.

PRASAD, A.S. Zinc deficiency in womem, infants and children. *J Am Coll Nutr*; 15:113-20, **1996**.

World Health Organization/United Nations Children's Fund/United Nations University. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: World Health Organization/United Nations Children's Fund/United Nations University; **2001**.

ZIGLIO, B. R.; Bezerra, J.R.M.V.; Branco, I.G.; Bastos R.; Rigo M. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. Rev. Ciênc. Exatas e Naturais, vol. 9, n. 1, jan./jun. **2007**. Disponível em: <<http://www.irati.unicentro.br/editora/revistas/recen/v9n1/115-128.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2009.

OBJETIVOS

O objetivo fundamental desse trabalho foi o de avaliar o teor de ferro e do zinco em pães industrializados elaborados com farinhas de trigo fortificadas. Para isso foi necessário:

- Adequar e validar a metodologia para as determinações de ferro e zinco em pães processados contendo farinhas fortificadas, utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica;
- Avaliar o teor de ferro e zinco em pães industrializado (tradicional e especiais);
- Avaliar a razão molar Fe:Zn;
- Avaliar o teor de umidade.

ARTIGO 1

FERRO, ZINCO E FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR: UMA REVISÃO

Grasiela de Souza Costa da Silva e Juliana A. L. Pallone
Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

RESUMO

No organismo humano alguns compostos inorgânicos são utilizados em numerosas proteínas e enzimas como co-fatores, entre eles se destacam o ferro e o zinco. O ferro é empregado, por exemplo, na hemoglobina (transporte de oxigênio), na mioglobina (fornecimento de oxigênio para os músculos). Também participa de enzimas importantes como na catalase (redução do peróxido de hidrogênio) e enzimas que auxiliam em várias reações bioquímicas. O zinco por sua vez, participa de várias proteínas e enzimas como principal sítio de atividade biológica, tornando-se importante em atividades do sistema imune, na prevenção de formação de radicais livres, no crescimento estrutural, dentre outros. Porém, ferro em excesso pode participar de processos oxidativos e as doenças consequentes deste processo são: doença de Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e catarata, entre outras. Em excesso também pode comprometer o aproveitamento do zinco no organismo humano. O zinco na quantidade adequada no organismo pode diminuir a produção de radicais livres por aumentar a síntese de superóxido dismutase, por competição com cobre e ferro, e por competição com ferro na geração do radical hidroxila. Como tentativa de amenizar o problema de deficiência de ferro, por ser este considerado um grande problema de saúde pública, a ANVISA tornou obrigatória à fortificação de farinhas de milho e trigo com ácido fólico (150 µg/100 g de farinha) e ferro (4,2 mg/100 g de farinha) através da Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Estas matrizes foram escolhidas por não apresentarem mudanças organolépticas, serem de baixo custo e por serem elaboradas com farinhas fortificadas, ingrediente principal na fabricação de alimentos considerados de grande consumo pela população brasileira, dentre eles o pão industrializado.

Palavras-chave: ferro, zinco, deficiência, fortificação alimentar.

ABSTRACT

In the human organism some inorganic compounds are used in numerous proteins and enzymes as cofactors, among them stand out iron and zinc. The iron is used, for example, hemoglobin (oxygen transport), in myoglobin (supplying oxygen to the muscles). Also as part of important enzymes in catalase (reduction of hydrogen peroxide) and enzymes that assist in various biochemical reactions. Zinc in turn part of various proteins and enzymes as major site of biological activity, making it important in immune system activity in the prevention of free radical formation, growth structural, and others. However, excess iron can participate in oxidative processes and diseases resulting from this process are: Parkinson's disease, Alzheimer's, stroke, multiple sclerosis and cataracts, among others. Excess can also compromise the use of zinc in the human body. Zinc in adequate amount can lessen the production of free radicals by increasing the synthesis of superoxide dismutase, by competition with copper and iron, and iron by competition with the generation of hydroxyl radicals. In an attempt to alleviate the problem of iron deficiency, since this is considered a major public health problem, ANVISA has mandatory fortification of maize and wheat flour with folic acid (150 µg/100 g flour) and iron (4,2 mg/100 g flour) by Resolution RDC nº 344 of December 13, 2002. These matrices were chosen because there were no organoleptic changes, being low cost and because they are made with fortified flour, the main ingredient in the manufacture of foods considered high consumption by the population, among them the bread industrialized.

Keywords: iron, zinc deficiency, food fortification.

1. Introdução

Os minerais são elementos inorgânicos presentes nos alimentos e que, no organismo, exercem funções metabólicas importantes, dentre elas: ativação, regulação, transmissão e controle (WILLIAMS, 1997). De modo geral, as necessidades dos minerais podem ser supridas por meio de uma dieta balanceada, contudo, grande parcela da população está sujeita aos riscos associados a uma dieta contendo baixas quantidades desses nutrientes (FLYNN *et al.*, 2003)

A fortificação alimentar é utilizada mundialmente com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais, de dieta pobre em nutrientes, de uma população, tendo a vantagem de não ser necessária mudanças nos hábitos alimentares (BROGNOLI, 2008).

Seguindo esta tendência o Brasil, desde 2004, através da resolução número 344, de 2002, vem adicionando ácido fólico (150 µg/100g) e ferro (4,2 mg/100g) em farinhas de trigo e milho, com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia ferropriva (ANVISA, 2002), já que a farinha é utilizada como principal ingrediente em alimentos considerado de grande consumo pela população brasileira, dentre eles o pão. No Brasil em 2005, os produtos de panificação ocuparam a terceira colocação na lista de compras do brasileiro, que destinou, em média, 12% do orçamento familiar para alimentação (ABIP, 2005), onde o pão industrializado representou 4% dos pães consumidos (ABIP, 2009).

O pão apresenta características químicas, físicas e físico-químicas de acordo com a sua composição e processo de fabricação (ANVISA, 2000), sendo consumido na forma de lanches ou com refeições. Ele é apreciado devido ao seu sabor, preço e sua disponibilidade em milhares de padarias e supermercados do País (ESTELLER, 2004).

Até chegar ao consumidor final o pão passa por várias etapas, desde a mistura dos ingredientes até sua comercialização.

A etapa inicial, mistura, tem a finalidade de homogeneizar os ingredientes, aerar e iniciar o desenvolvimento do glúten, formado pela hidratação das proteínas

da farinha, até alcançar uma massa com propriedades viscoelásticas adequadas (OWENS, 2001).

A fermentação principal é produzida pela ação do fermento biológico (leveduras) sobre os açúcares presentes na massa. Sua função é produzir gás carbônico e modificações físico-químicas, participando na formação do sabor e aroma do pão, além de colaborar para sua conservação (OWENS, 2001).

A divisão da massa tem por finalidade a obtenção do peso adequado aos pães que serão fabricados (OWENS, 2001).

A etapa do boleamento tem por objetivo eliminar a pegajosidade da massa e dar forma de uma bola homogênea, facilitando assim as etapas seguintes (OWENS, 2001).

Na fermentação intermediária os pedaços boleados são enviados para a câmara de fermentação onde ficam em repouso de 5-20 minutos em uma temperatura entre 26-30°C e umidade relativa entre 75-80% (OWENS, 2001).

A etapa seguinte, moldagem, tem por objetivo melhorar a textura e a estrutura da célula do pão, como também dar forma apropriada ao produto (OWENS, 2001).

Na fermentação final, como na intermediária, é realizada em câmaras com condições adequadas de temperatura e umidade relativa e leva em geral cerca de 40 a 120 minutos, dependendo do tipo de pão, formulação e qualidade da farinha (OWENS, 2001).

A etapa do cozimento tem como finalidade principal o tratamento térmico do amido e da proteína, juntamente com a inativação das enzimas e do fermento, permitindo a formação da crosta e o desenvolvimento de arome e sabor. Durante o cozimento ocorre a gelatinização do amido e a coagulação do glúten. No final desta etapa a evaporação da massa diminui ocorrendo a formação da cor da crosta e o sabor do pão (reação de Maillard). As temperaturas mais comuns a esta etapa são de 200 a 230°C por tempos variáveis, dependendo do tipo e tamanho do pão a serem produzidos (OWENS, 2001).

Ao saírem do forno os pães devem ser resfriados à temperatura ambiente antes de serem submetidos ao corte e posterior embalagem, pois estão

excessivamente quentes, podendo causar deformação no momento do corte e mesmo morno pode resultar em condensação na embalagem com conseqüente crescimento de fungos e outras degradações (OWENS, 2001).

Após o resfriamento o pão segue para o corte onde é fatiado por lâminas ou correias cortantes e é embalado. A embalagem utilizada pode ser de vários tipos de materiais, sendo as mais comuns as de polipropileno e polietileno (OWENS, 2001).

A mecanização da indústria de panificação é fundamental do ponto de vista econômico e técnico, resultando no aumento da capacidade de produção e redução de tempo de processamento, contribuindo para uma operação mais eficiente, econômica e higiênica, além de permitir melhor controle e manutenção da mesma, melhorando conseqüentemente a qualidade do produto final (EL-DASH, *et al.*, 1983).

A qualidade dos ingredientes também influencia diretamente na qualidade dos produtos industrializados. Por isso, a utilização de matéria-prima inadequada – fora dos padrões físico-químicos ou microbiológicos – pode acarretar falta de uniformidade do produto, reduzir sua qualidade, com conseqüente surgimento de problemas relacionados à sua aceitação no mercado (NUNES, 2008).

Um grande desafio encontrado tanto para os fabricantes de farinha e pães é a homogeneidade da pré-mistura (ácido fólico e ferro) na farinha, pois uma pequena quantidade deve ser adicionada, misturada, gerando, assim, um produto homogêneo. No Brasil, a adição da pré-mistura é feita através de um alimentador e um dosador. Este equipamento permite a adição de pequenas quantidades, de forma contínua, com fluxo controlável e constante. O equipamento mais utilizado é o com um motor elétrico com velocidade variável para controlar o fluxo do pó. Problemas na operação estão relacionados com a formação de arcos ou o funil no alimentador (GERMANI *et al.*, 2001), que podem implicar em uma farinha não homogênea, conseqüentemente pães com diferentes teores de ferro e ácido fólico.

Apesar dos possíveis benefícios da adição de ferro na farinha, este pode apresentar interações com outros nutrientes, incluindo vitamina A (inibidor), vitamina C (ativador), outros metais (competição Fe:Zn) e fitatos. Esses

compostos influenciam no aproveitamento do metal pelo organismo (COZZOLINO, 2005).

A competição Fe:Zn pode causar a deficiência de zinco, mineral importante por participar de várias proteínas e enzimas como principal sítio de atividade biológica (OKIGAMI, 1996).

A deficiência de zinco também pode ser causada por ingestão inadequada, aumento da necessidade diária ou por causas genéticas, e é caracterizada por nanismo, má cicatrização, perda do paladar, acne, menstruação irregular, impotência, depressão, dentre outras, e são resultado da alteração de seu metabolismo, suas funções bioquímicas ou ambas (PÓVOA FILHO, 1995; HAMBIDGE *et al.*, 1986; MILLIS, 1989).

Por tanto, torna-se necessário um estudo da composição do produto final, de alimentos que utilizam farinhas fortificadas com ingrediente principal.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Ferro

O ferro está presente em todas as células do corpo, sendo um componente essencial de muitas proteínas, como por exemplo, hemoglobina, mioglobina, transferrina, lactoferrina, ferritina e hemossiderina. As funções do ferro no organismo resultam de suas propriedades físico-químicas (MAHAN E ESCOTT-STAMP, 2005). O ferro é essencial para as reações de transferência de elétrons, ligação e transporte de oxigênio, diferenciação e crescimento celular. Além disso é um componente crítico de enzimas que atuam no funcionamento do sistema imunológico, incluindo a ribonucleotídeo redutase, envolvida na síntese de DNA, mieloperoxidase que atua na eliminação de bactérias por neutrófilos, entre outras (OPPENHEIMER, 2001; WINTERGERST *et al.*, 2007), e em outras enzimas como a catalase, que age na redução do peróxido de hidrogênio, principalmente quando este é formado em grande quantidade, na cadeia de inibição de radicais livres, e enzimas que auxiliam as reações bioquímicas (CUNHA E CUNHA, 1998; MIRET, *et al.*, 2003; COZZOLINO, 2005).

Os efeitos adversos resultantes da carência de ferro se devem à sua função no transporte de oxigênio e como consequência, a síntese de proteínas, funções de receptores e outros processos metabólicos aeróbicos são prejudicados (BEARD, 2001).

A biodisponibilidade do ferro depende da forma em que ele se encontra nos alimentos (ZIJP *et al.*, 2000), heme e não heme. O ferro heme corresponde a 40% do ferro contido nos alimentos de origem animal, tais como: carnes vermelhas, principalmente fígado e outras vísceras, carne de peixes, frutos do mar (ostras, camarões e caranguejo) e aves, e está ligado a hemoglobina e a mioglobina, sendo este mais absorvido que o ferro não heme (HURREL, 1997; MAHAN E ARLIN, 2002). Após interação com um receptor de membrana do enterócito, o radical heme penetra na célula, por um simples processo de difusão, sofre a ação da hemeoxigenase e é liberado para ser armazenado ou transportado, conforme mostra a Figura 1. (SKIKNE *et al.*, 1994).

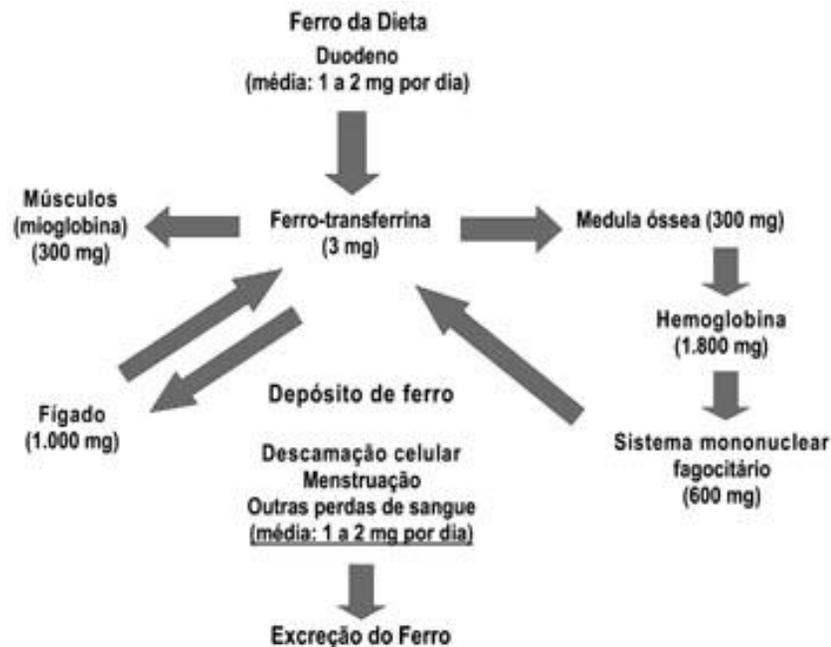


Figura 1. Metabolismo do ferro (Fonte: Skikne *et al.*, 1994).

O ferro não heme está presente principalmente nos alimentos de origem vegetal, tais como: verduras de folhas escuras (brócolis, couve e espinafre), leguminosas, grãos (feijões, lentilha, soja e outros) e cereais (HURREL, 1997;

MAHAN E ARLIN, 2002). A maior parte da absorção do ferro não hemínico dá-se através do mecanismo de difusão pela membrana celular e entre as células. A absorção através do sistema transferrina/receptor da transferrina somente se torna importante, quando houver redução do suprimento de ferro para o organismo ou em situações anormais como na hemocromatose (doença causada pelo excesso de ferro no organismo) de causa genética (SKIKNE *et al.*, 1994).

O organismo humano absorve cerca de 20 a 30% de ferro heme, podendo chegar a 40% em casos de deficiência, porém, estas quantidades podem ser afetadas por outros fatores da dieta, enquanto que o ferro não heme é absorvido entre 5 a 10%, sendo sua absorção muito influenciada pelo estado nutricional do indivíduo e por fatores da dieta (ZIJP *et al.*, 2000). O ácido fítico, chás, café, farelo, ovo, fosfatos, polifenólicos, alguns temperos e fibras podem inibir a absorção do ferro (HURREL *et al.*, 1999). Alimentos contendo ácido ascórbico, ácidos orgânicos, carne, aves e peixes, produtos fermentados de soja podem aumentar a absorção do ferro não heme (HEALTH E FAIRWEATHER-TAIT, 2002).

Além disso, o ferro nos alimentos também pode apresentar interações com outros nutrientes, incluindo vitamina A (inibidor), vitamina C (ativador) e outros metais (competição Fe:Zn) e fitatos. Esses compostos influenciam no aproveitamento do metal pelo organismo (COZZOLINO, 2005).

A absorção de metais com características químicas (configuração eletrônica) semelhantes ao do ferro como cobalto, níquel, manganês, zinco e cádmio que compartilham o mesmo sistema de absorção podem contribuir para a deficiência de ferro e vice-versa. Contudo, com exceção do zinco, há pouca evidência de que essa competição seja importante do ponto de vista nutricional em relação aos micronutrientes no ser humano (LEE, 2001; COZZOLINO, 2005).

Com base na importância do ferro para os processos metabólicos, o principal resultado da carência desse nutriente na dieta é a anemia ferropriva caracterizada pela insuficiência de hemoglobina na circulação, provocando diminuição da habilidade de transporte de oxigênio para os tecidos e é definida como a concentração de hemoglobina no sangue total abaixo de 85% da média para uma apropriada faixa etária da população e atinge proporção significativa em

mulheres na idade fértil. Sua deficiência produz diferentes transtornos funcionais, que aumentam à medida que se esgotam os compostos metálicos essenciais. Os sinais clínicos da anemia incluem capacidade de trabalho diminuída, apatia, cansaço persistente, respiração curta, palpitações, dores de cabeça, tontura e irritabilidade. Entre as causas da anemia, a principal é a deficiência em ferro, que pode ocorrer tanto pela falta de ingestão quanto pelo aumento das perdas (COZZOLINO, 2005).

Estudos realizados em diferentes regiões brasileiras mostram prevalência de anemia entre 34,6 e 70,4% em menores de 24 meses, sendo esta situação encontrada principalmente em regiões mais pobres (SILVA E CAMARGOS, 2006; SILVA, *et al.*, 2007; ROCHA, 2008). No caso de gestantes, estima-se uma média nacional de anemia em torno de 30% (CGPAN/MS, 2007).

A deficiência de ferro no organismo se deve principalmente à baixa ingestão do mesmo, e um dos fatores que podem contribuir para esse quadro é a mudança nos hábitos alimentares. A fim de reduzir a ingestão calórica, evitando assim a obesidade, é provável que a diminuição da ingestão energética, tenha levado a uma diminuição da ingestão de ferro, de forma que provoque a aparição de anemia em alguns grupos de risco (DALLMAN, 1990; RAY, 2002).

Desde 2005 a ANVISA estabelece a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para ferro e os valores encontram-se na tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Ingestão Diária Recomendada de ferro

Faixa Etária	IDR de Ferro (mg/dia)
Crianças	9
Gestantes	27
Lactantes	15
Adultos	14

Fonte: ANVISA Resolução número 269 – Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais (2005).

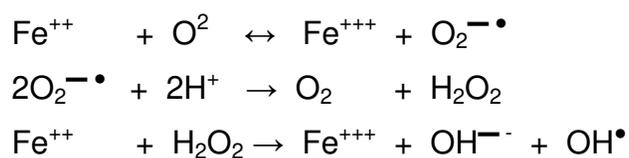
2.2.1 Mecanismo de oxidação do ferro

O ferro é essencial para a vida porque tem a capacidade de receber e transferir elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células (ANDREWS, 2000). Por ser altamente reativo, o ferro apresenta facilidade em catalisar reações de radicais livres, formando oxidantes tóxicos que podem ocasionar danos às células e tecidos (WORWOOD, 1996). Os danos induzidos pelos radicais livres podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e as vitaminas presentes nos alimentos. As espécies reativas de oxigênio também estão implicadas nas várias doenças humanas (BIANCHI E ANTUNES, 1999; BARBOSA E MEDEIROS, 2006).

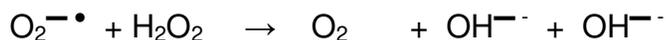
Radicais livres são moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (HALLIWEELL, 1994) e são formados em um cenário de reações de óxido-redução (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). A presença de radicais livres é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997)

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa têm confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. Sendo o ferro o metal mais abundante no organismo, está biologicamente mais capacitado a catalisar as reações de oxidação de biomoléculas. O papel dos metais na formação *in vitro* das ERMO (espécies reativas do metabolismo do oxigênio) é confirmada pelas reações de Fenton (equação 1) e de Haber-Weiss (equação 2) (AUST, 1991), onde um elétron é transferido para o oxigênio molecular ($O_2^{\cdot-}$) que é o precursor do peróxido de hidrogênio. Esse último, o peróxido de hidrogênio, por sua vez, reage com o Fe^{++} gerando o potente radical hidroxil (OH^{\cdot}) (PIERRE, 1999). Tais espécies podem promover a oxidação de diversas células e organelas causando danos celulares (ANDREWS, 2000).

Reação de Fenton (AUST, 1991): (1)



Reação de Haber-Weiss (AUST, 1991): (2)



Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a incidência de várias doenças, incluindo doenças pulmonares, como, por exemplo, enfisema e outras doenças como de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata, cardiopatias, artrite e diabetes, entre outras (BIANCHI E ANTUNES, 1999). Os danos causados ao DNA também desempenham papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN E PRIEME, 1998; BARBOSA E MEDEIROS, 2006).

2.2. Zinco

O zinco é um elemento traço com diversas funções no organismo humano sendo considerado o 27º elemento mais abundante na terra. É importante para o funcionamento adequado do metabolismo, necessário à reprodução, diferenciação celular, crescimento (FERRAZ *et al.*, 2007), desenvolvimento, reparação tecidual. Por ser constituinte de mais de 300 enzimas (BHATNAGAR, 2004), participa do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, da síntese e degradação dos ácidos nucleicos (AMESTY *et al.*, 2006) e de atividades do sistema imune, com ação regulatória sobre o sistema imunológico, prevenção de formação de radicais livres, crescimento estrutural, desenvolvimento sexual e cognitivo e síntese de DNA (GIBSON, 1990; OKIGAMI, 1996; WOOD, 2000; MAFRA, COZZOLINO, 2004; MACEDO *et al.*, 2010). O zinco possui duas propriedades que merecem ser destacadas. A primeira é o metabolismo de absorção, distribuição e excreção que são tão eficientes que não permitem o acúmulo deste metal no organismo. A segunda é que suas propriedades físico-químicas são altamente adaptáveis na associação com diversas proteínas e enzimas com importantes funções biológicas (OKIGAMI, 1996).

O zinco é cofator na produção de superóxido dismutase, que corresponde a uma família de enzimas, responsável pela primeira linha de defesa do organismo contra os radicais livres do oxigênio, que podem prejudicar a integridade celular e levar a morte celular. O zinco pode competir com o ferro na reação de Fenton e Haber Weeiss interferindo na absorção do mesmo, aumentando assim a síntese de superóxido dismutase, conseqüentemente diminuindo a produção de radicais livres (OKIGAMI, 1996).

As alterações desencadeadas pelos déficits séricos do zinco comprometem o funcionamento do sistema imunológico, podendo causar um estado de imunossupressão. Existe ainda, a possibilidade do aparecimento de doenças oportunistas e infecciosas e de redução da proteção antioxidante, fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da desnutrição (MACEDO, 2010).

Cerca de 20 a 30% do zinco consumido oralmente é absorvido, mas pode haver variações, dependendo da pessoa e da fonte de alimento. Esse micronutriente é mais absorvido quando proveniente de alimentos de origem animal que vegetal. A presença de fitatos, fósforo inorgânico e ácido oxálico podem inibir sua absorção intestinal (LÖNNERDAL, 1989), enquanto que aminoácidos, ácidos orgânicos e proteínas podem facilitar (GIBSON, 1990; AGGETT, 1995; LÖNNERDAL, 2000).

O zinco proveniente de alimentos é encontrado em grandes quantidades nos produtos de origem animal e nos frutos do mar, principalmente nas carnes vermelhas, mariscos, ostras, fígados, miúdos e ovos (MAFRA, COZZOLINO, 2004).

A biodisponibilidade do zinco pode ser afetada no processo de absorção intestinal ou na circulação sanguínea, por isto nem toda quantidade de zinco ingerida é utilizada pelo organismo (GIBSON, 1990; AGGETT, 1995; LÖNNERDAL, 2000). Contudo o zinco pode competir com minerais tais como cobre e ferro na circulação sanguínea diminuindo assim sua absorção (MOCCHIGIANI, 2000).

No organismo o zinco é encontrado somente em pequena quantidade livre e sua absorção, no jejuno, aparenta se processar nas formas de difusão passiva e

transporte facilitado pelo sangue, sendo distribuído aos demais tecidos pelo fígado, aumentando conforme a necessidade do organismo (JACKSON, 1989; OKIGAMI, 1996; MAFRA, COZZOLINO, 2004).

O zinco encontrado no organismo de adultos corresponde a cerca de 2g, onde 80% podem ser encontrado nos músculos e ossos (GIBSON, 1990).

A ingestão diária de zinco depende da idade, estágio de crescimento e extensão de perda deste mineral através do intestino, pâncreas, vesícula biliar, rins e pele (OKIGAMI, 1996), e é calculada a partir da sua biodisponibilidade. Contudo é difícil medir com exatidão a quantidade ideal para uma atividade ótima no crescimento e nas inter-relações do metabolismo, pois há grandes variações entre os indivíduos, resultado, dos hábitos alimentares e estado fisiológico de cada um deles (KING, 1989).

Desde 2005 a ANVISA estabelece a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para zinco e os valores encontram-se na tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Ingestão Diária Recomendada de zinco

Faixa Etária	IDR de Zn (mg/dia)
crianças	5,6
gestantes	11
lactantes	9,5
Adultos	7

Fonte: ANVISA Resolução número 269 – Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais (2005).

O primeiro relato de deficiência de zinco ocorreu no Egito, 1963, em homens que sofriam de retardo de crescimento e problemas com maturação sexual. A ocorrência, provavelmente se originou de uma dieta rica em fitato, o qual pode ter inibido a absorção de zinco. (PRASAD *et al.*, 1963; PEREIRA E HESSEL, 2009).

O diagnóstico da deficiência de zinco nos humanos é dificultado, em função dos muitos sintomas inespecíficos (HAMBIDGE, 1989), e está associada, sobretudo ao vegetarianismo ou a enfermidade, em especial a transtornos

hepáticos e gastrointestinais associados com má absorção do zinco (GOLDEN, 1989).

A deficiência severa de zinco em gestantes já foi associada a abortos espontâneos e à má formação congênita, como por exemplo, anencefalia. A forma mais suave de deficiência de zinco tem sido associada ao baixo peso no nascimento, ao retardo do crescimento intrauterino e ao parto prematuro. Essas condições prejudicam a saúde da mãe e do feto, porque elas levam a um aumento na laceração materna, perda de sangue elevada, infecção, sofrimento fetal, morte do feto, asfixia neonatal, sofrimento respiratório e infecção grave no feto (JAMESON, 1993).

Contudo estudos de metanálises indicam que a suplementação com zinco melhora o crescimento e o raquitismo em crianças (BAQUI *et al.*, 2002), e é capaz de reverter as anormalidades associadas à sua deficiência (ANTUNES, 2010).

2.3. Interação competitiva entre ferro e zinco

A deficiência de ferro e zinco ocorre simultaneamente em várias populações e devem ser trabalhadas de forma equilibrada. Existe a necessidade de cuidados, principalmente com crianças e gestantes, pois suas necessidades são aumentadas. A avaliação da medida do valor de zinco é difícil, pois a determinação de sua concentração plasmática ou sérica não é suficiente como marcador bioquímico ou biológico (WIERINGA *et al.*, 2004).

A proporção ferro-zinco, normalmente encontrada nos alimentos naturais, varia de 0,5 a 2,0, provavelmente não exercendo influência no processo competitivo, com exceção dos alimentos fortificados (SOLOMONS, 1983).

O mecanismo de interação entre a absorção de ferro e zinco não está totalmente esclarecido. Porém, existem fortes evidências que apontam a ocorrência de interação nos sítios de absorção ou pós-absorção, por causa da competição pelos mecanismos semelhantes de transporte (ANTUNES, 2010), por serem eles quimicamente similares (SOLOMONS, 1983).

Solomons (1986) sugeriu que existe uma carga total de ferro e zinco que o organismo suporta, correspondendo ao ponto de saturação e a partir deste,

começaria o efeito competitivo entre eles. Abaixo deste ponto, existiriam sítios disponíveis para absorção de ferro e zinco sem muita interferência.

Os mecanismos responsáveis pela absorção intestinal de ferro e zinco são similares (KORDAS, 2004; BODIGA, 2007; YANAGISAWA, 2008), assim hipóteses têm sido levantadas com o objetivo de encontrar a localização do ponto específico dessa interação. A possibilidade do ferro e do zinco inibirem a absorção intestinal um do outro, através da concorrência por um caminho comum, foi estudada, medindo as concentrações de ferritina e de metilotioneína (proteína encontrada no intestino) e a atividade da aconitase (enzima) no local da absorção (McMAHON, 1998).

Uma primeira hipótese foi testada em ratos com deficiência combinada de ferro e zinco, decorrente do fato da absorção intestinal do ferro e zinco serem significativamente reduzida na presença de outro metal. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento da concorrência entre ferro e zinco para os ligantes/transportadores no local da absorção. É possível que houvesse competição entre ambos, frente aos ligantes e transportadores no local da absorção (BODIGA, 2007).

Já uma segunda hipótese advém da constatação que a suplementação combinada reduz, não só o nível plasmático de ferro, mas também o de ferro hepático, o que sugere que a suplementação de ferro e zinco afeta não apenas a absorção, mas também a retenção destes minerais. Isso leva à conclusão de que um suplemento combinado é menos eficaz do que um suplemento único para melhorar a absorção e retenção de ferro ou zinco (LIND *et al.*, 2003).

Uma terceira hipótese seria a possibilidade de competição no transporte duodenal entre ferro e zinco pela proteína transportadora cátion divalente 1 (DCT-1). A DCT-1 parece ser um transportador chave que está envolvido na absorção do ferro, mas também pode transportar muitos outros metais, incluindo zinco (McMAHON, 1998). É possível que o ferro e o zinco possam inibir a absorção um do outro competindo pelo DCT-1. Os seus efeitos poderão ser mais perceptíveis quando um deles se encontrar em excesso em comparação ao outro, ou quando ambos coexistirem em estado de deficiência (SACHER, 2001).

Quando essas hipóteses são aplicadas, especificamente, aos seres humanos, a identificação de outra família de transportadores intestinais de zinco (ZIP) revelaram mecanismos distintos relativos à absorção de ferro e zinco. Dentre os transportadores descritos, dois se destacam, hZIP1 e hZIP2. Estes estão presentes em vários tecidos humanos e têm ação específica no transporte de zinco. Portanto, sem qualquer relação com o transporte de ferro (GAITHER,2001).

A absorção de ferro é suprimida no intestino delgado quando são ingeridos 50-60mg de zinco diariamente (WADA, 2004; YANAGISAWA, 2007). Assim, os resultados sobre essas interações são confusos e conflitantes (WHITTAKER, 1998; SREEDHAR, 2003; WIERINGA, 2004; WALKER *et al.*, 2005; OLIVARES *et al.*, 2007). Diversos fatores podem confundir esta relação: a concentração de cada nutriente ofertado na suplementação, a forma em que esta formulação se apresenta (dissolvidos em soluções aquosas são menos absorvidos que quando ofertados com alimentos) e a diferença de concentração de cada um dos íons (ANTUNES, 2010).

A maioria dos estudos sobre a interação entre ferro e zinco tem sido feita utilizando-se diferentes níveis destes minerais administrados simultaneamente: como segue:

Efeitos do ferro sobre o zinco, em adultos através de uma solução teste (água, ácido ascórbico, sulfato ferroso e sulfato de zinco) e de uma refeição teste (arroz com molho de carne; ácido ascórbico, sulfato de zinco e sulfato ferroso) nas razões molares de 1:1; 2,5:1 e 25:1. Na solução teste, até 2,5:1 não houve inibição. No entanto, quando a razão passou para 25:1, houve redução significativa na absorção do zinco, efeito este que foi diminuído quando a solução apresentava um ligante (histidina). Já na refeição teste, não houve redução significativa em nenhuma das razões molares. Assim sendo, parece que a ação inibitória pode ser diminuída na presença de ligantes de alimentos, que acabam por modificar a biodisponibilidade dos minerais (SANDSTRÖM *et al*, 1985).

Efeito da suplementação de ferro em uma dieta regional do nordeste do Brasil, constatou-se que a biodisponibilidade do zinco foi diminuída com a suplementação, e o processo competitivo Fe:Zn foi influenciado pela quantidade

da dieta e pelas proporções Fe:Zn, neste caso, em tona de 4:1 (PEDROSA E COZZOLINO, 1993);

Estudo com utilização de um alimento infantil fortificado com ferro, não indicaram diferença na absorção aparente do zinco em crianças de 9 meses (FAIRWEATHER-TAIT *et al.* 1995).

Rodriguez *et al.*, (1998), demonstraram que em uma situação de deficiência de ferro em ratos, a absorção de zinco permanece inalterada, provocando maiores alterações no metabolismo do cobre do que no zinco.

A suplementação de ferro feita a um grupo de gestantes diminuiu a absorção de zinco em mais de 50%, conforme demonstrado pela menor concentração plasmática deste elemento. Apesar da adição de 15mg de zinco no suplemento não influenciou significativamente a absorção de zinco, esta forneceu 3mg a mais de zinco absorvido por dia, quantidade suficiente para atender à demanda gestacional. Conclui-se então que a inclusão de zinco nos suplementos pré-natais pode minimizar a interação entre ferro e zinco em populações com deficiência destes nutrientes. Enquanto a suplementação de ferro parece exercer efetivamente uma inibição na absorção do zinco (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Peres *et al.*, (2001), avaliaram a influência da relação ferro e zinco e da deficiência de ferro na absorção do zinco em ratos. Acima da razão molar de 2:1 houve inibição da absorção do zinco em grupos de ratos normais e com deficiência de ferro, revelando que a inibição da absorção do zinco pelo ferro não depende somente de suas quantidades, mas também do estado nutricional do indivíduo.

Todavia estudos com alimentos fortificados não têm chegado aos mesmos resultados, LOBO E TRAMONTE (2004) verificaram a influência da fortificação de fórmulas infantis com ferro em duas concentrações (10,2mg L⁻¹ e 2,5mg L⁻¹) sobre a absorção de elementos traços, mais especificamente o zinco, e não reportaram diferença na absorção deste mineral em crianças de 43 dias a 1 ano e 2 meses de idade

Davidsson *et al.* (1995) em estudo realizado com adultos onde foram utilizados três diferentes alimentos fortificados (cereal infantil com 500mg de ferro

por Kg; pão de trigo com 65mg de ferro por kg e uma fórmula infantil com 12mg de ferro por litro), também não indicou diferença na absorção do zinco em relação a absorção quando da ingestão de alimentos não fortificados.

Os resultados controversos apresentados, podem ser explicados pelo emprego de diferentes metodologias (LOBO E TRAMONTE, 2004) e devem ser consideradas as possíveis interações entre os minerais no uso de suplementos ou de alimentos fortificados (PEDROSA E COZZOLINO, 1993).

2.4. Fortificação de alimentos com ferro

A fortificação de alimentos com vitaminas e minerais de grande consumo, visa garantir a ingestão diária recomendada, sendo este um procedimento eficaz na prevenção da deficiência de vários micronutrientes, como ácido fólico e ferro (BROGNOLI, 2008).

A obrigatoriedade legal de se adicionar ferro às farinhas de trigo visa garantir um suprimento adequado do mineral, importante na prevenção da anemia ferropriva. Para as indústrias processadoras de farinhas, a adição do nutriente é um desafio e um esforço para atender às exigências da lei e desta forma, contribuir para a diminuição da incidência dessa patologia decorrente da deficiência de ferro que é hoje considerada problema de saúde pública. Aliando-se a importância do ferro no organismo humano, a fortificação de alimentos juntamente com as devidas orientações nutricionais, pode vir a solucionar o problema da ingestão deficiente desse nutriente.

Um aspecto fundamental na fortificação de alimentos é a escolha do veículo alimentar. Para que um alimento possa ser um veículo potencial de fortificação, deve ser de baixo custo, de alto consumo pela população alvo e ter um consumo padrão constante com baixo risco de excesso (FAO, 1996).

Resultados obtidos em estudos realizados por VASCONCELOS *et al.*, (2008) sobre fortificação de alimentos com ferro, mostraram que aqueles que contêm a farinha de trigo, como ingrediente, são considerados veículos apropriados para a fortificação com esse mineral. O pão, em particular, é um ótimo exemplo, pois mesmo tendo uma vida útil menor por causa da deterioração

organoléptica devido as propriedades pró-oxidantes do ferro ainda é melhor em comparação a outros alimentos com maior teor de lipídios e vida útil mais longa (HANSEN *et al.*, 2005)

No Brasil, o ministério da Saúde determinou que os alimentos enriquecidos ou fortificados prontos para consumo devem conter, em 100 mL, no mínimo 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) e, em 100g, no mínimo 30% da IDR para vitaminas e/ou minerais (Brasil, 1998).

A fortificação de alimentos para o consumo humano é uma estratégia importante para melhorar a qualidade nutricional da população (BOEN *et al.*, 2008) e tem como objetivo reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou vários nutrientes (ANVISA, 2006).

De acordo com a Tabela de Composição de Alimentos (TACO, 2006) o teor de ferro naturalmente presente em farinha de trigo é de 1,0mg/100g. Segundo estudo realizado por BOEN *et al.*, (2007) a concentração de ferro em farinhas de trigo variou de 4,1 a 10,0mg/100g (7,3mg/100g em média). Esta média está acima dos valores declarados pelos fabricantes e indicados na Resolução 344 de 2002 (4,2mg/100g). Além disso, os altos valores encontrados para a concentração de ferro nas amostras analisadas também são preocupantes, devido às propriedades oxidantes do ferro (BOEN *et al.*, 2007), que podem promover o surgimento de diversas doenças relacionadas a processos oxidativos.

Outro aspecto importante está relacionado com os resultados obtidos em estudos epidemiológicos que poderiam ser prejudicados, já que a concentração do mineral nas amostras avaliadas está acima dos níveis esperados. Por tanto, a correlação da fortificação de farinhas com a possível diminuição da incidência de anemia, provocada pela carência de ferro, poderá levar a conclusões equivocadas, já que a concentração do mineral nas farinhas está, em média, superior ao valor indicado pela legislação (BOEN *et al.*, 2007).

Apesar do trabalho publicado por BOEN *et al.*, 2007 concluir que as farinhas de trigo apresentam teor de ferro muito superior ao esperado, ASSUNÇÃO *et al.*, (2007) verificaram em seus estudos realizados em Pelotas, RS em 2007, com crianças menores de 6 anos, com uma série temporal com 3

avaliações a cada 12 meses, que não foram observados alterações nos níveis de hemoglobina das crianças estudadas, o que pode ser parcialmente explicado pelo consumo insuficiente de farinhas e/ou pela baixa biodisponibilidade do ferro adicionado, ou ainda, pela ingestão habitual de alimentos ricos em inibidores da absorção de ferro.

Outro estudo realizado por HANSEN *et al.*, (2005) em mulheres, analisadas no período de 5 meses com a utilização de pão de centeio fortificado com ferro por um grupo (aumento de 62% de ingestão diária de ferro) e pão de centeio sem fortificação por outro grupo, não apresentou alteração no nível de ferro nas mulheres estudadas com o pão fortificado, sendo sugerido que a composição da dieta das voluntárias contribuíram para esta falta de resposta.

Entretanto, além do Brasil, outros países como Canadá, Reino Unido, Estados Unidos, Dinamarca e Suécia (LYNCH, 2005) praticam a fortificação de farinhas com ferro, e alguns trabalhos que tiveram experiências positivas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Impactos da fortificação de alimentos com ferro

País	Alimento fortificado	Resultado	Referência
Chile	leite (sulfato ferroso)	redução da anemia	HERTRAMPF <i>ET AL.</i> , 1990
Guatemala	açúcar (FeNaEDTA)	redução da anemia	VITERI <i>ET AL.</i> , 1995
Venezuela	farinhas e trigo e milho (fumarato ferroso)	redução da anemia	LAYRISSE <i>ET AL.</i> , 1996
Indonésia	balas (ferro elementar)	redução da anemia	SARI <i>ET AL.</i> , 2001
Sri Lanka	farinha de trigo (ferro eletrolítico ou reduzido)	nenhuma consequência	NESTEL <i>ET AL.</i> , 2004
África do Sul	Pão (ferro eletrolítico e ferro bisglicina quelado)	redução da anemia para o grupo que recebeu ferro bisglicina	VAN STUIJVENBERG <i>ET AL.</i> , 2006

Fonte: Impacto da fortificação de alimentos com ferro sobre o predomínio da anemia (Soeiro *et al.*, 2009).

2.5. Consumo de farinhas e pães fortificados

Segundo pesquisa do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) realizada no período de 2008-2009 o consumo de pão industrializado no Brasil foi de 0,855 kg per capita anual, onde 1,4Kg na região Sudeste; 1,1; 0,5; 0,15; 0,16 Kg nas regiões Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste respectivamente (IBGE, 2008-2009).

No Brasil em 2005, os produtos de panificação, dentre eles o pão, ocupavam a terceira colocação na lista de compras do brasileiro, que destinou, em média, 12% do orçamento familiar para alimentação (ABIP, 2005).

De acordo com pesquisa do Sindicato da Indústria de Panificação e Confeitaria de São Paulo (SINDIPAN), em 2008 observou-se um aumento no consumo de pão para 29 Kg per capita (SINDIPAN, 2008). E em 2009 os pães industrializados já representavam 4% dos pães que são consumidos no Brasil (ABIP, 2009).

O segmento de panificação e confeitaria no Brasil em 2011 apresentou um faturamento de R\$ 63 bilhões (ABIP, 2012).

Assim o alto o consumo de pão pela população brasileira, associado à fortificação de farinhas, proporciona grande potencial para maior ingestão de ferro (KAJISHIMA, *et al.*, 2001).

3. Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto.

4. Referências Bibliográficas

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Análise do mercado de pães, 2002/2003, **2005**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em 01/06/2005.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Pães Consumidos no Brasil, **2009**. Disponível em: <http://www.abip.org.br/perfil> . Acesso em 21/05/2012.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Panificação fatura R\$ 63 bilhões em 2011, **2012**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em: 11/05/2012

AGGET, P.J.; Comerford, J.G. Zinc in human health. *Nutr Rev.*;53:16-22S, **1995**.

AMESTY, V.A.; Pereira, M.; Nuñez, G.J.R; García, D.; Vicente, V.M.; Granadillo, V. Concentraciones séricas de zinc em niños com diferentes grados de déficit nutricional. *Invest Clin*;47:349-59, **2006**

ANDREWS, N. Iron Metabolism: Iron deficiency and Iron Overload. *Annu Rev. Genomics Hum Genet*;1:75-98, **2000**.

ANTUNES, M.F.R. Interação competitiva do zinco e do ferro após administração oral e venosa de zinco em crianças eutróficas. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rio Grande do Norte, **2010**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria RDC nº 90, de 17 de outubro de 2000. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78pao.htm. Acesso em: 11/05/2012

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. Disponível em: www.anvisa.org.br. Acesso em 01/11/2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 269, **2005**. Disponível em: www.anvisa.org.br. Acesso em 01/12/2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2006**. Legislação em Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis. Acesso em 01/11/2009.

ASSUNÇÃO, M.C.F.; Santo, I.S.; Barros, A.J.D.; Gigante, D.P.; Victora, C.G. *Rev. Saúde. Públ.* ; 41(4): 1-10, **2007**

AUST, S.D.; Miller, D.M. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. In Probst GS, Vodcnik MJ, Dorato MA (eds): *New horizons in molecular toxicology: a*

symposium. Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology; May, 29-34, **1991**.

BAQUI, A.H.; Black, R.E.; EL, A.S.; Yunus, M.; Chakraborty, J.; Ahmed S.; Vaughan J.P. Effect of zinc supplementation started during diarrhoea on morbidity and mortality in Bangladeshi children:community randomized trial. *BMJ*; 9;325(7372):1059, **2002**.

BARBOSA, L.F.; Medeiros M.H.G.; Ohara, A. *Quím. Nova*; 29 (6):1352-1360 **2006**.

BHATNAGAR, S.; Natchu U.C. Zinc in child health and disease. *Indian J Pediatr*;71:991-5, **2004**.

BEARD, J.L. *J.Nutr.*, 131: 568S-579S, **2001**.

BIANCHI, M.L.P.; Antunes, M. .G. *Rev. Nutr*; 12(2): 123-130, **1999**.

BOEN, T.R.; Soeiro, B.T.; Pereira-Filho, E.R.; Lima-Pallone, J.A. *Rev. Bras. Cienc. Farmac.*; 43(4): 589-596, **2007**.

BOEN, T.R.; Soeiro, B.T.; Pereira-Filho, E.R., Lima-Pallone, J.A. *J. Braz. Chem. Soc.*; , 19(1): 53-59, **2008**.

BODIGA, S.; Krishnapillai, M.N. Concurrent repletion of iron and zinc reduces intestinal oxidative damage in iron and zinc deficient rats. *World J Gastroenterol*;13:5707-17 **2007**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 33 de 13 de jan. de 1998. Ingestão diária Recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 13 de jan.*; . p. 2, **1998**.

BROGNOLI, A.F. *Gestação: Anemia ferropriva, deficiência de folato versus fortificação alimentar. Cadernos da escola da saúde e nutrição*, 1:1-7, **2008**.

CGPAN/MS - Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição, 2ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial de Alimentos, Brasília - DF fevereiro de **2007**.

COZZOLINO, S.M.F. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. 1. ed. São Paulo: Manole; v. 1. p. 878, **2005**

CUNHA, D.F.; Cunha, S.F.C. *Microminerais: In: Dutra-de Oliveira JE & Marchini JS. Ciências Nutricionais*. Sarvier; São Paulo, p. 141-165, **1998**.

DALLMAN, P. *Iron. Present knowledge in nutrition*. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. **1990**.

DAVIDSSON, L.; Almgren, A.; Sandström, B.; Hurrell, R.F. Zinc absorption in adult humans: the effect of iron fortification. *Br J Nutr*; 74(3):417-25, **1995**.

EL-DASH, A.; Camargo, C.O.; Diaz, N.M. Fundamentos da Tecnologia de panificação. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, p. 350, 1983.

ESTELLER, M.S. Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento. São Paulo, p. 248 Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), **2004**,

FAIRWEATHER-Tait, S.J.; Wharf S.G.; Fox T.E. Zinc absorption in infants fed iron-fortified weaning food. *Am J Clin Nutr*; 62:785-9 **1995**.

FAO - Food and Agriculture Organization. Food Fortification: technology and quality control. Report of an FAO Technical Meeting, Rome, 20-23; 1995. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: FAO; **1996**.

FERREIRA, A.F.A.; Matsubara L.S. *Rev. Ass.Med.*; 43(1): 61-68 **1997**.

FERRAZ, I.S.; Daneluzzi, J.C.; Vannuchi, H.; Jordão, Jr A.A.; Ricco, R.G.; Del Ciampo, L.A. Nível sérico de zinco e sua associação com deficiência de vitamina A em crianças pré-escolares. *J Pediatr (Rio J)* ;83:512-7 **2007**.

FLYNN, A.; Moreiras, O.; Stehle, P.; Fletcher, R.J.; Muller, D.J. Roland Vitamins and Minerals: A model for safe addition to foods. *European Journal of Nutrition*, 42: 118-130, **2003**.

GAITHER, L.A.; Eide D.J. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J. Biol Chem.* ;276:22258-64, **2001**.

GERMANI, R.; Aschieri, J.L.R.; Silva, F.T.; Torrezan, R.; Lins.; Silva, K. Netto; A.G.; Nutti, M.R. Manual de fortificação de farinha de trigo. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, **2001**

GIBSON, R.S. Assessment of trace-element status. In: Gibson RS, editor. *Principles of nutritional assessment*. New York: Oxford University Press;. p. 511-53, **1990**.

GOLDEN, M.H.N. The diagnosis of zinc deficiency. In: MILLS CF, editor. *Zinc in human biology*. New York: Springer/Verlag; p. 322-33 **1989**.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, New York, v.52, n.8, p.253-265, **1994**.

HAMBIDGE, K.M.; Casey, C.E.; Krebs N.F. Zinc. In: Mertz W, editor. Trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Orlando: Academic Press; v. 2; p. 1-137, **1986**.

HAMBIDGE, K.M. Mild zinc deficiency in human subjects. In Nukksm CF, editor. Zinc in human biology. New York: Springer/Verlag; p. 281-96, **1989**.

HANSEN, M.; Baech, S.B.; Thomsen, A.D.; Tetens, I.; Sandstrom, B. Long-term intake of iron fortified wholemeal rye bread appears to benefit iron status of young women. Jour. of Cereal Science 42: 165-171, **2005**.

HEALTH, A.L.; Fairweather-TAIT, S. J. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. Best Practice & Research Clinical Haematology, 15(2): 225-241 **2002**.

HURRELL, R.F. Nutr. Rev.; 55: 210-222, **1997**.

HURRELL, R.F.; Reddy M.; Cook J.D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. British of Journal Nutrition 81: 289-295, **1999**.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **2008-2009**. População. Indicadores sociais. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 02/05/2012.

JACKSON, M.J. Physiology of zinc: general aspects. In: Mills C F, editor. Zinc in human biology. London: springer-Verlag; p. 323-33, **1989**.

JAMESON, S. Zinc status in pregnancy: the effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity, and placental ablation. Ann NY acad Sci.; 15;678:178-92, **1993**.

KAJISHIMA, S.; Pumar M.; Germani R. Elaboração de pão francês com farinha enriquecida de sulfato de cálcio. B. CEPPA, Curitiba, v. 19 n. 2, p. 157-168, jul/dez. **2001**.

KING, J.C.; Turnlund, J.R. Human Zinc Requirements. In: MILLS CF. Zinc in human biology. 1 ed. London:Springer-Verlag; pp. 335-50, **1989**.

KORDAS, K.; Stoltzfus, R.J. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. J Nutr. ;134:1295-8, **2004**.

LEE, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 5^o edição. Editora Edigar Blucher, Ltda. São Paulo, p. 381, 425, **2001**.

LIND, T.; Lönnerdal B.; Stenlund, H.; Ismail D.; Seswandhana, R.; Ekstrom, E.C.; Persson L.A. A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *Am J Clin Nutr.*; Apr;77(4):883-90, **2003**.

LOBO, A.S.; Tramonte V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Rev. Nutr., Campinas*, 17(1):107-113, jan/mar., **2004**.

LÖNNERDAL, B. Intestinal absorption of zinc. In: Mills CF. *Zinc in Human Biology*. 1st ed. London:Springer-Verlag; p. 33-55, **1989**.

LÖNNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr.*; 130 (Suppl5):1378-83S, **2000**.

LYNCH, S.R. *Best Prac. Res. Clin. Hemat.*; 18(2): 333-346, **2005**.

MACEDO, E.M.C.; Amorim, M.A.F.; Silva, A.C.S.; Castro, C.M.B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. *Rev. Paul Pediatr.*; ;28(3):329-36, **2010**.

McMAHON, R.J.; Cousins R.J. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci USA*;95:4841-6, **1998**.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M. The importance of zinc in human nutrition. *Rev. Nutr.* ;17:7987, **2004**.

MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T.; KRAUSE. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 8. ed. São Paulo: Roca; p. 957, **2002**.

MAHAN, L.K.; Escott-Stump, S.K.: *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 11 ed. São Paulo: Roca, **2005**.

MILLS, C.F, editor. *Zinc in human biology*. New York: Springer-Verlag; **1989**.

MIRET, S.; Simpson, R.J.; Mckie, A.T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annual Review of Nutrition*, 23: 283-301, **2003**.

MOCCHIGIANI, E.; Muzzioli, M.; Giacconi, R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci*; 205-8, **2000**.

NUNES, C.N. Modificações enzimáticas em pães brancos e pães ricos em fibras: impactos na qualidade. Tese mestrado *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.18 , **2008**.

O'BRIEN, K.O.; Zavaleta, N.; Caulfield, L.E.; Wen, J.; Abrams, S.A. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant peruvian women. *J Nutr.*; 130(9):2251-5, **2000**.

OKIGAMI, H. J. *Biomolec. Med. Free Rad.* vol. 2, Nº 2, **1996**.

OLIVARES, M.; Pizarro, F.; Ruz, M. Zinc inhibits nonheme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res.*; 117:7-14, **2007**.

OPPENHEIMER, S.J. *J. Nutr.*; 131, 616S-635S, **2001**.

OWENS, W.G. *Cereals processing technology*. Satake Centre for Grain Process Engineering, University of Manchester Institute of Science and Technology, Cambridge: Woodhead Publishing, p. 256, **2001**.

PEDROSA, L.F.; Cozzolino, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v.27, n.4, p.266-270, **1993**.

PEREIRA, T.C.; Hessel, G. Deficiência de zinco em crianças e adolescentes com doenças hepáticas crônicas. *Rev. Paul Pediatr.*; 27(3):322-8, **2009**.

PERES, J.M.; Bureau, F.; Neuville, D.; Arhan, P.; Bougle, D. Inhibition of zinc absorption by iron depends on their ratio. *J Trace Elem Med Biol.*; 15(4): 237-41, **2001**.

PIERRE, J.L.; Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry *BioMetals*;12:195-199, **1999**.

PIZZINATO, A.; MAGNO, C.P.R.S.; Campagnolli, D.M.F. Avaliação e Controle de Qualidade de Farinha de Trigo. Instituto de Tecnologia de Alimentos - Centro de Tecnologia de Farinhas e Panificação, p. 49 Campinas, **2004**.

POMPELLA, A. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v.67, n.5, p.289-297, **1997**.

POULSEN, H.E.; Prieme, H.; Loft, S. *Eur. J. Cancer Prev.*; 7(1):9-16 **1998**.

PÓVOA Filho, H. *Radicais livres em patologia humana*. Ed. Imago. **1995**.

PRASAD, A.S.; Miale, A. Jr.; Farid, Z.; Sandstead, H.H.; Schultert, A.R. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med*;61:537-49, **1963**.

RAY, Y. Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. **2002**.

ROCHA, D.S. Estado nutricional e prevalência de anemia em crianças que freqüentam creches em Belo Horizonte, Minas Gerais. Revista Paulista de Pediatria, São Paulo, 26(1): 6-13, **2008**.

RODRIGUEZ-Matas, M.C.; Lisbona, F.; Gomez-Ayala, A.E.; Lopez, A.I.; Campos, M.S. Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. Lab Anim; 32(3):298-306, **1998**.

SACHER, A.; Cohen, A.; Nelson, N. Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. J Exp Biol. ;204:1053-61, **2001**.

SANDSTRÖM, B.; Davidsson, L.; Cederblad, A.; Lönnerdal, B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. J Nutr; 115:411-4, **1985**.

SILVA, A.P.R.; Camargos, C.N. Fortificação de alimentos: instrumento eficaz no combate a anemia ferropriva? Comunicação em Ciências da Saúde, Brasília, 17(1): 47-52, **2006**.

SILVA, D.G.; Priore, S.E.; Franceschini, S.C.C. Fatores de risco para anemia em lactentes atendidos nos serviços públicos de saúde: a importância das práticas alimentares e da suplementação com ferro. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, 83(2): 149-156, mar./abr. **2007**.

SINDIPAN, **2008**. Disponível em, <http://www.sindipan.org.br/asp/consumoDePao.asp>. Acesso em 09/03/2010.

SKIKNE, B.; Baynes, R.D. - Iron absorption. In: Brock, J.H.; Halliday, J.W.; Pippard, M.J.; Powell, L.W. - Iron metabolism in health and disease. London, W.B. Saunders, p.152-87, **1994**.

SOEIRO, B.T.; Boen, T.R.; Wagner, R.; Lima-Pallone, J.A. Physico-chemical quality and homogeneity of acid folic and iron in enriched flour using principal component analysis. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1-13, **2009**.

SOLOMONS, N.W. Competition mineral-mineral interaction in the intestine: implications for zinc absorption in humans. In: Inglett, G.E. ed. Nutritional bioavailability of zinc. Washington, American Chemical Society; p. 247-72, **1983**.

SOLOMONS, N.W. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. J. Nutr., 116: 927-35, **1986**.

SREEDHAR, B. Conflicting evidence of iron and zinc interactions in humans: does iron affect zinc absorption? *Am J Clin Nutr.*; 78:1226-7, **2003**.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **2006**. Disponível em [.unicamp.br/nepa/taco](http://unicamp.br/nepa/taco). Acesso em 15/02/2010.

VASCONCELOS, I.A.L.; Cortes, M.H.; Coitinho, D.C. *Rev. Nutr., Campinas*, 21(2):149-160, mar/abr., **2008**.

WADA, O.; Yanagisawa, H. *J Pharm Soc Jpn.*;124(Suppl 1):25-29, **2004**.

WALKER, C.F.; Kudas, K.; Stoltzfus, R.J.; Black, R.E. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am J Clin Nutr.*; 82:5-12, **2005**.

WHITTAKER, P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr.*; 69:442S-6S, **1998**

WIERINGA, F.T.; Dijkhuizen, M.A.; West, C.E. Iron and zinc interactions. *Am J Clin Nutr.* ;80:787-8 **2004**.

WINTERGERST, E.S.; Maggini, S.; Horning, D.H. *Annals Nutr. Metab.*; 51, 301-323, **2007**.

WILLIAMS, S.R. *Fundamentos de nutrição e dietoterapia*. Porto Alegre: Artmed Editora; p. 668, **1997**.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr.*; 1309(Suppl 5):1350-4S, **2000**.

WORWOOD, M. Regulação do metabolismo do ferro. *Anais Nestlé*; 52:1-10, **1996**.

YANAGISAWA, H.; Nodera, M. zinc physiology and clinical practice. *Biomed Res Trace elements*;18(1):3-9, **2007**.

YANAGISAWA, H. Zinc deficiency and clinical practice: validity of zinc preparation. *Yakugaku Zasshi*; 128:333-9, **2008**.

ZIJP, I.M.; Korver, O.; Tijburg, L.B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 40(5): 371-98, **2000**.

ARTIGO 2

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS) PARA AVALIAÇÃO DE FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS

Grasiela de Souza Costa da Silva e Juliana A. L. Pallone
Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

RESUMO

O pão é um alimento considerado popular na dieta dos brasileiros e é apreciado devido ao seu sabor, preço e sua disponibilidade em milhares de padarias e supermercados do País, sendo consumido na forma de lanches ou com refeições. Por isto torna-se necessário uma avaliação sobre o teor de ferro presente nos pães, já que estes são elaborados com farinhas fortificadas desde 2004 e apesar de todos os benefícios do consumo de ferro seu excesso pode, dentre outros danos, interferir na razão molar Fe:Zn (4:1) prejudicando o aproveitamento destes minerais pelo organismo. Os métodos para avaliação desses nutrientes devem ser adequados e validados a fim de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre seus resultados. Assim o objetivo deste trabalho foi validar parcialmente uma metodologia por Espectrometria de Absorção Atômica de Chama para análise de ferro e zinco em pães industrializados. A validação foi realizada em um único laboratório (single-laboratory validation). Para determinação de ferro e zinco as amostras foram mineralizadas com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Os resultados da validação parcial da metodologia na determinação de ferro e zinco como linearidade apresentou com coeficiente de correlação de 0,9994 para ferro e 0,9996 para zinco. A precisão apresentou um coeficiente de variação para ferro e zinco menor que 6%. Para a análise de exatidão a faixa de recuperação foi entre 91 a 109% para ferro e 87 a 108% para zinco. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,04 e 0,15 mg L⁻¹ para ferro e 0,07 e 0,24 mg L⁻¹ para zinco, foram satisfatórios. Os resultados da validação parcial mostraram que o método escolhido é eficiente e preciso para determinação de ferro e zinco através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) nas matrizes estudadas.

Palavras-chave: pão, ferro, zinco, validação, FAAS.

ABSTRACT

Bread is considered a popular food in the diet of Brazilians and is appreciated for its taste, price and availability on thousands of bakeries and supermarkets in the country, being consumed as snacks or with meals. Therefore it is necessary to an evaluation of the amount of iron present in the bread, as these are made with fortified flour since 2004 and despite all the benefits of their excess iron intake can, among other damage, interfere with the molar ratio Fe:Zn (4:1) affecting the utilization of these minerals by the body. Methods for evaluation of these nutrients must be adequate and validated in order to generate reliable and interpretable information about their results. Thus the aim of this work was validate partially a methodology to analyze iron and zinc in industrialized breads using Atomic Absorption Spectrometry Flame. The validation was performed in a single laboratory (single-laboratory validation). For determination of iron and zinc samples were mineralized with nitric acid and hydrogen peroxide. The results showed linearity with a correlation coefficient of 0,9994 to 0,9996 for iron and zinc determination, respectively, in this partial validation methodology. The accuracy showed a coefficient of variation for iron and zinc less than 6%. For the analysis of the recovery range accuracy is between 91-109% iron and 87 to 108% zinc. The limits of detection and quantification were 0,04 and 0,15 mg L⁻¹ for iron and 0,07 and 0,24 mg L⁻¹ for zinc, were satisfactory. The results showed that partial validation of the chosen method is efficient and accurate determination of iron and zinc through the technique of atomic absorption spectrometry with flame (FAAS) in the matrices studied.

Keywords: bread, iron, zinc, validation, FAAS.

1. Introdução

O pão pode ser considerado um produto popular, sendo consumido na forma de lanches ou com refeições. Ele é apreciado devido ao seu sabor, preço e sua disponibilidade em milhares de padarias e supermercados do País (ESTELLER, 2004). O segmento de panificação e confeitaria no Brasil em 2011 apresentou um faturamento de R\$ 63 bilhões (ABIP, 2012).

Os produtos de panificação ocupam a terceira colocação na lista de compras do brasileiro, representando, em média, 12% do orçamento familiar para alimentação (ABIP, 2005).

No Brasil, a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. Para cada 100g de farinhas de milho ou trigo deve haver 150µg de ácido fólico e 4,2mg de ferro no mínimo (ANVISA, 2002).

Contudo a população consome os produtos em que são adicionadas as farinhas e outras fontes que estão sendo enriquecidas, com isto o objetivo deste trabalho foi validar parcialmente uma metodologia para determinação de ferro e zinco em pães industrializados, os quais utilizam as farinhas em suas formulações.

O ferro está presente em todas as células do corpo, sendo um componente essencial de muitas proteínas, como por exemplo, hemoglobina, mioglobina, transferrina, lactoferrina, ferritina e hemossiderina. Assim, as funções mais importantes do ferro estão ligadas às funções destas proteínas no organismo, como transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina, onde dois terços de ferro são encontrados nos eritrócitos e na mioglobina, que ajuda no fornecimento de oxigênio aos músculos. O ferro ainda participa de enzimas importantes para o organismo, como na catalase, que age na redução do peróxido de hidrogênio, principalmente quando este é formado em grande quantidade também na cadeia de inibição de radicais livres e enzimas que auxiliam as reações bioquímicas (CUNHA E CUNHA, 1998; MIRET *et al.*, 2003; COZZOLINO, 2005).

O zinco é considerado o 27º elemento mais abundante na terra e é o metal mais utilizado nos seres vivos e em numerosas enzimas e proteínas que o utilizam como principal sítio de sua atividade biológica. Isto torna o mineral importante em

atividades do sistema imune, pois este tem ação regulatória sobre o sistema imunológico, na prevenção de formação de radicais livres, no crescimento estrutural, no desenvolvimento sexual e cognitivo e na síntese de DNA (GIBSON, 1990; OKIGAMI, 1996; WOOD, 2000; MAFRA E COZZOLINO, 2004; MACEDO *et al.*, 2010). O zinco possui duas propriedades que merecem ser destacadas. A primeira é o metabolismo de absorção, distribuição e excreção que são tão eficientes que não permitem o acúmulo deste metal no organismo. A segunda é que suas propriedades físico-químicas são altamente adaptáveis na associação com diversas proteínas e enzimas com importantes funções biológicas (OKIGAMI, 1996).

A proporção ferro-zinco, normalmente encontrada nos alimentos naturais, varia de 0,5 a 2,0, provavelmente não exercendo influência no processo competitivo, com exceção dos alimentos fortificados (SOLOMONS, 1983).

Segundo PEDROSA e COZZOLINO (1993) uma proporção de Fe-Zn em torno de 4:1 pode ser desfavorável para o aproveitamento do zinco, assim a suplementação com ferro pode comprometer a biodisponibilidade do zinco no organismo humano (PEDROSA E COZZOLINO, 1993; LOBO E TRAMONTE, 2004), já que existe interação competitiva, fundamentada na similaridade química (configuração eletrônica) entre eles (SOLOMONS, 1986; LEE, 2001).

Deste modo torna-se necessário avaliar o teor destes compostos inorgânicos nesse tipo de alimento com a utilização de métodos de análise adequados e validados.

As determinações de ferro e zinco podem ser executadas empregando-se principalmente a espectrometria na região do visível ou a espectrometria atômica.

O uso de ambas as técnicas está condicionada a um preparo prévio de amostras, conhecido como processo de mineralização (KINGSTON *et al.*, 1988). Nesse processo as amostras sólidas sofrem um ataque de ácidos (nítrico, clorídrico ou sulfúrico), em alguns casos, pode ser utilizado o peróxido de hidrogênio. As amostras sólidas, na presença de ácidos, são aquecidas e inicia-se uma decomposição da matéria orgânica com liberação dos metais para o meio líquido. A velocidade da decomposição da matéria orgânica depende da matriz e

quantidade de amostra (PEREIRA-FILHO, 1999). Para análise de ferro e zinco em alimentos a técnica de FAAS pode ser aplicada com excelente desempenho.

Para a escolha de um método de análise é necessário que ele gere informações confiáveis e interpretáveis sobre seus resultados, devendo sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004). A validação do método analítico é a confirmação através de exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BARROS, 2002). O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO *et al.*, 2003). A validação de métodos é um aspecto essencial para a garantia da qualidade analítica (PERES, 2011).

No processo de validação do método analítico alguns parâmetros são avaliados, calculados a fim de demonstrar o desempenho do método, dentre os quais são normalmente aplicados: seletividade; linearidade e faixa linear; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. (BARROS, 2002; ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI *et al.*, 2004). A estratégia a ser adotada para a determinação desses parâmetros depende do propósito e da natureza do método (BRITO *et al.*, 2003).

Para os métodos analíticos destinados à determinação de elementos menores ou traços, os seguintes parâmetros de validação são recomendados pelo INMETRO (2010): precisão, seletividade, recuperação, linearidade, limite de detecção e quantificação.

A precisão representa o grau de variação entre resultados obtidos para uma mesma amostra analisada repetidas vezes em condições idênticas (SARTORATTO, 2006) e pode ser expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio

padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação CV (usualmente expresso em %) é calculado conforme Equação 1 (INMETRO, 2010).

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

No caso da análise da seletividade a matriz da amostra a ser analisada pode conter componentes que interfiram no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito e também pode depender da concentração (INMETRO, 2010).

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2010).

A exatidão pode ser avaliada através de uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2010).

Segundo INMETRO (2010) a recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, e pode ser calculada através da equação (2):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[\frac{C1 - C2}{C3} \right] \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Para o parâmetro de linearidade, que se refere à capacidade do método de produzir resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada (BARROS, 2002), e é obtida por padronização interna ou externa e é dada pela inclinação da curva.

O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido. A suposição clássica do gráfico de calibração é que a resposta instrumental está linearmente relacionada com a concentração do padrão. A linearidade satisfatória do gráfico é quando o coeficiente de correlação da reta (R) obtida é $0,91 < R < 0,99$ (BRITO, *et al.*, 2003).

Outros parâmetros avaliados na validação são os limites de detecção (LD) e o de quantificação (LQ).

O limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO, *et al.*, 2003), indicando assim a concentração mais baixa do elemento que pode ser medida, isto é, que pode ser diferenciada de zero (REGO, 2010). O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas do processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2010).

O limite de detecção pode ser determinado através da equação (3) (Analytical Methods Committee, 1987):

$$LD = 3 \times SD/S \quad (3)$$

SD – desvio padrão do branco

S – coeficiente angular da curva analítica (padrões)

O limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração de um analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis representa o limite de quantificação (LQ). Assim como o LD, pode ter o valor calculado através da equação (4) (Analytical Methods Committee, 1987):

$$LQ = 10 \times SD/S \quad (4)$$

SD – desvio padrão do branco

S – coeficiente angular da curva analítica (padrões)

Segundo a IUPAC (2002), os requerimentos para os métodos analíticos, para análise de alimentos, envolvem um exame das características de desempenho a partir de ensaios interlaboratoriais (laboratórios diferentes). Um número mínimo de laboratórios é exigido para participarem dos estudos interlaboratoriais, preenchendo as exigências para comporem o que a IUPAC classifica como procedimento de validação completa do método analítico (full validation). Entretanto, nem sempre é prático ou necessário realizar a validação completa de um método analítico. Em tais circunstâncias a IUPAC considera adequado o que chama de validação do método em um único laboratório (single-laboratory validation). Essas circunstâncias podem ocorrer quando se pretende garantir a viabilidade do método antes de se proceder à validação completa e/ou como etapa preliminar de um método desenvolvido e na publicação de artigos científicos.

Este trabalho teve como objetivo validar parcialmente um método por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) para análise de ferro e zinco em pães tradicionais e especiais industrializados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produtos analisados

As amostras de pães industrializados (tradicional, integral, 7 grãos, 9 grãos e 12 grãos) foram coletadas aleatoriamente em padarias, mercados e hipermercados na cidade de Campinas.

2.2.1. Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados foram ácido nítrico P.A e peróxido de hidrogênio, ambos marca Synth, Brasil.

Os padrões utilizados foram solução padrão Ferro 1,000 mg/g (PAFE 1000 – 0125 Marca Quimis – High Purity Rastreado SRM 3126a NIST – USA) e solução padrão zinco 1,000 mg/g (PAZN 1000 – 0125 Marca Quimis – High Purity Rastreado SR682 NIST – USA) .

2.2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: o Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo AAnalyst 200, com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo, lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) e zinco (213,86 nm), (Perkin Elmer); balança analítica (Ohaus, modelo AP210-0); banho ultra-sônico (Branson, modelo 1510); bloco digestor (Quimis, modelo M242) e moinho (Ika, modelo A11).

2.2.3. Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente (imersão por no mínimo 6 horas) e enxaguadas com água da torneira até total eliminação de espumas. As vidrarias foram imersas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por, no mínimo, 12 horas. Após esse tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água purificada pelo sistema Milli-Q. A secagem das vidrarias se deu de forma natural, sendo protegidas com papel toalha para evitar poeira e re-contaminações.

2.3. Metodologia

2.3.1 Amostragem

Para validação parcial do método foram escolhidas uma marca de cada tipo de pão (tradicional, integral, 7 grãos, 9 grãos e 12 grãos), onde foram avaliados a precisão e a exatidão, sendo utilizado um lote de cada marca.

De cada embalagem foram retiradas 9 fatias de pão, de regiões diferentes da embalagem.

2.3.2. Mineralização das amostras

Inicialmente, as amostras a serem analisadas foram moídas e homogeneizadas. Pesou-se cerca de 0,6000g de cada uma, em tubos de digestão medindo, aproximadamente, 20 cm de comprimento. A seguir, adicionou-se cerca de 8 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Foram preparados, também, dois tubos “branco” (sem as amostras). Logo após, foram colocados na entrada de cada tubo de digestão pequenos funis, para que o ácido nítrico ficasse em refluxo, sendo o conjunto levado para bloco digestor onde foram aquecidos por 30 minutos a uma temperatura de 50°C. Decorrido este tempo, a temperatura foi aumentada para 100°C, por mais 30 minutos e na sequência à 130°C por mais 3 horas. Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco e aguardou-se o resfriamento à temperatura ambiente. Adicionou-se uma pequena quantidade de água (5 mL) aos tubos de digestão. Posicionou-se os tubos em um banho de ultrassom por 5 minutos.

Transferiu-se o conteúdo dos tubos para balões volumétricos de 50 mL e completou-se o volume com água deionizada.

2.3.3. Determinação Quantitativa de Ferro e Zinco

A determinação quantitativa de ferro e zinco foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica com chama em aparelho da marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200, onde as amostras foram introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar ($2,5 \text{ L.h}^{-1}$) e acetileno (10 L.h^{-1}) com temperatura de, aproximadamente, 2000°C.

Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) e zinco (213,86nm), com metodologia validada parcialmente. Os resultados das análises foram expressos em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$.

2.3.4. Curvas analíticas de ferro e zinco por FASS

Foram construídas curvas de calibração para a obtenção de equações que correlacionam a absorbância medida com a concentração em $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de ferro e zinco presentes na amostra. As curvas consistiram de seis pontos e as concentrações utilizadas foram 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para ferro e 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para zinco.

2.3.5. Repetitividade

As amostras de pães foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.2, em sete repetições independentes, seguindo recomendação do INMETRO (2010).

2.3.6. Exatidão por taxa de recuperação

A recuperação foi avaliada adicionando-se diretamente nas amostras de pão, antes da mineralização, o equivalente a 50 mg L^{-1} de solução padrão de ferro e zinco. Após esta adição procedeu-se, conforme método descrito no item 2.3.2.

O valor adicionado correspondia a 100% do valor total de ferro e zinco encontrado em pães.

2.3.7. Sensibilidade: limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) foi determinado através da equação (5):

$$\text{LD} = 3 \times \text{SD}/\text{S} \quad (5)$$

SD – desvio padrão do branco

S – coeficiente angular da curva analítica (padrões)

O limite de quantificação (LQ) foi determinado através da equação (6):

$$\text{LQ} = 10 \times \text{SD}/\text{S} \quad (6)$$

SD – desvio padrão do branco

S – coeficiente angular da curva analítica (padrões)

2.4. Análise Estatística

Foram realizados testes estatísticos que incluíram análise de variância, ANOVA ao nível 95% de confiança, para os teores de ferro e zinco em amostras de marcas e lotes diferentes com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre os resultados obtidos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Validação do Método de Análise de Ferro e Zinco por FAAS em pães industrializados

O método para determinação do teor de ferro e zinco por FAAS são classificados como análise de elementos menores ou traços. Assim, os parâmetros de validação do método escolhido foram os recomendados pelo INMETRO (2010): linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.1.1. Linearidade

Na tabela 1 estão os valores de absorvância para cada concentração da solução padrão de ferro para construção da curva de calibração.

Na tabela 2 estão os valores obtidos por análise estatística ANOVA, ao nível 95% de confiança.

A figura 1 representa a curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do elemento ferro nas amostras de pães industrializados.

Tabela 1: Valores de absorvância para cada concentração de solução padrão de ferro avaliada para a construção da curva de calibração:

Concentração (mg.L ⁻¹)	Absorvância						Média	Desvio Padrão	C.V.*
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6			
0,2	0,0109	0,0109	0,0118	0,0105	0,0116	0,0107	0,011	0,001	4,666
0,3	0,0151	0,0165	0,0173	0,0154	0,0173	0,0157	0,016	0,001	5,920
0,5	0,0254	0,0263	0,0290	0,0260	0,0286	0,0262	0,027	0,001	5,562
0,7	0,0358	0,0368	0,0400	0,0365	0,0404	0,0369	0,038	0,002	5,176
1,0	0,0520	0,0535	0,0591	0,0528	0,0593	0,0540	0,055	0,003	5,868
1,5	0,0766	0,0784	0,0857	0,0754	0,0846	0,0782	0,080	0,004	5,373

* CV = coeficiente de variação

Tabela 2: Análise estatística ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,000126	5	2,52E-05	0,037282	0,999167	2,533555
Dentro dos grupos	0,02024	30	0,000675			
Total	0,020366	35				

Os resultados obtidos pela análise estatística demonstraram não existir diferença significativa entre os valores encontrados, já que o F calculado foi menor que o tabelado.

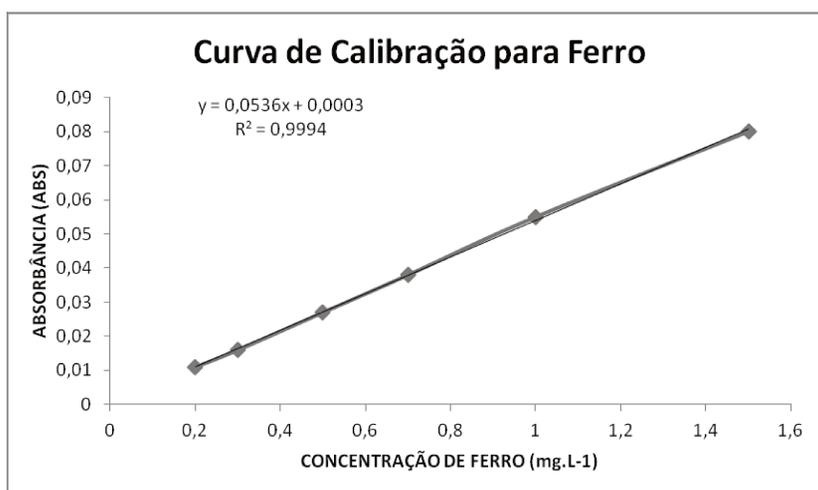


Figura 1: Curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do elemento ferro nas amostras de pães industrializados.

A porcentagem de variação ($R^2=99,94\%$) da curva mostra que a faixa linear escolhida para o trabalho é bastante confiável para avaliar o conteúdo de ferro nas amostras.

Na tabela 3 estão os valores de absorvância para cada concentração da solução de zinco para construção da curva de calibração.

Na tabela 4 estão os valores obtidos por análise estatística ANOVA, ao nível 95% de confiança.

A figura 2 representa a curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do elemento zinco nas amostras de pães industrializados.

Tabela 3: Valores de absorvância para cada concentração de solução padrão de zinco avaliada para a construção da curva de calibração:

Concentração (mg.L ⁻¹)	Absorbância						Média	Desvio Padrão	C.V.* (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6			
0,2	0,0689	0,0588	0,0606	0,0651	0,0653	0,0659	0,064	0,004	5,798
0,3	0,1011	0,864	0,0892	0,0971	0,1013	0,1004	0,096	0,007	6,805
0,4	0,1342	0,1156	0,1195	0,1247	0,1307	0,1279	0,125	0,007	5,559
0,6	0,1903	0,1674	0,1702	0,1844	0,1949	0,1883	0,183	0,011	6,153
0,8	0,2497	0,2223	0,2277	0,2402	0,2548	0,2488	0,241	0,013	5,430
1,0	0,3066	0,2749	0,2783	0,2950	0,3140	0,3033	0,295	0,016	5,346

* CV= coeficiente de variação

Tabela 4: Análise estatística ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,06628	5	0,013256	0,625303	0,681673	2,533555
Dentro dos grupos	0,63598	30	0,021199			
Total	0,70226	35				

Novamente, os resultados obtidos pela análise estatística demonstraram não existir diferença significativa entre os valores encontrados, já que o F calculado foi menor que o tabelado.

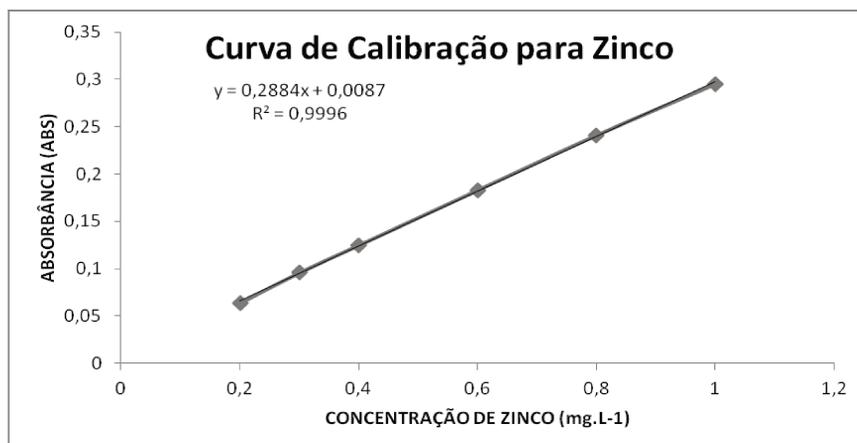


Figura 2: Curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do elemento Zinco nas amostras.

A porcentagem de variação ($R^2=99,96\%$) da curva mostra que a faixa linear escolhida para o trabalho é bastante confiável para avaliar o conteúdo de ferro e zinco nas amostras.

3.1.2. Precisão: repetitividade

As amostras de pães foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.2. e 2.3.3, respectivamente, em sete repetições independentes, seguindo recomendação do INMETRO (2010) a fim de verificar a repetitividade do método analítico.

Os valores obtidos para o ensaio de repetitividade para o teor de ferro estão apresentados nas Tabelas de 5, 8 e 11 e nas Tabelas 6, 7, 9, 10 e 12 encontram-se os valores obtidos pela análise estatística ANOVA ao nível 95% de confiança.

Tabela 5: Resultados para ensaio de repetitividade de ferro em pão tradicional e integral ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)

pão tradicional	1 dia	2 dia	3 dia	pão integral	1 dia	2 dia	3 dia
	0,91	0,89	0,82		1,86	1,83	1,88
	0,84	0,84	0,81		1,82	1,86	1,84
	0,85	0,87	0,83		1,89	1,78	1,8
	0,86	0,87	0,88		1,79	1,84	1,88
	0,90	0,88	0,85		1,80	1,87	1,89
	0,89	0,93	0,88		1,81	1,88	1,85
	0,92	0,90	0,86		1,87	1,85	1,89
média	0,88	0,88	0,85	média	1,83	1,84	1,86
DP	0,03	0,03	0,03	DP	0,04	0,03	0,03
CV	3,55	3,32	3,32	CV	2,08	1,79	1,79
média 3 dias	0,87			média 3 dias	1,85		
DP 3 dias	0,03			DP 3 dias	0,03		
CV 3 dias	3,40			CV 3 dias	1,89		

Tabela 6: Análise estatística ANOVA do pão tradicional

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0503507	2	0,0251754	2,8735562	0,0825953	3,555
Dentro dos grupos	0,1576988	18	0,008761			
Total	0,2080495	20				

Tabela 7: Análise estatística ANOVA do pão integral

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0368275	2	0,0184137	1,2459555	0,3113224	3,555
Dentro dos grupos	0,2660186	18	0,0147788			
Total	0,302846	20				

Tabela 8: Resultados para ensaio de repetitividade de ferro em pão 7 e 9 grãos (mg.100g⁻¹)

pão 7 grãos	1 dia	2 dia	3 dia	pão 9 grãos	1 dia	2 dia	3 dia
	2,41	2,30	2,32		2,35	2,18	2,40
	2,20	2,26	2,28		2,34	2,25	2,35
	2,48	2,26	2,45		2,28	2,36	2,34
	2,36	2,28	2,33		2,25	2,30	2,22
	2,34	2,35	2,28		2,28	2,18	2,30
	2,45	2,33	2,38		2,30	2,35	2,38
	2,36	2,31	2,65		2,44	2,12	2,32
média	2,37	2,30	2,38	média	2,44	2,12	2,32
DP	0,09	0,04	0,13	DP	0,06	0,09	0,06
CV	3,80	1,54	5,55	CV	2,57	4,36	2,55
média 3 dias	2,35			média 3 dias	2,29		
DP 3 dias	0,09			DP 3 dias	0,07		
CV 3 dias	3,65			CV 3 dias	3,12		

Tabela 9: Análise estatística ANOVA do pão 7 grãos

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0065518	2	0,0032759	2,2922116	0,1297692	3,555
Dentro dos grupos	0,0257247	18	0,0014291			
Total	0,0322765	20				

Tabela 10: Análise estatística ANOVA do pão 9 grãos

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0243831	2	0,0121915	2,4318172	0,1161837	3,555
Dentro dos grupos	0,0902403	18	0,0050133			
Total	0,1146234	20				

Tabela 11: Resultados para ensaio de repetitividade de ferro em pão 12 grãos (mg.100g⁻¹)

pão 12 grãos	1 dia	2 dia	3 dia
	5,11	5,05	5,14
	5,28	5,07	4,91
	5,10	4,99	4,99
	5,13	5,08	4,77
	5,17	5,12	4,91
	4,99	5,01	5,00
	4,76	4,93	5,10
média	5,08	5,03	4,97
DP	0,16	0,06	0,13
CV	3,21	1,27	2,52
média 3 dias	5,03		
DP 3 dias	0,12		
CV 3 dias	2,33		

Tabela 12: Análise estatística ANOVA do pão 12 grãos

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0377828	2	0,0188914	1,2228096	0,3177241	3,555
Dentro dos grupos	0,2780854	18	0,0154492			
Total	0,3158682	20				

Os valores de CV obtidos nos ensaios de repetitividade para ferro foram 3,91% para pão tradicional; 3,66% para integral; 1,62% para 7 grãos; 1,53% para 9 grãos e 2,33% para 12 grãos, não ultrapassando o valor de 15,0% recomendado pela ANVISA (2003), indicando resultado satisfatório para esse parâmetro

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA fator único, ao nível de 95% de confiança, indicando um resultado confiável, já que todos os F calculados estavam abaixo do F tabelado.

Os valores obtidos para o ensaio de repetitividade para o teor de zinco estão apresentados nas Tabelas 13, 16 e 19 e nas Tabelas 14, 15, 17,18 e 20 encontram-se os valores obtidos pela análise estatística ANOVA ao nível 95% de confiança.

Tabela 13: Resultados para o ensaio de repetitividade de zinco em pão tradicional e integral ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)

pão tradicional	1 dia	2 dia	3 dia	pão integral	1 dia	2 dia	3 dia
	0,91	0,89	0,82		1,86	1,83	1,88
	0,84	0,84	0,81		1,82	1,86	1,84
	0,85	0,87	0,83		1,89	1,78	1,8
	0,86	0,87	0,88		1,79	1,84	1,88
	0,90	0,88	0,85		1,80	1,87	1,89
	0,89	0,93	0,88		1,81	1,88	1,85
	0,92	0,90	0,86		1,87	1,85	1,89
média	0,88	0,88	0,85	média	1,83	1,84	1,86
DP	0,03	0,03	0,03	DP	0,04	0,03	0,03
CV	3,55	3,32	3,32	CV	2,08	1,79	1,79
média 3 dias	0,87			média 3 dias	1,85		
DP 3 dias	0,03			DP 3 dias	0,03		
CV 3 dias	3,40			CV 3 dias	1,89		

Tabela 14: Análise estatística ANOVA do pão tradicional

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0058807	2	0,0029404	3,3507821	0,0579339	3,5545571
Dentro dos grupos	0,0157953	18	0,0008775			
Total	0,021676	20				

Tabela 15: Análise estatística ANOVA do pão integral

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0026455	2	0,0013228	1,0816123	0,3600913	3,5545571
Dentro dos grupos	0,0220132	18	0,001223			
Total	0,0246588	20				

Tabela 16: Resultados para o ensaio de repetitividade de zinco em pão 7 e 9 grãos ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)

pão 7 grãos	1 dia	2 dia	3 dia	pão 9 grãos	1 dia	2 dia	3 dia
	2,41	2,30	2,32		2,35	2,18	2,40
	2,20	2,26	2,28		2,34	2,25	2,35
	2,48	2,26	2,45		2,28	2,36	2,34
	2,36	2,28	2,33		2,25	2,30	2,22
	2,34	2,35	2,28		2,28	2,18	2,30
	2,45	2,33	2,28		2,30	2,35	2,38
	2,36	2,31	2,28		2,44	2,12	2,32
média	2,37	2,30	2,32	média	2,44	2,12	2,32
DP	0,09	0,04	0,06	DP	0,06	0,09	0,06
CV	3,80	1,54	2,62	CV	2,57	4,36	2,55
média 3 dias	2,33			média 3 dias	2,29		
DP 3 dias	0,06			DP 3 dias	0,07		
CV 3 dias	2,67			CV 3 dias	3,12		

Tabela 17: Análise estatística ANOVA do pão 7 grãos

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0291215	2	0,0145608	1,626127	0,2242888	3,5545571
Dentro dos grupos	0,1611766	18	0,0089543			
Total	0,1902981	20				

Tabela 18: Análise estatística ANOVA do pão 9 grãos

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0273297	2	0,0136648	2,5673014	0,1044947	3,5545571
Dentro dos grupos	0,0958077	18	0,0053227			
Total	0,1231374	20				

Tabela 19: Resultados para o ensaio de repetitividade de zinco em pão 12 grãos mg.100g⁻¹)

pão 12 grãos	1 dia	2 dia	3 dia
	2,60	2,65	2,62
	2,63	2,65	2,64
	2,64	2,67	2,65
	2,71	2,75	2,64
	2,57	2,66	2,62
	2,64	2,65	2,59
	2,58	2,65	2,57
média	2,62	2,67	2,62
DP	0,05	0,04	0,03
CV	1,82	1,34	1,11
média 3 dias	2,64		
DP 3 dias	0,04		
CV 3 dias	1,42		

Tabela 20: Análise estatística ANOVA do pão 12 grãos

ANOVA 12 grãos						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0103861	2	0,0051931	3,5358856	0,0506743	3,5545571
Dentro dos grupos	0,0264361	18	0,0014687			
Total	0,0368222	20				

Os valores de CV obtidos nos ensaios de repetitividade para zinco foram 3,40% para pão tradicional; 1,89% para integral; 3,65% para 7 grãos; 3,12% para 9 grãos e 1,42% para 12 grãos, não ultrapassando o valor de 15% recomendado pela ANVISA (2003), indicando resultado satisfatório para esse parâmetro

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA fator único, ao nível de 95% de confiança, indicando um resultado confiável, já que todos os F calculados estavam abaixo do F tabelado.

3.1.3. Exatidão: taxa de recuperação

As amostras de pães foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.2. e 2.3.6, respectivamente, adicionando-se diretamente nas

amostras de pão, antes da mineralização, o equivalente a 50 mg L⁻¹ de solução padrão de ferro e zinco. O valor adicionado correspondia a 100% do valor total de ferro e zinco encontrado em pães.

Os valores obtidos para o ensaio de recuperação para o teor de ferro estão apresentados na tabela 21 a seguir:

Tabela 21: Resultados para o ensaio de recuperação de ferro em pães

Amostra de pães	Recuperação %	M ± DP	CV%
TRADICIONAL	92 - 101	96,5 ± 6,4	6,69
INTEGRAL	96 - 103	99,5 ± 5,0	5,0
7 grãos	98 - 105	101,5 ± 5,0	4,9
9 grãos	100 - 109	104,5 ± 6,4	6,1
12 grãos	91-103	97,0 ± 8,5	8,8

Os resultados obtidos para a taxa de recuperação do teor de ferro foram de 96,5% para pão tradicional; 99,5% para integral; 101,5% para 7 grãos; 104,5% para 9 grãos e 97,0% para 12 grãos.

Os valores obtidos para o ensaio de recuperação para o teor de zinco estão apresentados na tabela 22 a seguir:

Tabela 22: Resultados para o ensaio de recuperação de zinco em pães

Amostra de pães	recuperação %	M ± DP	CV%
TRADICIONAL	87 - 96	91,5 ± 6,4	7,0
INTEGRAL	91 - 100	95,5 ± 6,4	6,7
7 grãos	85 - 90	87,5 ± 3,5	4,04
9 grãos	90 - 95	92,5 ± 3,5	3,82
12 grãos	99 - 108	103,5 ± 6,46	6,15

Os resultados obtidos nesse trabalho para a taxa de recuperação do teor de zinco foram de 91,5% para pão tradicional; 95,5% para integral; 87,5% para 7 grãos; 92,5% para 9 grãos e 103,5% para 12 grãos.

Não existem recomendações claras no guia do INMETRO (2010) quanto aos valores aceitáveis para taxa de recuperação. A ANVISA (2003) recomenda que as porcentagens de recuperação sejam próximas a 100%, entretanto, valores menores podem ser aceitos desde que a recuperação seja precisa e exata.

Os valores obtidos para o ensaio da taxa de recuperação tanto para ferro quanto para zinco encontram-se próximos a 100%, com exceção do pão 7 grãos para o ensaio da taxa de recuperação do zinco, contudo o desvio encontrado não ultrapassa a 15,0% recomendado pela ANVISA (2003), indicando resultado satisfatório para esse parâmetro.

3.1.4. Sensibilidade: limites de detecção (LD) e quantificação (LD)

Os limites de detecção calculados, segundo descrito no item 2.3.5, para ferro e zinco foram 0,04 e 0,07 mg.L⁻¹ respectivamente, já os limites de

quantificação para os mesmos compostos inorgânicos foram 0,15 e 0,24 mg.L⁻¹. O limite de quantificação tanto para ferro e zinco encontram-se abaixo do primeiro ponto da curva analítica (0,2 mg.L⁻¹), indicando resultado satisfatório para esse parâmetro.

4. Conclusão

A metodologia aplicada e validada parcialmente para determinação de ferro e zinco em pães industrializados através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama se mostrou adequada, de acordo com as recomendações do INMETRO (2010) e ANVISA (2003). Os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, avaliados indicaram resultados satisfatórios.

5. Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto.

6.Referências Bibliográficas

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Análise do mercado de pães, 2002/2003, **2005**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em 01/06/2005.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Panificação fatura R\$ 63 bilhões em 2011, **2012**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em: 11/05/2012

Analytical Methods Committee, *Analyst*; 112, 199, **1987**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. Disponível em: www.anvisa.org.br. Acesso em 01/11/2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2003**. Resolução-RE nº 899. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm Acesso em 22/02/2011.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, v.64, p.175-177, **2002**.

BRITO, N.M.; Amarante, J.O.P.; Polese, L.; Ribeiro, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p.129-146, **2003**.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole; v. 1. p. 878 , **2005**.

CUNHA, D.F.; Cunha, S.F.C. Microminerais: In: Dutra-de Oliveira JE & Marchini JS. Ciências Nutricionais. Sarvier; São Paulo, p. 141-165, **1998**.

ESTELLER, M.S. Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento. São Paulo, p. 248. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), **2004**.

GIBSON, RS. Assessment of trace-element status. In:Gibson RS, editor. Principles of nutritional assessment. New York: Oxford University Press; p. 511-53, **1990**.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 03, **2010**.

IUPAC - Pure and Applied Chemistry, 74: 835-855, **2002**.

KINGSTON, H.M.; Jassie, L.B. Introduction to microwave sample preparation – Theory and practice. American Chemical Society, **1988**.

LEE, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 5ª edição. Editora Edigar Blucher, Ltda. São Paulo, p. 381, 425, **2001**.

LOBO, A.S.; Tramonte, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. Rev. Nutr., Campinas, 17(1):107-113, jan/mar., **2004**.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M. The importance of zinc in human nutrition. Rev. Nutr.;17:7987, **2004**.

MACEDO, E.M.C.; Amorim, M.A.F.; Silva, A.C.S; Castro, C.M.B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. Rev. Paul. Pediatr.; 28(3):329-36, **2010**.

MIRET, S.; Simpson, R.J.; Mckie, A.T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. Annual Review of Nutrition, 23: 283-301, **2003**.

OKIGAMI, H.; J. Biomolec. Med. Free Rad. , vol. 2, nº 2, **1996**.

PEDROSA, L.F.; Cozzolino, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. Rev. Saúde Públ., v.27, n.4, p.266-270, **1993**.

PEREIRA-Filho, E.R. Sistemas mecanizados acoplados a forno de micro-ondas para a mineralização em linha de amostras de interesse alimentício: determinação de ferro e cobalto. Tese de Mestrado. IQ-UNICAMP, **1999**.

PERES, M.R. Remoção dos interferentes endócrinos 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e 4-nonilfenol por adsorção em carvão ativado em pó em água de abastecimento público. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, **2011**.

REGO, E.C.P. Validação de métodos de ensaios químicos, INMETRO, **2010**.

RIBANI, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, 771-780, **2004**.

RODRIGUEZ, L.C.; Campana, A.M.G.; Barrero, F.A.; Linares, C.J.; Ceba, M.R.J. *AOAC Intern.*; 78(2): 471-476, **1995**.

SARTORATTO, A. Desenvolvimentos Metodológicos em Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografias Gasosa e Líquida. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2006**.

SOLOMONS, N.W. Competition mineral-mineral interaction in the intestine: implications for zinc absorption in humans. In: Inglett, G.E. ed. Nutritional bioavailability of zinc. Washington, American Chemical Society, p. 247-72, **1983**.

SOLOMONS, N.W. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. *J. Nutr.*, 116: 927-35, **1986**.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr.*:1309(Suppl 5):1350-4S, **2000**

ARTIGO 3

FERRO E ZINCO EM PÃES INDUSTRIALIZADOS

Grasiela de Souza Costa da Silva e Juliana A. L. Pallone
Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

RESUMO

O ferro e o zinco são importantes por participarem em numerosas proteínas e enzimas. A deficiência destes minerais podem causar sérios danos à saúde humana. Em relação à deficiência de ferro, a ANVISA regulamentou a obrigatoriedade, como medida preventiva, da fortificação de farinhas de milho e de trigo com ferro (4,2 mg/100g de farinha). Para a prevenção da deficiência de zinco é necessária uma dieta balanceada em minerais. O ferro pode apresentar interações com outros nutrientes e compostos orgânicos. Estas interações podem influenciar seu aproveitamento no organismo, ou no aproveitamento de outros metais, como o zinco. Portanto, o objetivo deste trabalho foi quantificar o teor de ferro e zinco presentes em pães industrializados (tradicional e especiais), que utilizam como principal ingrediente a farinha de trigo fortificada com ferro, representando 4% do consumo em relação aos outros tipos de pão e verificar a razão molar entre ferro e zinco. O método utilizado foi a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Os teores de ferro e zinco variaram de 2,2 a 6,0 mg 100 g⁻¹ (4,1 mg 100 g⁻¹ em média) e 0,3 a 1,0 mg 100g⁻¹ (0,7 mg 100 g⁻¹ em média) no pão tradicional; de 1,8 a 4,1 mg 100 g⁻¹ (3,0 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,4 a 2,3 mg 100 g⁻¹ (1,9 mg 100 g⁻¹ em média) no pão integral; de 1,8 a 6,8 mg 100 g⁻¹ (4,3 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,7 a 2,8 mg 100 g⁻¹ (2,3 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 7 grãos; de 3,0 a 3,8 mg 100 g⁻¹ (3,4 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,8 a 3,0 mg 100 g⁻¹ (2,4 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 9 grãos; de 2,0 a 4,2 mg 100 g⁻¹ (3,1 mg 100 g⁻¹ em média) e 1,4 a 2,5 mg 100 g⁻¹ (2,0 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 12 grãos, respectivamente. Os resultados indicaram em geral, faltos de uniformidade nos teores de ferro e zinco entre lotes da mesma marca e entre marcas do mesmo tipo de pão. No pão tradicional a falta de uniformidade se deve, provavelmente, pela dificuldade da adição da pré-mistura (ferro) na farinha, ingrediente principal na produção de pães, enquanto que nos pães especiais, pela variedade e quantidade dos grãos adicionados. A razão molar Fe:Zn variaram de 5:1 a 12:1 no pão tradicional; 2:1 a 3:1 no integral; 1:1 a 3:1 no 7 grãos; de 1:1 a 2:1 no 9 grãos e no pão 12 grãos não houve variação, sendo a razão molar 2:1.

No pão tradicional a razão molar Fe:Zn encontrada foi maior que 4:1, padrão desejado, sendo desfavorável para o aproveitamento do zinco pelo organismo.

Palavras-chave: Ferro, Zinco, pão, grãos, quantificação, FAAS, razão molar.

ABSTRACT

Iron and zinc are important for engaging in numerous proteins and enzymes. The deficiency of these minerals can cause serious harm to human health. In relation to iron deficiency, ANVISA regulates the obligation, as a preventive measure, the fortification of flour of maize and wheat with iron (4,2 mg/100g of flour). For prevention of zinc deficiency is necessary a balanced mineral diet. The iron may have interactions with other nutrients and organic compounds. These interactions may affect their use in the body, or the use of other metals such as zinc. Therefore, the objective was to quantify the amount of iron and zinc in industrial bread (traditional and special), using as a main ingredient in wheat flour fortified with iron, representing 4% of consumption in relation to other types of bread and verify the molar ratio between iron and zinc. The method used was atomic absorption spectrometry with flame (FAAS). The iron and zinc in the bread samples varied from 2,2 to 6,0 mg 100 g⁻¹ (4,1 mg 100 g⁻¹ on average) and 0,3 to 1,0 mg 100g⁻¹ (0,7 mg 100 g⁻¹ on average) in traditional bread; 1,8 to 4,1 mg 100 g⁻¹ (3,0 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,4 to 2,3 mg 100 g⁻¹ (1,9 mg 100 g⁻¹ on average) in whole wheat bread; 1,8 to 6,8 mg 100 g⁻¹ (4,3 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,7 to 2,8 mg 100 g⁻¹ (2,3 mg 100 g⁻¹ on average) in 7 grain bread ; 3,0 to 3,8 mg 100 g⁻¹ (3,4 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,8 to 3,0 mg 100 g⁻¹ (2,4 mg 100 g⁻¹ on average) in 9 grain bread; 2,0 to 4,2 mg 100 g⁻¹ (3,1 mg 100 g⁻¹ on average) and 1,4 to 2,5 mg 100 g⁻¹ (2,0 mg 100 g⁻¹ on average) in 12 grain bread, respectively. The results indicated generally lacking in uniform concentrations of iron and zinc between batches of the same brand and between brands of the same type of bread. In traditional bread lack of uniformity is probably due to the difficulty of adding the premix (iron) in the flour, the main ingredient in the production of bread, while in breads, variety and quantity of the added grains. The molar ratio of Fe: Zn ranging from 5:1 to 12:1 in traditional bread; 2:1 to 3:1 in whole wheat bread; 1:1 to 3:1 in 7 grain bread; 1:1 to 2:1 in 9 grain bread and 12 grain bread did not change, and the molar ratio of 2:1. In traditional bread molar ratio Fe Zn was found greater than 4:1, the desired pattern, being unfavorable for the recovery of zinc by the body.

Keywords: Iron, Zinc, bread, grains, quantification, FAAS, molar ratio.

1.Introdução

O pão pode ser considerado um produto popular, sendo consumido na forma de lanches ou com refeições. Ele é apreciado devido ao seu sabor, preço e sua disponibilidade em milhares de padarias e supermercados do País (ESTELLER, 2004) e tem despertado o interesse por pesquisa.

Vários estudos estão sendo realizados, em pães, dentre eles o estudo do teor de ferro, cálcio, zinco, ácido fólico e fibra em pães de destilaria demonstrou uma variação nos teores dos minerais de acordo com o tipo de grão utilizado, neste caso em consequência dos diferentes teores de fibra encontrado em cada grão. A forma de ferro e zinco (total e solúvel) também variaram de acordo com o tipo de grão (RASCO *et al.*, 1990); os benefícios do pão fortificado com ferro a longo prazo em mulheres, analisadas em dois grupos por um período de 5 meses, um com a utilização de pão de centeio fortificado com ferro e outro com pão de centeio sem fortificação, não apresentando alteração no nível de ferro nas mulheres estudadas com o pão fortificado, sendo sugerido que a composição da dieta das voluntárias contribuiu para esta falta de resposta (HANSEN *et al.*, 2005); as propriedades tecnológicas e sensoriais em pães fortificados com ferro, sendo utilizado três diferentes fontes de ferro (ferro reduzido, pirofosfato de ferro e sulfato ferroso monohidratado microencapsulado) não havendo diferença significativa entre os pães enriquecidos com as diferentes fontes de ferro, podendo estes ser utilizados no preparo de pães de acordo com sua viabilidade econômica e disponibilidade comercial (NABESHIMA *et al.*, 2005) e a variabilidade genética e estabilidade em grãos e pão de trigo, indicando haver variação nos teores de ferro e zinco em função da data de semeadura, combinação solo-fertilizante nitrogenado e quantidade de ferro e zinco presente naturalmente no solo (XIAOPENG *et al.*, 2012), dentre outros.

No Brasil em 2005, os produtos de panificação, dentre eles o pão, ocuparam a terceira colocação na lista de compras do brasileiro, que destinou, em média, 12% do orçamento familiar para alimentação (ABIP, 2005), onde o pão industrializado representou 4% dos pães consumidos (ABIP, 2009).

O segmento de panificação e confeitaria no Brasil em 2011 apresentou um faturamento de R\$ 63 bilhões (ABIP, 2012).

O pão apresenta características químicas, físicas e físico-químicas de acordo com a sua composição e processo de fabricação. Segundo a ANVISA para análise destas características são sugeridos os ensaios de umidade, acidez e lipídios e devem ser realizados na massa livre de recheio e cobertura (ANVISA, 2000).

A determinação da umidade é importante, pois está relacionada com a estabilidade, qualidade e composição do alimento, podendo afetar a estocagem (rapidez da deterioração), embalagem (alterações como escurecimento), processamento (formação de grumos) do mesmo. A umidade também é responsável pelo desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias no alimento (PARK E ANTONIO, 2006).

Proteínas, gorduras, vitaminas e minerais estão presentes nos ingredientes que são utilizados na produção do pão. Entre os minerais, destacam-se o ferro e zinco que têm importante participação em numerosas proteínas e enzimas no organismo.

As atribuições mais importantes do ferro estão ligadas às funções destas proteínas no organismo, como transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina e pela mioglobina, que ajuda a fornecer oxigênio aos músculos. O ferro ainda participa de enzimas importantes para o organismo, como na catalase, que age na redução do peróxido de hidrogênio, principalmente quando este é formado em grande quantidade, também na cadeia de inibição de radicais livres, e enzimas que auxiliam as reações bioquímicas (CUNHA E CUNHA, 1998; MIRET *et al.*, 2003; COZZOLINO, 2005).

O zinco é importante para o funcionamento adequado do metabolismo, necessário à reprodução, diferenciação celular e crescimento (FERRAZ *et al.*, 2007), participa do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, na síntese e degradação dos ácidos nucleicos (AMESTY *et al.*, 2006), e de atividades do sistema imune, com ação regulatória sobre o sistema imunológico, prevenção de formação de radicais livres, crescimento estrutural, desenvolvimento sexual e

cognitivo e síntese de DNA (GIBSON, 1990; OKIGAMI, 1996; WOOD, 2000; MAFRA E COZZOLINO, 2004; MACEDO *et al.*, 2010).

A deficiência de ferro e zinco ocorre simultaneamente em várias populações e devem ser trabalhadas de forma equilibrada. Existe a necessidade de cuidados, principalmente com crianças e gestantes, pois suas necessidades são aumentadas. A avaliação da medida do valor de zinco é difícil, pois a determinação de sua concentração plasmática ou sérica não é suficiente como marcador bioquímico ou biológico (WIERINGA *et al.*, 2004).

Como estratégia de combate a algumas deficiências nutricionais inclui-se a fortificação de alimentos com minerais e mesmo o uso de suplementação (LOBO E TRAMONTE, 2004), pois são uma forma barata, prática e efetiva utilizada pela indústria de alimentos, para atender as recomendações regulamentadoras (LUCOCK, 2000).

A escolha do produto alimentício para fortificação depende dos hábitos alimentares da população e dos aspectos logísticos do processo de fortificação. O alimento mais frequentemente escolhido tem sido a farinha de trigo (MARTINEZ *et al.*, 2005).

Sendo a farinha um dos principais ingredientes na produção de pão, alimento muito consumido pela população, torna-se importante a determinação do teor de ferro para avaliação do impacto da obrigatoriedade da fortificação de farinhas na incidência de anemia ferropriva, problemas relacionados ao seu excesso, como processos oxidativos, algumas doenças como Parkinson e Alzheimer e competição com outros minerais, como o zinco.

O mecanismo de interação entre a absorção de ferro e zinco não está totalmente esclarecido. Porém, existem fortes evidências que apontam a ocorrência de interação nos sítios de absorção ou pós-absorção, por causa da competição pelos mecanismos semelhantes de transporte (ANTUNES, 2010), por serem eles quimicamente similares (configuração eletrônica) (SOLOMONS, 1983; LEE 2001).

Solomons (1986), sugeriu que existe uma carga total de ferro e zinco que o organismo suporta, correspondendo ao ponto de saturação e a partir deste,

começaria o efeito competitivo entre eles. Abaixo deste ponto, existiriam sítios disponíveis para absorção de ferro e zinco sem muita interferência.

Os mecanismos responsáveis pela absorção intestinal de ferro e zinco são similares (KORDAS, 2004; BODIGA, 2007; YANAGISAWA, 2008), assim hipóteses têm sido levantadas com o objetivo de encontrar a localização do ponto específico dessa interação (McMAHON, 1998).

Contudo existem resultados controversos em relação a interação competitiva entre ferro e zinco que podem ser explicadas pelo emprego de diferentes metodologias (LOBO E TRAMONTE, 2004), e devem ser consideradas também as possíveis interações entre os minerais no uso de suplementos ou de alimentos fortificados (PEDROSA E COZZOLINO, 1993).

Assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar a metodologia validada parcialmente por Silva e Pallone (2012) para a determinação de ferro e zinco em alimentos, neste caso, pães elaborados com farinha fortificada ferro, verificar a razão molar entre ferro e zinco e também o teor de umidade.

2. Parte Experimental

2.1. Produtos analisados

As amostras de pães industrializados (tradicional, integral, 7 grãos, 9 grãos e 12 grãos) foram coletadas aleatoriamente em padarias, mercados e hipermercados na cidade de Campinas.

Em geral os grãos que compõem a formulação dos pães especiais são: pães 7 grãos, aveia, castanha de caju, castanha do Pará, centeio, cevada, gergelim, girassol, linhaça, milho, quinoa, soja e trigo; os pães 9 grãos, aveia, castanha de caju, castanha do Pará, centeio, cevada, gergelim, girassol, linhaça, milho, quinoa, soja e trigo e os pães 12 grãos, amaranto, aveia, centeio, cevada, cevadinha, gergelim, girassol, linhaça, milho, milheto, quinoa, soja, trigo e triticale, variando de uma marca para outra no mesmo tipo de pão.

2.2. Determinação de Umidade dos pães

O método utilizado foi o de secagem em estufa (esterilização e secagem Nova ética, modelo 400-3ND), baseada na remoção da água por aquecimento). As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio previamente pesados e ficaram em estufa por 24 horas a 105°C. Após este período, os cadinhos de alumínio foram colocados em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente, após o qual foram novamente pesados.

De acordo com a ANVISA (2003), no caso de metodologia analítica descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, a metodologia será considerada validada.

Assim, a metodologia para determinação de umidade, por ser metodologia oficial, não precisou ser validada. De qualquer forma a fim de verificar a adequada realização desse método no Laboratório de Análise de Alimentos da FEA/Unicamp, foi realizado ensaio de repetitividade.

2.3. Determinação de ferro e zinco

2.3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram ácido nítrico P.A e peróxido de hidrogênio, ambos marca Synth, Brasil.

2.3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: o Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo AAnalyst 200, com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo, lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) e zinco (213,86 nm), Perkin Elmer; balança analítica (Ohaus, modelo AP210-0); banho ultra-sônico (Branson, modelo 1510); bloco digestor (Quimis, modelo M242) e moinho (Ika, modelo A11).

2.3.3. Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente (imersão por no mínimo 6 horas) e enxaguadas com água da torneira até total eliminação de espumas. As vidrarias foram imersas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por, no mínimo, 12 horas. Após esse tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água purificada pelo sistema Milli-Q. A secagem das vidrarias se deu de forma natural, sendo protegidas com papel toalha para evitar poeira e re-contaminações.

2.3.4. Amostragem

Para todas as amostras, foram analisadas 3 marcas diferentes e 3 lotes diferentes da mesma marca. Todas as análises foram feitas em triplicatas, totalizando 45 amostras.

De cada embalagem foram retiradas 9 fatias de pão, sendo 3 do início, 3 do meio e 3 do final.

2.3.5. Mineralização das amostras

Inicialmente, as amostras a serem analisadas foram moídas, homogeneizadas e pesado cerca de 0,6000g de cada uma, em tubos de digestão medindo, aproximadamente, 20 cm de comprimento. A seguir, adicionou-se cerca de 8 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Foram preparados, também, dois tubos “branco” (sem as amostras). Logo após, foram colocados na entrada de cada tubo de digestão pequenos funis, para que o ácido nítrico ficasse em refluxo, sendo o conjunto levado para bloco digestor onde foram aquecidos por 30 minutos a uma temperatura de 50°C, Decorrido este tempo, a temperatura foi aumentada para 100°C, por mais 30 minutos e na sequência à 130°C por mais 3 horas. Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco e aguardou-se o resfriamento à temperatura ambiente. Adicionou-se uma pequena quantidade de água (5 mL) aos tubos de digestão. Posicionou-se os tubos em um banho de ultra-som por 5 minutos.

Transferiu-se o conteúdo dos tubos para balões volumétricos de 50 mL e completou-se o volume com água deionizada.

2.3.6. Determinação Quantitativa de Ferro e Zinco

A determinação quantitativa de ferro e zinco foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica com chama em aparelho da marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200, onde as amostras foram introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar ($2,5 \text{ L.h}^{-1}$) e acetileno (10 L.h^{-1}) com temperatura de, aproximadamente, 2000°C .

Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) e zinco (213,86nm), com metodologia validada parcialmente. Os resultados das análises foram expressos em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$.

2.4 Análise Estatística

Foram realizados testes estatísticos que incluíram análise de variância, ANOVA ao nível 95% de confiança, para os teores de ferro e zinco obtidos em amostras de pães tradicionais e especiais de marcas e lotes diferentes e análise por componentes principais (PCA) com a utilização de programa Matlab versão 6.1.

3. Resultados, Análise Estatística e Discussão

3.1 Determinação de ferro e zinco

Para determinação ferro e zinco as amostras foram preparadas conforme procedimento descrito em 2.3.5. e 2.3.6. respectivamente.

As tabelas 1 e 2 apresentam os teores de ferro encontrado nas amostras analisadas, bem como as faixas de concentrações e a análise estatística dos resultados.

Tabela 1. Teor de ferro, concentrações e análise estatística.

Amostra Pão Industrializado	Marca	Lote	Faixa de	Fe mg/100g M ± DP	CV%	F* entre lote:	F* entre marcas
			conc. Fe mg/100g				
TRADICIONAL	A	1	4,5 – 5,2	4,8 ± 0,4	8,4	3,4	39,0
		2	4,7 – 5,4	5,1 ± 0,4	7,4		
		3	5,1 – 6,0	5,6 ± 0,6	8,5		
	B	1	2,3 – 2,5	2,4 ± 0,1	3,5	23,8	
		2	2,7 – 2,9	2,8 ± 0,1	4,2		
		3	2,3 - 2,4	2,4 ± 0,0	1,6		
	C	1	3,1 – 3,5	3,3 ± 0,2	5,5	0,1	
		2	3,0 – 3,5	3,2 ± 0,2	7,2		
		3	2,2 – 2,5	2,4 ± 0,2	6,9		
INTEGRAL	A	1	3,4 – 3,4	3,4 ± 0,0	1,0	8,5	63,6
		2	3,5 – 3,5	3,5 ± 0,1	2,2		
		3	3,5 – 3,7	3,6 ± 0,1	2,8		
	B	1	3,9 – 4,0	4,0 ± 0,1	1,3	0,5	
		2	3,9 – 4,1	4,0 ± 0,1	2,7		
		3	3,6 – 4,1	3,9 ± 0,2	6,2		
	C	1	1,8 – 2,1	2,0 ± 0,2	7,6	20,6	
		2	1,8 – 2,0	1,9 ± 0,1	4,3		
	7 grãos	A	3	2,4 – 2,6	2,5 ± 0,1	5,1	67,6
1			5,2 – 6,2	5,5 ± 0,6	10,4		
2			6,0 – 6,8	6,4 ± 0,4	6,5		
B		1	4,5 – 5,0	4,7 ± 0,3	5,3	11,5	
		2	4,3 – 4,6	4,5 ± 0,2	3,2		
		3	3,9 – 4,2	4,0 ± 0,2	3,9		
C		1	1,8 – 2,1	2,0 ± 0,1	6,8	31,3	
		2	2,2 – 2,6	2,5 ± 0,2	9,7		
		3	3,1 – 3,5	3,3 ± 0,2	6,5		
9 grãos	A	1	3,4 -3,7	3,5 ± 0,2	4,8	0,8	422,5
		2	3,4 – 4,0	3,7 ± 0,3	7,2		
		3	3,4 – 3,8	3,6 ± 0,2	6,1		
	B	1	1,6 – 1,6	1,6 ± 0,0	2,1	0,3	
		2	1,6 – 1,6	1,6 ± 0,0	1,2		
		3	1,5 – 1,7	1,6 ± 0,1	6,7		
	C	1	3,0 -3,5	3,3 ± 0,3	8,4	0,6	
		2	3,1 – 3,3	3,2 ± 0,1	3,0		
		3	3,0 – 3,6	3,4 ± 0,3	8,9		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Tabela 2. Teor de ferro, concentrações e análise estatística.

Amostra Pão Industrializado	Marca	Lote	Faixa de	Fe mg/100g M ± DP	CV%	F*	F*
			conc. Fe mg/100g				
12 grãos	A	1	2,0 – 2,2	2,1 ± 0,1	4,1	105,7	0,4
		2	3,7 – 4,2	3,9 ± 0,2	6,1		
		3	2,9 – 3,1	3,0 ± 0,1	2,4		
	B	1	2,8 – 3,0	2,9 ± 0,1	3,2	7,3	
		2	2,6 – 2,8	2,7 ± 0,1	4,9		
		3	2,4 – 2,7	2,5 ± 0,2	6,0		
	C	1	2,9 – 3,3	3,1 ± 0,2	5,6	2,2	
		2	2,9 – 3,2	3,1 ± 0,2	5,2		
		3	2,8 – 3,0	2,9 ± 0,1	3,2		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Os teores de ferro nos pães analisados variaram de 2,2 a 6,0 mg 100 g⁻¹ (4,1 mg 100 g⁻¹ em média) no pão tradicional; de 1,8 a 4,1 mg 100 g⁻¹ (3,0 mg 100 g⁻¹ em média) no pão integral; de 1,8 a 6,8 mg 100 g⁻¹ (4,3 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 7 grãos; de 3,0 a 3,8 mg 100 g⁻¹ (3,4 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 9 grãos; de 2,0 a 4,2 mg 100 g⁻¹ (3,1 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 12 grãos, indicando, em geral, falta de uniformidade nos teores entre lotes da mesma marca e entre marcas do mesmo tipo de pão.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA fator único, ao nível de 95% de confiança, indicando diferença significativa no teor de ferro entre os lotes da marca B e entre as marcas A, B e C do pão tradicional; entre os lotes da marca A e C e entre as marcas A, B e C do pão integral; entre os lotes das marcas A, B e C do pão 7 grãos; entre as marcas A, B e C do pão 9 grãos e entre os lotes das marcas A e B do pão 12 grãos. Entre lotes do pão tradicional das marcas A e C; integral da marca B; 9 grãos das marcas A, B e C e 12 grãos da marca C; entre as marcas, o pão 7 grãos e o 12 grãos não houve diferença significativa.

Por não existir recomendação específica em relação ao coeficiente de variação (CV) para análises realizadas em triplicatas, foi utilizado como parâmetro, o recomendado no Guia para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA (2003) onde os resultados não devem exceder 15% de CV. A variação obtida nos

resultados em relação ao CV para o ferro foram de 1,0 a 10,4%, estando dentro dos valores recomendado pela ANVISA.

As variações no teor de ferro no pão tradicional e integral podem ser explicadas pela dificuldade na adição da pré-mistura, constituída de ácido fólico e ferro na farinha, ingrediente principal na produção de pães. Outro fator que pode influenciar esta variação é a concentração deste mineral presente naturalmente no grão de trigo que é dependente da interação de vários fatores, incluindo as condições meteorológicas, tipo de solo, manejo de fertilizantes nitrogenados e genótipo (SOUZA *et al.*, 2004, OTTESON *et al.*, 2008).

Através dos resultados obtidos observou-se um maior teor de ferro no pão tipo 7 grãos das marcas A (média 4,8 mg 100 g⁻¹) e B (média 4,4 mg 100 g⁻¹) em comparação às marcas A (média 3,0 mg 100 g⁻¹), B (média 2,7 mg 100 g⁻¹) e C (média 3,0 mg 100 g⁻¹) do pão 12 grãos, cuja causa provável seja a variedade de grãos adicionados por cada fabricante em relação ao mesmo tipo de pão.

As tabelas 3 e 4 apresentam os teores de zinco encontrado nas amostras analisadas, bem como as faixas de concentrações e a análise estatística dos resultados.

Tabela 3. Teor de zinco, concentrações e análise estatística

Amostra	Marca	Lote	Faixa de conc. Zn mg/100g	Zn mg/100g M ± DP	CV%	F entre lotes	F entre marcas
TRADICIONAL	A	1	0,6 - 0,7	0,6 ± 0,1	8,6	28,9	0,7
		2	0,4 - 0,5	0,4 ± 0,0	3,9		
		3	0,4 - 0,5	0,5 ± 0,0	4,5		
	B	1	0,3 - 0,4	0,4 ± 0,0	5,7	389,8	
		2	1,0 - 1,0	1,0 ± 0,1	4,9		
		3	0,4 - 0,4	0,4 ± 0,0	2,5		
	C	1	0,4 - 0,5	0,4 ± 0,0	9,2	0,3	
		2	0,4 - 0,5	0,4 ± 0,0	6,6		
		3	0,4 - 0,5	0,4 ± 0,0	5,0		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Tabela 4. Teor de zinco, concentrações e análise estatística

Amostra	Marca	Lote	Faixa de conc. Zn mg/100g	Zn mg/100g M ± DP	CV%	F entre lotes	F entre marcas	
INTEGRAL	A	1	1,5 - 1,6	1,6 ± 0,1		3,7	86,5	1,6
		2	2,0 - 2,0	2,0 ± 0,0		1,0		
		3	2,1 - 2,3	2,2 ± 0,1		3,8		
	B	1	1,5 - 1,7	1,6 ± 0,1		5,3	2,0	
		2	1,6 - 1,7	1,7 ± 0,0		2,1		
		3	1,6 - 1,6	1,5 ± 0,1		9,6		
	C	1	1,9 - 2,0	1,9 ± 0,1		3,6	62,2	
		2	1,7 - 1,8	1,7 ± 0,1		4,5		
		3	1,4 - 1,4	1,4 ± 0,0		1,4		
7 grãos	A	1	1,7 - 2,0	1,8 ± 0,2		9,2	4,0	0,1
		2	1,8 - 2,2	2,0 ± 0,2		9,7		
		3	2,0 - 2,4	2,3 ± 0,2		9,8		
	B	1	1,7 - 2,0	1,8 ± 0,1		5,6	54,9	
		2	1,7 - 2,0	1,8 ± 0,2		8,4		
		3	2,6 - 2,8	2,7 ± 0,1		4,0		
	C	1	1,8 - 2,1	2,0 ± 0,1		7,1	14,6	
		2	1,9 - 2,0	2,0 ± 0,1		4,1		
		3	2,4 - 2,65	2,6 ± 0,2		9,3		
9 grãos	A	1	1,8 - 2,1	1,9 ± 0,2		8,5	5,2	7,7
		2	2,2 - 2,7	2,5 ± 0,2		9,8		
		3	2,0 - 2,4	2,3 ± 0,2		9,5		
	B	1	1,9 - 2,3	2,2 ± 0,2		9,5	53,3	
		2	1,0 - 1,1	1,1 ± 0,1		7,2		
		3	1,5 - 1,6	1,5 ± 0,1		4,1		
	C	1	2,6 - 3,0	2,8 ± 0,2		6,8	0,0	
		2	2,6 - 3,0	2,7 ± 0,2		7,0		
		3	2,5 - 3,0	2,7 ± 0,3		9,4		
12 grãos	A	1	1,7 - 2,0	1,9 ± 0,2		9,4	24,8	6,8
		2	2,4 - 2,5	2,5 ± 0,1		2,0		
		3	2,3 - 2,4	2,4 ± 0,1		3,1		
	B	1	1,6 - 1,8	1,7 ± 0,1		4,7	2,5	
		2	1,4 - 1,6	1,5 ± 0,1		4,0		
		3	1,4 - 1,7	1,5 ± 0,1		9,4		
	C	1	1,7 - 1,9	1,8 ± 0,1		7,0	3,7	
		2	1,8 - 2,1	1,9 ± 0,2		9,5		
		3	2,0 - 2,4	2,2 ± 0,2		9,0		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Os teores de zinco nos pães analisados variaram de 0,3 a 1,0 mg 100g⁻¹ (0,7 mg 100 g⁻¹ em média) no pão tradicional; de 1,4 a 2,3 mg 100 g⁻¹ (1,9 mg 100 g⁻¹ em média) no pão integral; de 1,7 a 2,8 mg 100 g⁻¹ (2,3 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 7 grãos; de 1,8 a 3,0 mg 100 g⁻¹ (2,4 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 9 grãos; de 1,4 a 2,5 mg 100 g⁻¹ (2,0 mg 100 g⁻¹ em média) no pão 12 grãos, indicando, em geral, falta de uniformidade nos teores entre lotes da mesma marca e entre marcas do mesmo tipo de pão.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA fator único, ao nível de 95% de confiança indicando diferença significativa entre os lotes da marca A e B do pão tradicional; entre os lotes da marca A e C do pão integral; entre os lotes da marca B e C do pão 7 grãos; entre os lotes da marca A e B e entre as marcas A, B e C do pão 9 grãos e entre o lote da marca A e entre as marcas A, B e C do pão 12 grãos. Entre os lotes da marca C do pão tradicional; marca B do integral; marca A do 7 grãos; marca C do 9 grãos e marcas B e C do 12 grãos e entre as marcas, os pães tipo tradicional, integral e 7 grãos não houve diferença significativa.

Por não existir recomendação específica em relação ao coeficiente de variação (CV) para análises realizadas em triplicatas, foi utilizado como parâmetro, o recomendado no Guia para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA (2003) onde os resultados não devem exceder 15% de CV. A variação obtida nos resultados em relação ao CV para o zinco foram de 1,0 a 9,8 estando dentro dos valores recomendado pela ANVISA.

As variações no teor de zinco no pão tradicional e integral podem ser explicadas, por causa do teor do mesmo presente na farinha, proveniente naturalmente do grão de trigo, podendo sofrer variações causadas por diferenças no grau de refinamento ou extração dos produtos farináceos, além da influência de fatores relacionados a condições meteorológicas, tipo de solo, manejo de fertilizantes nitrogenados e genótipo (FERREIRA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004, OTTESON *et al.*, 2008).

Estas variações foram demonstradas em um estudo realizado em Manitoba, Canadá no período de 3 anos (1997, 1998 e 2000) com grãos de trigo, onde se

concluiu que a variação no teor de ferro e zinco estão relacionados com a data de semeadura, combinação solo-fertilizante nitrogenado e quantidade de ferro e zinco presente naturalmente no solo (XIAOPENG *et al.*, 2012).

No caso dos pães especiais a falta de uniformidade ocorre, provavelmente, por causa da adição de vários tipos de grãos, que em sua composição natural já contém ferro e zinco, demonstrado na tabela 5.

Em estudo realizado por RASCO *et al.* (1990), com elaboração de pão com diferentes tipos de grãos (trigo e cevada), farelo de trigo e fibras (soja e aveia), constataram variações, no produto final (pão), nos teores de ferro total e solúvel e zinco total e solúvel de acordo com o ingrediente utilizado.

Outra provável causa para a variação no teor de zinco é a quantidade de grãos adicionados na elaboração dos pães especiais. Esta quantidade não é definida por nenhuma legislação, ficando cada fabricante livre para adotar o critério desejado.

Tabela 5. Teor natural de ferro e zinco em grãos

Grãos	Teor Fe (mg 100g ⁻¹)	Teor Zn (mg 100g ⁻¹)	Referência
gergelim	10,5		ASSUMPÇÃO, 2008
linhaça	4,7	4,4	TABELA TACO, 2006
milho	3,4	2,1	CASTRO, <i>et al.</i> , 2009
castanha caju	5,2	4,7	TABELA TACO, 2006
aveia	4,4	2,6	TABELA TACO, 2006
quinoa	7,5	7,4	LOPES, <i>et al.</i> , 2009
trigo	7,9	5,6	NUNES <i>et al.</i> , 2001
amaranto	7,6	3,2	COLE, 1979
triticale	4,5	2,7	BRUM <i>et al.</i> , 1999

Através dos resultados obtidos observou-se um maior teor de zinco na marca C (média 2,7 mg 100 g⁻¹) do pão 9 grãos em comparação às marcas A (média 2,3 mg 100 g⁻¹), B (média 1,6mg 100 g⁻¹) e C (média 2,0 mg 100 g⁻¹) do

pão 12 grãos, cuja causa provável seja a variedade de grãos adicionados por cada fabricante em relação ao mesmo tipo de pão.

Em 1978, a Resolução CNNPA nº 12 da ANVISA determinava a fabricação do pão integral com no mínimo 50% de farinha de trigo integral. Porém, esta resolução foi revogada pela Resolução RDC nº 90 de 17 de outubro de 2000 (ANVISA, 2000) que determina, obrigatoriamente, a fabricação do pão integral com farinha de trigo, farinha de trigo integral e/ou fibra de trigo ou farelo de trigo, no entanto, sem estabelecer quantidade mínima de farinha de trigo integral.

De acordo com dados do IBGE sobre pesquisa de Aquisição Alimentar Domiciliar realizada no período de 2008 a 2009, o consumo de pão de forma industrializado foi de 0,855 Kg/pessoa/ano, o que equivale a 2,3 g/pessoa/dia. Assim considerando-se esta quantidade, o consumo de pão industrializado tradicional e especial, fornecem menos de 1% das recomendações nutricionais para adultos de ferro e zinco, de acordo com a ANVISA (2005) que é de 14 mg/dia e 7 mg/dia, respectivamente. Mas se consideramos que a ingestão de uma pessoa seja em média 2 fatias de pão por dia, equivalente a 50 g (ANVISA, 2008) e que o teor médio de ferro e zinco no pão tradicional foi de 4,2 mg 100g⁻¹ e 0,51 100g⁻¹ respectivamente, e nos pães especiais 3,2 mg 100g⁻¹ de ferro 2 mg100⁻¹ de zinco, o pão tradicional forneceria em média 15,0% de ferro e 4,0% de zinco, enquanto que os pães especiais forneceria em média 11,4% de ferro e 14,3% de zinco das recomendações para adultos. Nota-se, então, que o consumo de pão tradicional forneceria uma maior quantidade de ferro em relação aos pães especiais, enquanto que os pães especiais forneceria uma quantidade maior de zinco.

Vale ressaltar que em geral, tanto o pão tradicional quanto os especiais não são consumidos isolados, podendo haver interações com outros alimentos e a quantidade destes minerais absorvida, pode ser aumentada ou diminuída de acordo com o alimento que acompanhará o consumo do mesmo.

Outro aspecto importante a ser observado é a razão molar entre ferro e zinco, apresentado na Tabela 6 abaixo.

TABELA 6. Razão Molar Fe:Zn

Amostra	Marca	Razão Molar
TRADICIONAL	A	12:1
	B	5:1
	C	8:1
INTEGRAL	A	2:1
	B	3:1
	C	1:1
7 grãos	A	3:1
	B	2:1
	C	1:1
9 grãos	A	2:1
	B	1:1
	C	1:1
12 grãos	A	2:1
	B	2:1
	C	2:1

PEDROSA e COZOLLINO (1993), através de um estudo realizado sobre o efeito do ferro na biodisponibilidade de zinco, constataram que a proporção em torno de 4:1 (Fe:Zn) é desfavorável para o aproveitamento do zinco.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, constatou-se que o pão tradicional possui uma razão molar Fe:Zn maior que 4:1, podendo, assim, prejudicar o aproveitamento do zinco pelo organismo.

Os outros pães (especiais), apresentaram razão molar Fe:Zn adequada ao aproveitamento dos dois nutrientes. Porém, vale ressaltar que os pães especiais apresentam alta quantidade de fibras e fitatos, que podem comprometer a absorção dos dois minerais pelo organismo.

Os pães especiais, provavelmente, apresentaram razão molar Fe:Zn adequada por possuírem um teor maior de zinco decorrente dos grãos presentes em sua formulação, enquanto que o pão tradicional possui apenas o zinco naturalmente presente na farinha.

O alto valor no teor de ferro encontrado no pão tradicional da marca A é preocupante, devido às propriedades oxidantes do ferro, estando relacionada a diversos problemas de saúde.

3.2. Determinação Umidade

A umidade foi determinada conforme procedimento descrito no item 2.2..

O ensaio de repetitividade indicou coeficiente de variação inferior a 2 %, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados para ensaio de repetitividade de umidade

Amostras de pães	TRADICIONAL	INTEGRAL	7 grãos	9 grãos	12 grãos
	33,8	32,0	39,3	34,3	34,0
	33,8	31,7	38,0	33,3	33,8
	33,8	31,7	38,1	33,2	33,4
	33,9	31,7	38,0	33,2	33,9
	33,9	31,9	39,3	33,2	33,9
	34,0	31,8	38,0	33,0	33,8
	34,0	31,7	38,0	33,1	33,7
média	33,9	31,8	38,4	33,3	33,8
DP	0,1	0,1	0,6	0,4	0,2
CV (%)	0,2	0,3	1,7	1,3	0,6

As tabelas 8 e 9 apresentam o teor de umidade dos pães analisados, bem como as faixas de concentrações e a análise estatística dos resultados.

Tabela 8. Teor de Umidade, concentrações e análise estatística

Amostra Pão Industrializado	Marca	Lote	Faixa de conc. % Umidade	% Umidade M ± DP	CV%	F* entre lotes	F* entre marcas
TRADICIONAL	A	1	33,6 - 34,0	33,8 ± 0,2	0,6	24,9	8,0
		2	34,7 - 35,1	34,9 ± 0,2	0,7		
		3	34,4 - 34,6	34,5 ± 0,1	0,3		
	B	1	33,7 - 33,8	33,8 ± 0,0	0,0	1,4	
		2	32,7 - 33,2	33,0 ± 0,3	4,9		
		3	32,8 - 32,9	32,9 ± 0,1	0,1		
	C	1	34,2 - 34,4	34,3 ± 0,1	0,4	6,2	
		2	34,7 - 35,4	35,0 ± 0,3	0,9		
		3	34,7 - 35,2	34,9 ± 0,3	0,8		
INTEGRAL	A	1	35,5 - 35,9	35,7 ± 0,2	0,5	15,9	22,3
		2	35,3 - 35,9	35,7 ± 0,4	1,0		
		3	36,7 - 37,0	36,9 ± 0,1	0,2		
	B	1	30,8 - 31,3	31,1 ± 0,3	0,8	61,6	
		2	32,8 - 32,8	32,8 ± 0,0	0,0		
		3	31,7 - 32,1	31,9 ± 0,2	0,6		
	C	1	29,9 - 30,2	30,1 ± 0,1	0,4	8,8	
		2	32,2 - 32,4	32,3 ± 0,1	0,4		
		3	30,6 - 32,8	32,0 ± 1,2	3,8		
7 grãos	A	1	37,2 - 38,4	37,9 ± 0,6	1,7	1,0	18,3
		2	38,2 - 39,0	38,5 ± 0,5	1,2		
		3	37,8 - 38,6	38,2 ± 0,4	1,1		
	B	1	32,1 - 32,3	32,2 ± 0,1	0,3	1,0	
		2	27,8 - 27,8	27,8 ± 0,0	0,1		
		3	32,0 - 33,1	32,4 ± 0,6	2,0		
	C	1	33,6 - 33,7	33,6 ± 0,0	0,1	0,0	
		2	33,4 - 33,8	33,6 ± 0,2	0,6		
		3	33,4 - 33,8	33,6 ± 0,2	0,8		
9 grãos	A	1	34,1 - 34,4	34,2 ± 0,2	0,6	17,9	9,8
		2	33,0 - 33,6	33,2 ± 0,3	1,0		
		3	33,2 - 34,3	33,6 ± 0,6	1,8		
	B	1	31,5 - 31,8	31,7 ± 0,2	0,5	7,9	
		2	32,1 - 32,2	32,1 ± 0,1	0,2		
		3	31,8 - 32,0	31,8 ± 0,2	0,5		
	C	1	32,9 - 33,0	33,0 ± 0,0	0,1	150,6	
		2	33,2 - 33,5	33,3 ± 0,1	0,4		
		3	34,3 - 34,6	34,5 ± 0,1	0,4		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Tabela 9. Teor de Umidade, concentrações e análise estatística

Amostra	Marca	Lote	Faixa de conc.	% Umidade	CV%	F*	F*
Pão Industrializado			% Umidade	M ± DP		entre lotes	entre marcas
12 grãos	A	1	34,0 - 34,2	34,1 ± 0,1	0,3	14,9	1,4
		2	34,0 - 34,1	34,0 ± 0,1	0,2		
		3	34,2 - 34,5	34,4 ± 0,1	0,4		
	B	1	35,1 - 35,2	35,1 ± 0,0	0,1	42,4	
		2	35,3 - 35,6	35,0 ± 0,2	0,5		
		3	36,0 - 36,3	36,2 ± 0,2	0,4		
	C	1	36,4 - 36,6	36,5 ± 0,1	0,3	47,7	
		2	34,1 - 34,7	34,3 ± 0,4	1,1		
		3	33,4 - 34,4	33,8 ± 0,5	1,5		

*F Calculado, F tabelado 5,1

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA fator único, ao nível de 95% de confiança, indicando diferença significativa entre os lotes da marca A e C e entre as marcas A, B e C do pão tradicional; entre os lotes e entre as marcas A, B e C do pão integral; entre as marcas A, B e C do pão 7 grãos; entre os lotes e as marcas A, B e C do pão 9 grãos e entre os lotes das marcas A, B e C. Entre os lotes das marcas A, B e C do pão 7 grãos e entre as marcas A, B e C do pão 12 grãos não houve diferença significativa.

Por não existir recomendação específica em relação ao coeficiente de variação (CV) para análises realizadas em triplicatas, foi utilizado como parâmetro, o recomendado no Guia para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA (2003) onde os resultados não devem exceder 15% de CV. A variação obtida nos resultados em relação ao CV para a umidade foram de 0 a 4,9% , estando assim, dentro do recomendado pela ANVISA.

Os valores encontrados para o parâmetro de umidade para o pão tradicional estão de acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 90 de 18 de outubro de 2000 o valor máximo para o teor de umidade em pão preparado, exclusivamente, com farinha de trigo comum ou farinha de trigo especial (sêmola/semolina de trigo) deve ser de 38%, contudo para os outros tipo de pães não existe legislação. Porém, com exceção dos lotes 1 e 2 da marca A do pão tipo

7 grãos, os outros pães estão de acordo com a resolução da ANVISA (2000), mesmo não sendo preparados exclusivamente com farinha de trigo.

3.3. Análise de PCA

Com o objetivo de avaliar a distribuição de ferro, zinco e umidade nas amostras de pães disponíveis comercialmente, foi realizada uma Análise por Componentes Principais (PCA) modelada com 3 componentes principais, ferro (Fe), zinco (Zn) e Umidade (Um) correspondendo a 100% de informação dos dados conforme a Figura 1.

Para facilitar a representação dos dados utilizou-se as seguintes notações para as amostras de pães:

- 01 a 09 - pão tradicional (1 a 3 marca A; 4 a 6 marca B; 7 a 9 marca C)
- 10 a 18 - pão integral (10 a 12 marca A; 13 a 15 marca B; 16 a 18 marca C)
- 19 a 27 - pão 7 grãos (19 a 21 marca A; 22 a 24 marca B; 25 a 27 marca C)
- 28 a 36 - pão 9 grãos (28 a 30 marca A; 31 a 33 marca B; 34 a 36 marca C)
- 37 a 45 - pão 12 grãos (37 a 39 marca A; 40 a 42 marca B; 43 a 45 marca C)

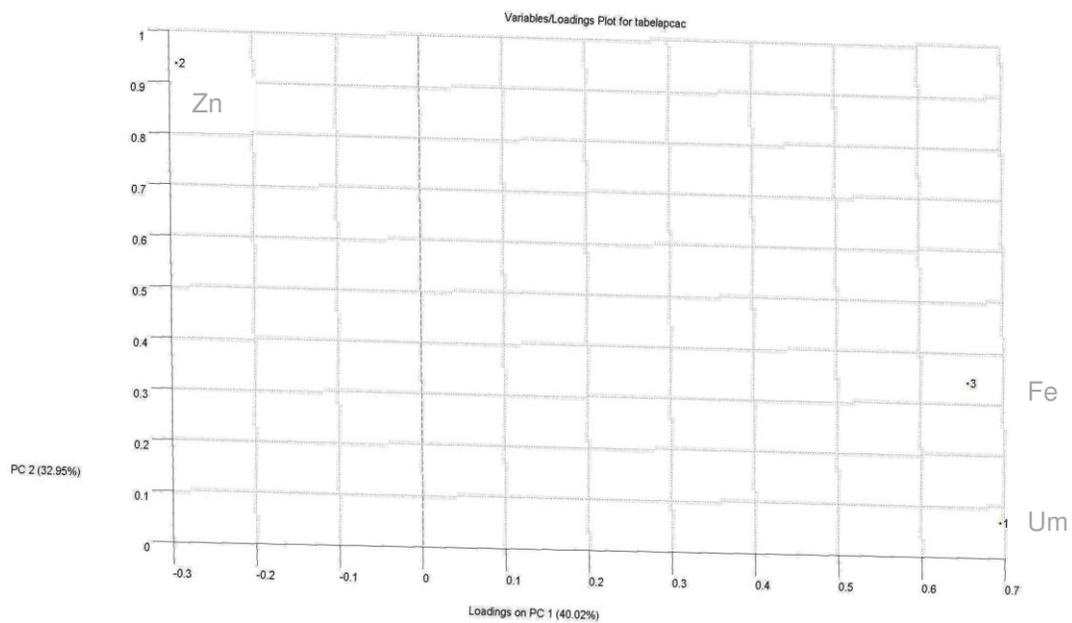
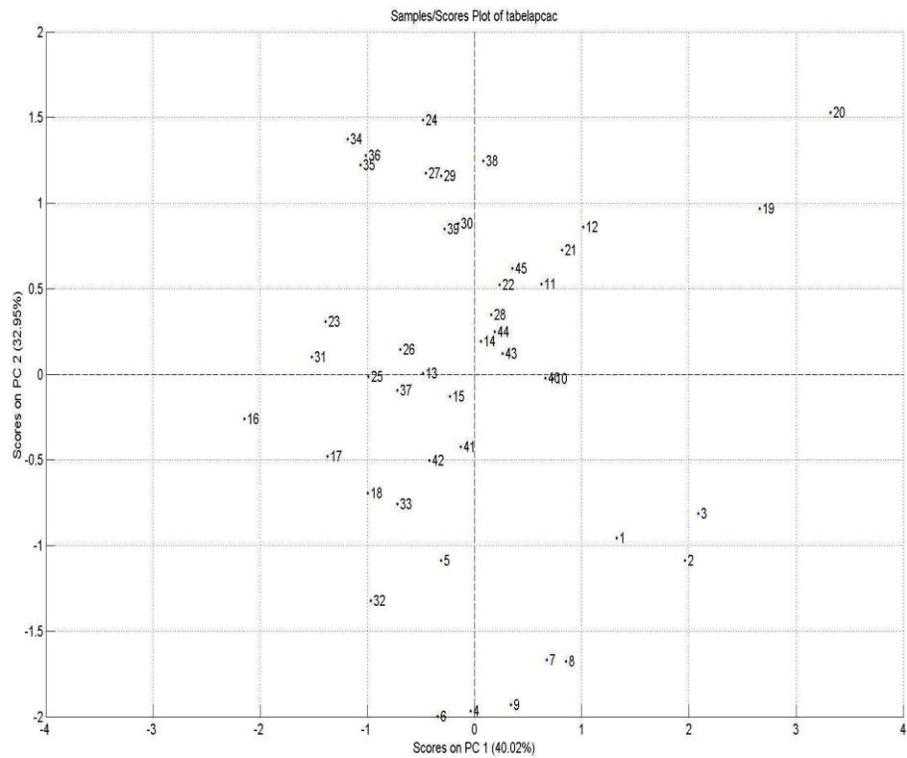


Figura 1– Contribuição de cada variável (Um – umidade, Zn – zinco e Fe – ferro) na separação de amostras de pães. Pão tradicional = 1 a 9, pão integral = 10 a 18, pão 7 grãos = 19 a 27, pão 9 grãos = 28 a 36, pão 12 grãos = 37 a 45.

Os dados obtidos pela análise de PCA demonstraram um maior teor de ferro na marca A do pão tradicional e um maior teor de zinco na marca C do pão 9 grãos. Apesar desta classificação, os dados da análise indicaram haver pouca homogeneidade na distribuição de ferro e zinco entre lotes e marcas não sendo possível uma classificação das amostras em relação à concentração dessas variáveis de acordo com o tipo de pão. O ferro e o zinco se distribuem aleatoriamente nas amostras em decorrência da distribuição heterogênea de ferro nas farinhas e do tipo de grão utilizado em cada tipo de pão.

Para o teor de umidade não foi possível uma classificação dos diferentes tipos de pães, pois os mesmos não apresentaram nenhum tipo de agrupamento.

4. Conclusões

Para as amostras analisadas foram encontradas variações nos teores de ferro e zinco, indicando assim uma falta de uniformidade tanto entre lotes da mesma marca, como também em marcas diferentes para o mesmo tipo de pão. Esse comportamento pode acarretar problemas na avaliação dos resultados da campanha de fortificação de alimentos, já que a diferença do teor dos minerais analisados foram encontrados inclusive em lotes diferentes da mesma marca.

Não existe ainda legislação que regulamente a formulação de pães especiais, assim cada fabricante pode usar os ingredientes que desejar. Em consequência disto, os teores de ferro e zinco variam bastante, provavelmente, em função das diferenças nos tipos e/ou quantidades de grãos adicionados.

Outro dado de grande importância obtido neste trabalho é que a razão molar entre ferro e zinco para os pães tradicional está acima dos padrões desejados (4:1), o que pode ser desfavorável para o aproveitamento do zinco.

Sendo assim, é de grande importância que seja aperfeiçoada a adição e homogeneização de micronutrientes nos veículos fortificados, como a farinha, e a criação de uma legislação sobre o produto final, que utiliza como ingrediente principal os veículos fortificados e grãos.

5. Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto.

6. Referências Bibliográficas

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Análise do mercado de pães, 2002/2003, **2005**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em 01/06/2005.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Pães Consumidos no Brasil, **2009**. Disponível em: <http://www.abip.org.br/perfil> . Acesso em 21/05/2012.

ABIP. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria. Panificação fatura R\$ 63 bilhões em 2011, **2012**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em: 11/05/2012

AMESTY, V.A.; Pereira, M.N.G.JR.; García, D.; Vicente, V.M.; Granadillo, V. Concentraciones séricas de zinc em niños com diferentes grados de déficit nutricional. Invest Clin;47:349-59, **2006**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria RDC nº 90, de 17 de outubro de **2000**. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78pao.htm. Acesso em: 11/05/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29/05/**2003**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 269, **2005**. Disponível em: www.anvisa.org.br. Acesso em 01/12/2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de orientação aos consumidores, **2008**. Disponível em: www.anvisa.org.br/alimentos/rotulos/manual_consumidor.pdf. Acesso em 22/06/2012.

ASSUMPÇÃO, B.R. Gergelim: a semente da saúde. São Paulo: Alaúde Editorial, **2008**.

ANTUNES, M.F.R. Interação competitiva do zinco e do ferro após administração oral e venosa de zinco em crianças eutróficas. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rio Grande do Norte, **2010**

BODIGA, S.; Krishnapillai, M.N. Concurrent repletion of iron and zinc reduces intestinal oxidative damage in iron and zinc deficient rats. World J Gastroenterol;13:5707-17, **2007**.

BRUM, P.A.R.; Zanotto, D.L.; Lima, G.J.M.M.; Caron, L.; Colvara, I.G. Determinação de valores de composição química e da energia metabolizável de ingredientes para aves. CT/236/Embrapa Suínos e Aves, p. 3, julho, 1999

CASTRO, M.L.C.; Veloso, M.M.N.; Pereira, J.O.; Oliveira, L.F. Rendimento industrial e composição química de milho de alta qualidade protéica em relação a híbridos comerciais. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, V. 39, n 3 , p. 239, jul/set, **2009**.

COLE, J.N. Amaranth:from the past, for the future, Rodale Press, Emmaus, PA, **1979**.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole, v. 1. p. 878, **2005**.

CUNHA, D.F.; Cunha, S.F.C. Microminerais: In: Dutra-de Oliveira JE & Marchini JS. Ciências Nutricionais. Sarvier; São Paulo, p. 141-165, **1998**.

ESTELLER, M.S. Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento. São Paulo, p. 248. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), **2004**.

FERRAZ, I.S.; Daneluzzi, J.C.; Vannuchi, H.; Jordão, Jr.A.A.; Ricco, R.G.; Del Ciampo, L.A. Nível sérico de zinco e sua associação com deficiência de vitamina A em crianças pré-escolares. J Pediatr (Rio J) ;83:512-7, **2007**.

FERREIRA, K.S.; Gomes, J.C.; Reis, C.; Bellato, C.R. Concentrações de zinco em alimentos consumidos no Brasil. Revista Ceres, 49 (283): 309-319, **2002**.

GIBSON, R.S. Assessment of trace-element status. In:Gibson RS, editor. Principles of nutritional assessment. New York: Oxford University Press; p. 511-53, **1990**.

HANSEN, M.; Baech, S.B.; Thomsen, A.D.; Tetens, I.; Sandstrom, B. Long-term intake of iron fortified wholemeal rye bread appears to benefit iron status of young women. Journal of Cereal Science 42: 165-171, **2005**

KORDAS, K.; Stoltzfus, R.J. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. J Nutr. ;134:1295-8, **2004**.

LEE, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 5ª edição. Editora Edigar Blucher, Ltda. São Paulo, p. 381, 425, **2001**.

LOBO, A.S.; Tramonte, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. Rev. Nutr., Campinas, 17(1):107-113, jan/mar., **2004**.

LOPES, C.O.; Dessimoni, G.V.; Silva, M.C.; Vieira, G.; Pinto, N.A.V.D. Aproveitamento, composição nutricional e antinutricional da farinha de quinoa. Alim. Nut. Araraquara. v.20, n. 4, p. 672, out/dez, **2009**.

LUCOCK, M.D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. Molecular Genetics and Metabolism, 71: 121-138, **2000**.

MACEDO, E.M.C.; Amorim, M.A.F.; Silva A.C.S.; Castro, C.M.B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. Rev. Paul. Pediatr;28(3):329-36, **2010**.

McMAHON, R.J.; Cousins, R.J. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. Proc Natl Acad Sci USA;95:4841-6, **1998**.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M. The importance of zinc in human nutrition. Rev. Nutr. ;17:7987, **2004**.

MARTINEZ, A.B.O; Berruezo, G.R.; Cava, M.J.B.; Gracia, C.M.; Caston, M.J.P. Estimacion de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico em alimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 559(1): 5-14, **2005**.

MIRET, S.; Simpson, R.J.; Mckie, A.T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. Annual Review of Nutrition, 23: 283-301, **2003**.

NABESHIMA, E.H.; Ormenese, R.C.S.C.; Montenegro, F.M.; Toda, E.; Sadahira, M.S. Propriedades tecnológicas e sensoriais de pães fortificados com ferro. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(3): 506-511, jul.-set. **2005**.

NUNES, R.V.; Rotagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Gomes, P.C.; Toledo, R.S. Composição bromatologica, energia metabolizável e equações de predição da energia do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. Rev. Bras. Zootec., 30(3) p. 788, **2001**.

OKIGAMI, H. J. Biomolec. Med. Free Rad. vol. 2, nº 2, **1996**.

OTTESON, B.N.; Mergoum, M.; Ransom, J.K. Seeding rate and nitrogen management on milling and baking quality of hard red spring wheat genotypes. Crop Science 48, 749–755, **2008**.

PARK, K.J.; Antonio, G.C. Análises de materiais biológicos. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola, **2006**. Disponível em:

www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf. Acesso em 17/07/2012

PEDROSA, L.F.; Cozzolino, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v.27, n.4, p.266-270, **1993**.

RASCO, B.A.; GAZZAZ, S.S.; DONG, F.M. Iron, Calcium, Zinc, and Phytic Acid Content of Yeast-Raised Breads Containing Distillers' Grains and Other Fiber Ingredients. *Journal of food composition and analysis* 3, p. 88-95, **1990**.

SILVA, G.S.C.; Pallone, J.A.L. Validação de Metodologia por Espectrometria de Absorção Atômica de chama (FAAS) para avaliação de ferro e zinco em pães industrializados. Tese de Mestrado, Faculdade Engenharia de Alimentos, Departamento Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, **2012**.

SOLOMONS, N.W. Competition mineral-mineral interaction in the intestine: implications for zinc absorption in humans. In: Inglett, G.E. ed. *Nutritional bioavailability of zinc*. Washington, American Chemical Society; p. 247-72, **1983**.

SOLOMONS, N.W. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. *J. Nutr.*, 116: 927-35, **1986**.

SOUZA, E.J.; Martin, J.M.; Guttieri, M.J.; O'Brien, K.M.; Habernicht, D.K.; Lanning, S.P.; McLean, R.; Carlson, G.R.; Talbert, L.E.. Influence of genotype, environment, and nitrogen management on spring wheat quality. *Crop Science* 44, 425–432, **2004**.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **2006**. Disponível em unicamp.br/nepa/taco. Acesso em 15/02/2010.

WIERINGA, F.T.; Dijkhuizen, M.A.; West, C.E. Iron and zinc interactions. *Am J Clin Nutr.* ;80:787-8, **2004**.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr.*;1309(Suppl 5):1350-4S, **2000**.

YANAGISAWA, H. Zinc deficiency and clinical practice: validity of zinc preparation. *Yakugaku Zasshi*; 128:333-9, **2008**.

XIAOPENG, G.; Odean, M. L.; Cynthia, A.G. Grain concentrations of protein, iron and zinc and bread making quality in spring wheat as affected by seeding date and nitrogen fertilizer management. *Journal of Geochemical Exploration*, **2012**.

CONCLUSÕES GERAIS

O método desenvolvido e validado para determinação de ferro e zinco em pães industrializados se mostrou adequado, simples e rápido, sendo assim importante ferramenta para avaliação da fortificação alimentar.

Nos pães tradicional e especiais analisados observou-se que eles fornecem menos de 1% das recomendações nutricionais para adultos de ferro e zinco, de acordo com a ANVISA (2005) que é de 14 mg/dia e 7 mg/dia, respectivamente. Mas se consideramos que a ingestão de uma pessoa seja em média 2 fatias de pão por dia (equivalente a 50 g, ANVISA) e que o teor médio de ferro e zinco no pão tradicional foi de 4,2 mg 100g⁻¹ e 0,51 mg 100g⁻¹ respectivamente, e nos pães especiais 3,2 mg 100g⁻¹ de ferro 2 mg100⁻¹ de zinco, o pão tradicional forneceria em média 15% de ferro e 4% de zinco, enquanto que os pães especiais forneceriam em média 11,4% de ferro e 14,3% de zinco das recomendações para adultos.

Outro dado de grande importância obtido neste trabalho é que a razão molar entre ferro e zinco para os pães tradicional está acima dos padrões desejados (4:1), o que pode ser desfavorável no aproveitamento do zinco.

Não existe ainda legislação que regule a formulação de pães especiais, assim cada fabricante pode usar o que desejar. Em consequência disto, os teores de ferro e zinco variam bastante, provavelmente, em função dos grãos adicionados. Assim, alguns pães elaborados com menos tipo de grãos apresentaram maiores concentrações de ferro e zinco quando comparados aos pães elaborados com mais tipos de grãos.

Sendo assim, é de grande importância que seja aperfeiçoada a adição e homogeneização de micronutrientes nos veículos fortificados, como a farinha, e a criação de uma legislação sobre o produto final, que utiliza como ingrediente principal o veículo fortificado e grãos.