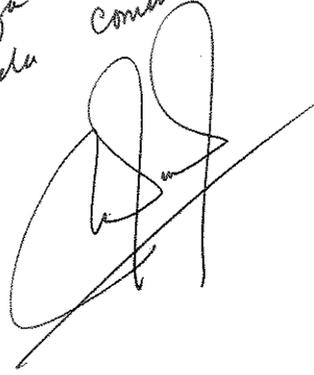


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

*Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por Dilza Maria Bassi Mantovani e aprovada pela Comissão julgadora.*



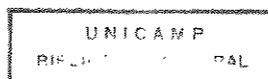
ESPECIAÇÃO DE FERRO EM CONCENTRADO DE TOMATE

TESE DE MESTRADO

Dilza Maria Bassi Mantovani

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Campinas  
1989



Aos meus pais  
DARCY e EROTYDES

Ao meu esposo  
AMÉRICO

Aos meus filhos  
DIEGO e JULIANA

## AGRADECIMENTOS

- \* Ao Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim, pelo incentivo, amizade e orientação deste trabalho.
- \* Ao Instituto de Química da UNICAMP pelos conhecimentos adquiridos e realização deste trabalho.
- \* Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos- ITAL, pela oportunidade e facilidades concedidas, tornando possível a realização desta pesquisa.
- \* À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pela concessão de bolsa de apoio à pesquisa.
- \* Ao Pesquisador Dr. Eidiomar Angelucci, pela cooperação e orientação deste trabalho.
- \* À Pesquisadora Marilene Iaderoza, pelo incentivo, apoio e amizade.
- \* Aos Pesquisadores Yuriko, Iacy, Cássia, Paulo, Roberto e Jorge pelos valiosos auxílios, sugestões e incentivo.

\* Ao técnico José Carlos Simão Jr, pela dedicada colaboração na execução deste trabalho, e aos demais funcionários da Seção de Química do ITAL que, de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

\* À dedicada colaboração da bibliotecária Antonieta Mattos.

\* À Vera M. B. Luporini, pela correção de vernáculo.

\* À todos aqueles que contribuindo de algum modo, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho e ofereceram-me suas amizades.

## ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Especificação em água.....	4
1.2 Especificação em alimentos.....	6
1.3 Métodos analíticos para especificação.....	8
1.4 A importância da especificação do ferro em aliment- tos.....	18
1.4.1 Química do ferro.....	23
1.4.2 Fatores que afetam a eficiência da as- similação do ferro presente no alimento..	26
1.4.3 A química do ferro em alimentos proces- sados.....	29
2 OBJETIVO.....	32

3	MATERIAIS.....	33
3.1	Amostra.....	33
3.2	Vidraria.....	33
3.3	Reagentes.....	33
4	MÉTODOS.....	34
4.1	Preparo da amostra para análise.....	34
4.2	Determinações preliminares.....	34
4.2.1	pH.....	34
4.2.2	Grau Brix.....	34
4.2.3	Cloreto de sódio.....	35
4.2.4	Acidez total.....	35
4.2.5	Cromatografia de ácidos orgânicos.....	35
4.3	Determinação quantitativa do ferro.....	36
4.3.1	Quantificação por espectrofotometria de absorção atômica.....	38
4.3.2	Quantificação do ferro por espectrofotome- tria no visível, com 2-2'-dipiridila....	39
4.3.2.1	Ensaio com cloridrato de hidro- xilamina.....	40
4.4	Tratamentos preliminares da amostra para deter- minação do ferro total.....	43
4.4.1	Digestão com ácido clorídrico concentra- do.....	43

4.4.2	Digestão com ácido nítrico (1 M) e peróxido de hidrogênio (30 volumes).....	44
4.5	Determinação do ferro elementar.....	46
4.6	Determinação do ferro solúvel.....	46
4.7	Determinação da fração ferrosa mais férrica.....	47
4.8	Determinação da fração ferrosa.....	47
4.9	Determinação da fração orgânica do ferro.....	47
4.10	Avaliação do procedimento.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Determinações preliminares.....	50
5.2	Verificação da precisão dos métodos.....	51
5.3	Quantificação do ferro.....	57
5.4	Oxidação do Fe(II) em concentrado de tomate.....	59
5.4.1	Curva de oxidação do Fe(II), em solução aquosa.....	59
5.4.2	Variação nas concentrações das diversas espécies do ferro.....	62
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
01.	Efeito da concentração dos elementos sobre o crescimento (atividade biológica).....	2
02.	Esquema analítico para especificação do cobre em ervilhas e em soja.....	13
03.	Esquema analítico para especificação do níquel em café, chá e vinho tinto.....	14
04.	Espécies químicas do ferro que podem ocorrer em alimentos.....	22
05.	Concentração de íons férricos e ferrosos presentes em solução em função do pH.....	25
06.	Análise das várias formas químicas do ferro em uma amostra de alimento.....	37

07.	Variação na concentração de ferro iônico (mg/kg) em função do tempo para o ensaio com cloridrato de hidroxilamina.....	42
08.	Curva-padrão para o ferro obtida pelo método por espectrofotometria de absorção atômica.....	52
09.	Curva-padrão para o ferro obtida pelo método espectrofotométrico.....	53
10.	Curva-padrão original e curva pelo método da adição de padrão por espectrofotometria de absorção atômica.....	55
11.	Curva-padrão original e curva pelo método da adição de padrão no método espectrofotométrico.	56
12.	Curva de oxidação do Fe(II) no concentrado de tomate, em solução aquosa, em duas condições..	61
13.	Placas com amostras para estudo da variação das várias espécies do ferro.....	63
14.	Variação das concentrações das diversas espécies do ferro.....	65

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA		Página
I.	Especiação do níquel em café, chá e vinho tinto.	15
II.	Especiação do estanho em sucos de limão.....	16
III.	Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN-ELMER, modelo 5.000 para determinação do ferro.....	39
IV.	Concentração do ferro iônico (mg/kg), pelo ensaio com cloridrato de hidroxilamina.....	41
V.	Resultados obtidos nos tratamentos preliminares da amostra, para determinação do ferro total....	45
VI.	Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN-ELMER, modelo 303, para determinação do ferro orgânico.....	48

VII.	Percentagem de recuperação do teor de ferro adicionado na amostra nos níveis de 25,00 50,00 100,00 mg/kg.....	49
VIII.	Determinações preliminares no concentrado de tomate .....	51
IX.	Concentração (mg/kg) das diferentes espécies química do ferro em concentrado de tomate.....	57
X.	Concentração de Fe(II), em solução aquosa, em duas condições, em função do tempo.....	60
XI.	Variação na concentração do ferro, em suas diferentes espécies, em função do tempo.....	64

## RESUMO

A presente pesquisa visou estabelecer um protocolo para a caracterização qualitativa e quantitativa das diversas formas do ferro (especiação) presentes em concentrato de tomate.

Neste estudo de especiação foram adaptados dois métodos analíticos; a espectroscopia de absorção atômica (EAA) foi utilizada para a quantificação do ferro total presente na amostra, enquanto as determinações das espécies Fe(II) e Fe(III) foram feitas por espectrofotometria, na região do visível, utilizando o reagente 2-2'-dipiridila.

Nas amostras de concentrado de tomate, para uma concentração total média de ferro em torno de 50 mg/kg, a fração solúvel se faz presente com cerca de 89 %. Desta quantidade, 98 % apresentaram-se na forma iônica, ou seja, nas formas Fe(II) e Fe(III). A concentração da fração ferrosa, Fe(II), representou 85 %, enquanto 15 % do metal solúvel apresentaram-se na forma férrica Fe(III). Em relação à concentração total do metal, 9 % corresponderam às espécies insolúveis, enquanto o ferro fortemente complexado participou com pouco mais de 2 %.

Devido à biodisponibilidade do ferro estar diretamente relacionada à presença de Fe(II), foi verificada a velocidade de oxidação desta espécie durante um período de estocagem da amostra em refrigerador, procurando reproduzir as condições reais de con-

sumo do produto. Enquanto a concentração do ferro total, do solúvel e do iônico permaneceram praticamente constantes durante este tratamento, a concentração da espécie Fe(II) foi reduzida em até 80 % do seu valor original com um aumento concomitante na concentração na forma oxidada do metal. Esta alteração na especiação do ferro pode acarretar numa perda do seu valor nutricional.

## ABSTRACT

This work was centered on the development of a protocol to infer iron speciation in canned tomato paste.

Two major analytical techniques were employed in this study. The atomic absorption spectrophotometry (AAS) was used to quantify the total amount of iron present in the sample, whereas the Fe(II) and the Fe(III) species were determined using visible spectrophotometry using the 2-2'-dipyridil.

In the canned tomato paste samples, to an average total iron concentration of 50 mg/kg, the soluble fraction was 89 %. From this amount, 98 % were due to the ionic forms of Fe(II) and Fe(III). In computing the soluble fraction, 85 % was in the ferrous form and the remaining 15 % as Fe(III). Taking the total metal concentration as reference, 9 % of the iron were in present as insoluble and 2 % in strongly complexed forms.

Since the iron bioavailability is related to the metal speciation, the oxidation rate of the product was investigated under experimental conditions similar to those used for its consumption. It has been noticed that, while the total iron concentration as well as the concentration of soluble iron remained constant for up to 10 days, the concentration of the Fe(II) species decreased in up 80 % of its original value. This modification in the iron speciation can potentially alter the metal nutritional value.

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza encerra pouco menos de uma centena de elementos, dos quais 26 são de interesse para a vida animal (7, 24, 66). Destes, 11 são macro-elementos, a saber: cálcio, carbono, cloro, enxofre, fósforo, hidrogênio, magnésio, nitrogênio, oxigênio, potássio e sódio e os 15 restantes são geralmente conhecidos como elementos-traços. Estes são arsênio, cobre, cobalto, crômio, estanho, ferro, flúor, iodo, manganês, molibdênio, níquel, selênio, silício, vanádio e zinco (66).

Os elementos ferro, iodo, cobre, manganês, zinco, cobalto, molibdênio, selênio, estanho, silício e flúor são considerados essenciais (17, 24, 26). Outros são descritos como benéficos, mas não são reconhecidos como essenciais; exemplos são o níquel, o vanádio e o bromo (24, 26). O chumbo, o cádmio, e o mercúrio são elementos-traços considerados tóxicos, mesmo em concentrações relativamente baixas (66).

A saúde humana pode ser prejudicada pelo excesso ou deficiência de um elemento essencial. Também pode ser afetada por um elemento não essencial (26). Assim, para todos esses elementos existe uma faixa favorável de concentração que os situa como tóxicos ou essenciais (17, 66). Um elemento que é indispensável para uma função normal do corpo pode ser altamente tóxico quando presente em altas concentrações. Alguns elementos essenciais, tais como o vanádio e o selênio, podem ser muito mais tóxicos do que alguns não essenciais, como o mercúrio ou o tálio (17).

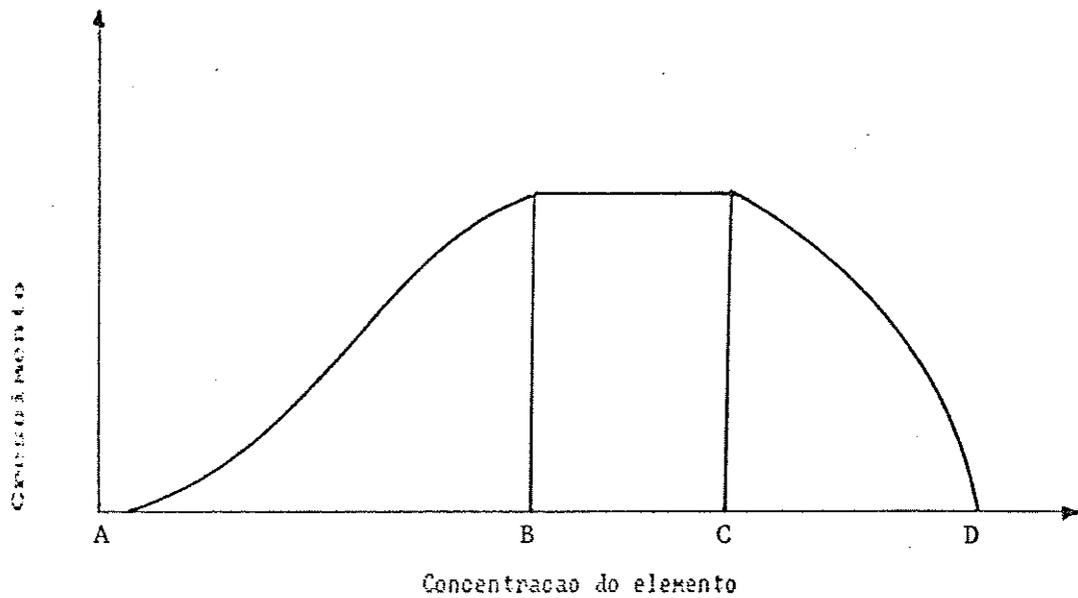


FIGURA 01. Efeito da concentração dos elementos sobre o crescimento (atividade biológica).  
 A - B : deficiência ; B - C : atividade biológica máxima ( concentração intermediária entre níveis essenciais e tóxicos ) ;  
 C - D : concentração tóxica ou adversa.  
 Conforme SCHWEDT (59).

Para se estudar a toxicidade, biodisponibilidade, bioacumulação e transporte destes elementos, são necessárias informações adicionais à sua simples concentração total (18, 59). Para essas propriedades e processos, a especiação fornece muitas informações necessárias (59).

A concentração total do metal é importante para a verificação do balanço de massa. Entretanto, é uma informação adicional e não a principal

A especiação de um elemento é a determinação das suas formas físicas e químicas individuais, numa dada matriz, as quais, juntas, constituem sua concentração total (17, 18). As formas físicas nas quais eles podem ser encontrados incluem material particulado, colóides (inorgânicos ou orgânicos) e formas adsorvidas (íons metálicos ou compostos). As formas químicas incluem íons metálicos hidratados e os complexos orgânicos e inorgânicos de baixa ou alta estabilidade (59).

## 1.1 Especificação em água

A atividade humana tem contribuído com o aumento da concentração de metais no nosso sistema de águas naturais. O escoamento de minas, os efluentes industriais e domésticos, os resíduos da agricultura, as chuvas ácidas, dentre outros, são fontes que aumentam a carga de metais nestes corpos receptores. Como resultado, maior atenção vem sendo dispensada ao estudo da concentração e transporte de metais e seus efeitos no meio ambiente (49).

Um dos aspectos mais importantes que distingue os metais dos demais poluentes tóxicos é o de não serem biodegradáveis e que, uma vez presentes no ambiente, seu potencial tóxico é controlado quase que totalmente por suas formas físicas e químicas (17).

Conhecimentos da especificação química de elementos-traços em águas naturais são essenciais para a interpretação do ciclo biológico ou geoquímico desses elementos (43). Também são necessários para se estudar a sua toxicidade para os organismos aquáticos, assim como para compreender o seu transporte em rios e estuários (1, 17, 18).

A variação nas espécies dos elementos-traços pode alterar a sua toxicidade. Diversos estudos da toxicidade de metais pesados em peixes têm mostrado que o íon metálico hidratado é a forma mais tóxica (17, 18). No caso do elemento cobre, a sua toxicidade em água é maior quando este ocorre como espécie iônica do que quando ocorre organicamente ligado (1). Assim, uma amostra

de água com alta concentração de cobre total pode, de fato, ser menos tóxica do que uma outra contendo este metal em menores concentrações (59).

Geralmente, em água, os íons metálicos hidratados são mais tóxicos do que outras formas (59). Muitos complexos estáveis e espécies associadas com partículas coloidais não são tóxicos (18). Contudo, há exceção para essa regra, como é o caso dos complexos de metais que são lipossolúveis. Complexos lipossolúveis podem penetrar rapidamente na biomembrana e causar reações altamente prejudiciais às células (18).

A poluição causada pelo homem, pode gerar metais diretamente na forma tóxica, como é o caso das lixívias de cobre e minas, ou pela redução do pH da água, através de chuvas ácidas, que podem converter uma forma inativa do metal, tal como o hidróxido de alumínio polimerizado em uma espécie reativa, como é o caso do  $Al(OH)_2^+$  (17).

## 1.2 Especificação em alimentos

Alimentos são a principal fonte de elementos-traços no metabolismo humano. Outras fontes são a água e o ar (68).

Para que um composto inorgânico exerça um efeito benéfico ou prejudicial, ele deve primeiro ser absorvido pelo corpo e distribuído para certos órgãos e tecidos. Este processo global é denominado de biodisponibilidade do elemento (ou composto) e tem sido um dos campos mais investigados nas últimas décadas (15).

Em alimentos, a questão da biodisponibilidade é de importância, o que pode ser demonstrado pelos elementos cobalto, mercúrio e chumbo. Somente a espécie de cobalto presente na cianocobalamina (vitamina B12) é que pode ser absorvido pelo organismo. Os alquilcompostos de mercúrio e chumbo são as formas mais tóxicas desses elementos devido à sua lipossolubilidade (15, 17, 59). Materiais como os haletos de chumbo, proveniente dos escapes dos automóveis podem penetrar nos pulmões e serem absorvidos diretamente pela corrente sanguínea (17, 18).

As mudanças no estado de oxidação de um elemento também podem afetar sua biodisponibilidade e toxicidade, como pode ser demonstrado para os elementos crômio e arsênio. O crômio (III) é essencial no metabolismo da glicose e dos lipídeos, enquanto o crômio (VI) é altamente tóxico devido à sua habilidade para oxidar outras espécies (59, 63). Também o arsênio (III) é potencialmente mais tóxico do que o arsênio (V) (17, 59).

Mudanças na dieta também podem diminuir a biodisponibilidade de elementos-traços. Alimentos com alto teor de fibra e de

proteína de soja adsorvem elementos essenciais e podem causar deficiência de minerais (17).

Minerais provenientes de cereais, legumes e outras plantas alimentícias, quando comparados com os minerais provenientes de fontes animais, são geralmente pouco utilizados pelo homem e outros animais monogástricos (14). Fatores exógenos e endógenos têm sido implícitos como causa da redução da absorção de minerais de alimentos de origem vegetal. O ácido fítico, fibras e certos aminoácidos e proteínas formam quelatos com os minerais (14, 17, 59).

Os peritos do JECFA (Joint FAO/WHO\* of Expert Committee on Food Additives) consideram que o estanho cedido pela lata de folha-de-flandres é de origem mineral (64). O estanho no estado iônico, como se encontra normalmente nos alimentos, em conserva ou não, é muito pouco tóxico (64, 68). Entretanto, nos compostos orgânicos, principalmente aqueles onde o estanho se encontra no estado estânico podem ser tóxicos, mais precisamente neurotóxicos (64).

\* FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization

### 1.3 Métodos analíticos para especiação

O desenvolvimento de métodos analíticos aplicáveis na especiação de metais-traços é uma área que até o momento apresenta um grande desafio. Isto se aplica particularmente aos metais de transição, alguns dos quais não somente se apresentam em mais de um estado de oxidação, mas também como espécies catiônicas, aniônicas e neutras (65).

A condição básica para especiação de elementos-traços é a possibilidade de se determinar quantitativamente cada uma das formas do metal presente, independentemente e sem interferência de outras formas (65).

A subdivisão da concentração total (geralmente baixa) em várias frações para especiação é, obviamente, uma tarefa difícil, dependendo não só da sensibilidade do método analítico mas também da habilidade do analista (17). Bio-ensaios, voltametria, troca iônica, eletrodos seletivos de íons e separação molecular são algumas dessas técnicas que têm se tornado poderosas ferramentas nestes estudos (16, 18, 30).

Em 1978, YASUI et alii (72) desenvolveram um método seletivo para a determinação de arsênio inorgânico (III) e (V) e arsênio orgânico em material biológico. A espécie As(III) dissolvida em solução de ácido clorídrico 9 M foi extraída com tolueno. A seguir, a espécie As(V), após sua redução com iodeto de potássio, foi extraída nas mesmas condições. O arsênio orgânico foi conservado na solução de ácido clorídrico. A quantificação foi efetuada em espectrofotômetro de absorção atômica.

Devido à utilização de herbicidas à base de compostos arseniacais, tais como o ácido monometilarsônico (MA) e o ácido dimetilarsênico (DMA), tornou-se necessário estudar as diversas formas do arsênio presentes em descarte de irrigação, plantas, tecidos, animais, sangue e urina. LAKSO et alii (36) trabalharam com métodos espectrofotométricos quantitativos para detectar baixas concentrações de As(III), As(V), MA e DMA nas amostras. As espécies de arsênio foram volatilizadas em suas correspondentes arsinas, após redução com boridreto de sódio. A arsina e a metilarsina formam dois diferentes complexos coloridos com o dietil-ditiocarbamato de prata, cujas absorbâncias máximas são de 540 nm e 440 nm respectivamente.

HART & DAVIES (22) em estudos realizados no rio Yarra (Austrália) e seus estuários sobre o cádmio, o cobre, o chumbo, o zinco e o ferro, mostraram que o uso de um esquema relativamente simples de especiação analítica envolvendo filtração em membrana, resina Chelex-100 e diálises, pode fornecer informações sobre a especiação de metais em águas naturais. O esquema permite dividir a concentração total inicial em espécies particuladas (maior do que 0,4 $\mu$ m), filtradas e íons-permutáveis, dialisáveis e complexadas.

Para a especiação do Cu(II), do Cd(II) e do Zn(II) em amostras de águas naturais, LIU & INGLE (43) descreveram um método rápido usando um sistema automático de duas colunas de troca iônica. Duas das frações das espécies do metal-traço dissolvido eram diretamente determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, após pré-concentração em colunas sequenciais de resina

quelante Chelex-100 e resina aniônica com macro-porosidade AGMP-1. A terceira fração foi determinada pelo método de adição de padrão.

Até a presente data, poucas são as técnicas analíticas suficientemente sensíveis e seletivas disponíveis para a determinação direta e a especiação de crômio em água, a nível de ultratrazo. ANDRADE et alii (3, 4 e 5) utilizaram a Análise por Injeção de Fluxo (AIF) na especiação de crômio III e crômio VI por espectrofotometria na região do visível com 1, 5-difenilcarbazi-da. SUBRAMANIAN (63) descreveu os resultados de estudos em meio aquoso e sua aplicabilidade na especiação de crômio em algumas amostras de água, utilizando a complexação direta do Cr(III) e Cr(VI) com pirrolidinacarboditioato de amônio à temperatura ambiente e sua subsequente extração com metil-isobutil-cetona. A determinação do crômio total na fase orgânica foi feita por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

URSA & NAM (65) descreveram a técnica de cromatografia de íons que utiliza uma coluna de troca aniônica ou catiônica acoplada a um espectrofotômetro de emissão atômica de plasma, na detecção seletiva para separar e quantificar as duas espécies de crômio, sem a prévia conversão das espécies. Este método foi aplicado na determinação das espécies de crômio em soro humano, águas naturais e efluentes industriais.

A especiação das espécies iônicas do alquilchumbo têm sido feita por espectrofotometria na região do ultravioleta, voltametria de varredura com pulso diferencial, cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, cromatografia líquida de al-

ta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção atômica e cromatografia gasosa com detecção por espectrofotometria de absorção atômica após geração de hidreto com butilação (54). RAPSOMANIKIS et alii (54) descreveram um novo método para a especificação e determinação de chumbo em água por cromatografia e espectrofotometria de absorção atômica, após etilação com tetraetilborato de sódio.

O método descrito por BERTSCH & ANDERSON (9) para a determinação quantitativa do alumínio, via derivação pós-coluna com TIRON (ácido 4,5-dihidroxi-m-benzeno-dissulfônico), foi avaliado por sua utilidade como método de especificação de alumínio em solução aquosa. Complexos de alumínio formados por flúor-oxalato e citrato foram identificados por picos distintos nos cromatogramas das soluções contendo os ligantes apropriados.

Enquanto inúmeras técnicas analíticas têm sido descritas para especificação de metais em amostras de água, poucas publicações aparecem no campo de alimentos (59, 68).

Geralmente, os procedimentos envolvidos na análise de elementos-traços em alimentos incluem as etapas de destruição da matéria orgânica, pré-concentração, separação e determinação. No caso da especificação, a segunda etapa é particularmente importante (59, 70).

A concentração total de elementos-traços em alimentos pode ser determinada com exatidão e de maneira seletiva, por métodos, tais como a espectrofotometria de absorção atômica, pela análise por ativação de nêutrons, espectrometria de raio-X e técnicas eletro-analíticas. Já na fotometria e fluorimetria, métodos

geralmente menos sensíveis para este fim, após a destruição da matéria orgânica, é necessário a pré-concentração do metal. Procedimentos simples como o uso de diferentes solventes (na partição água/solventes orgânicos) podem fornecer informações detalhadas sobre a possível lipossolubilidade das espécies presentes. A centrifugação também é um procedimento não destrutivo de grande valia no pré-tratamento das amostras (59).

Até recentemente, somente a especificação de mercúrio, pela diferenciação entre seus compostos inorgânicos e orgânicos por espectrofotometria de absorção atômica e cromatografia gasosa, era realizada rotineiramente em laboratórios. KACPRZAK & CHVOJKA (32) descreveram um método para a determinação de metil-mercúrio e mercúrio inorgânico em peixes, utilizando a espectrofotometria de absorção atômica do vapor a frio. Este mesmo método foi utilizado por YAMANAKA & UEDA (71) na determinação do mercúrio total, enquanto o mercúrio orgânico era quantificado por cromatografia gasosa após extração com benzeno.

WATTS et alii (67) utilizaram um método no qual os lipídeos e outros compostos orgânicos foram removidos com acetona, seguidos por extração com benzeno. O metil-mercúrio e o etil-mercúrio ligados às proteínas foram liberados com ácido clorídrico, extraídos em benzeno e determinados por cromatografia gasosa.

HATTULA et alii (23) determinaram a concentração de mercúrio em diferentes espécies de peixes e verificaram a relação entre mercúrio total e metil-mercúrio. O mercúrio total foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica do vapor a frio e o metil-mercúrio por cromatografia gasosa com detector de

captura de elétrons, após tratamento químico e extração com tolueno.

Sendo o alimento uma matriz bastante complexa, há uma limitação na aplicação dos métodos usuais em análise de especiação, requerendo, assim, diferentes estratégias analíticas para cada tipo de produto. Esquemas de especiação são essenciais para fornecer informações sobre a espécie do elemento ou grupo de espécies. Os exemplos apresentados nas Figuras 02 e 03 (59) são um dos raros esquemas encontrados na literatura.

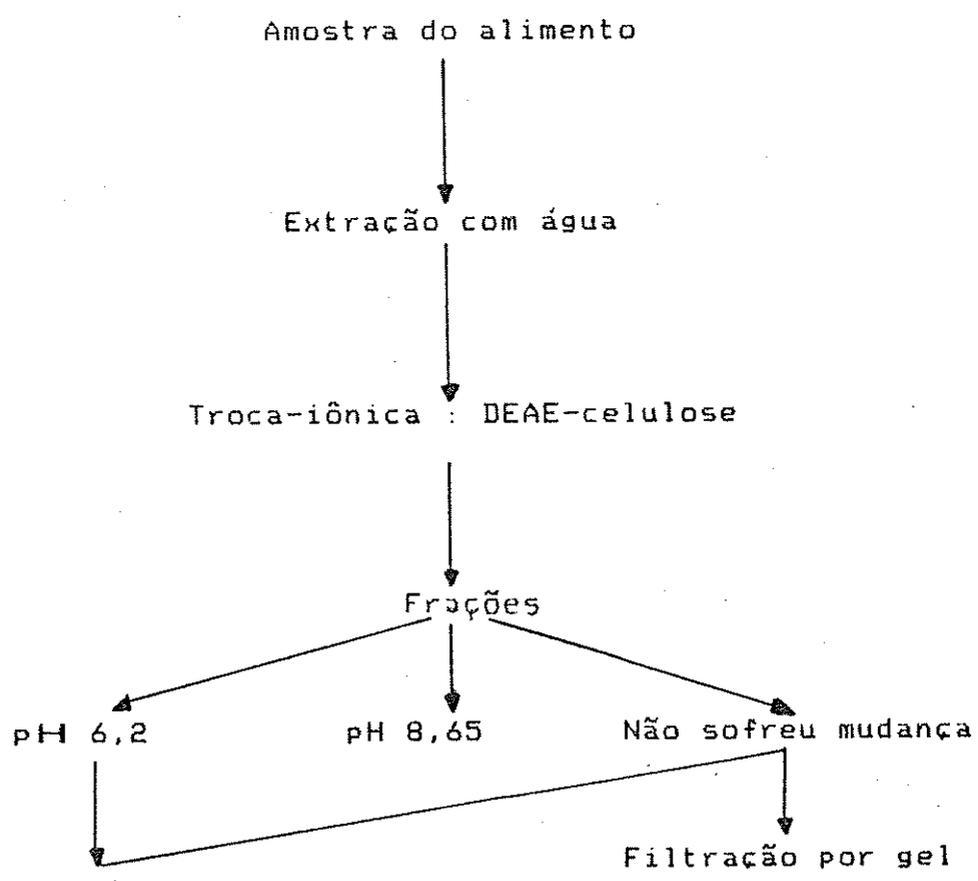


FIGURA 02. Esquema analítico para especiação de cobre em ervilhas e em soja.

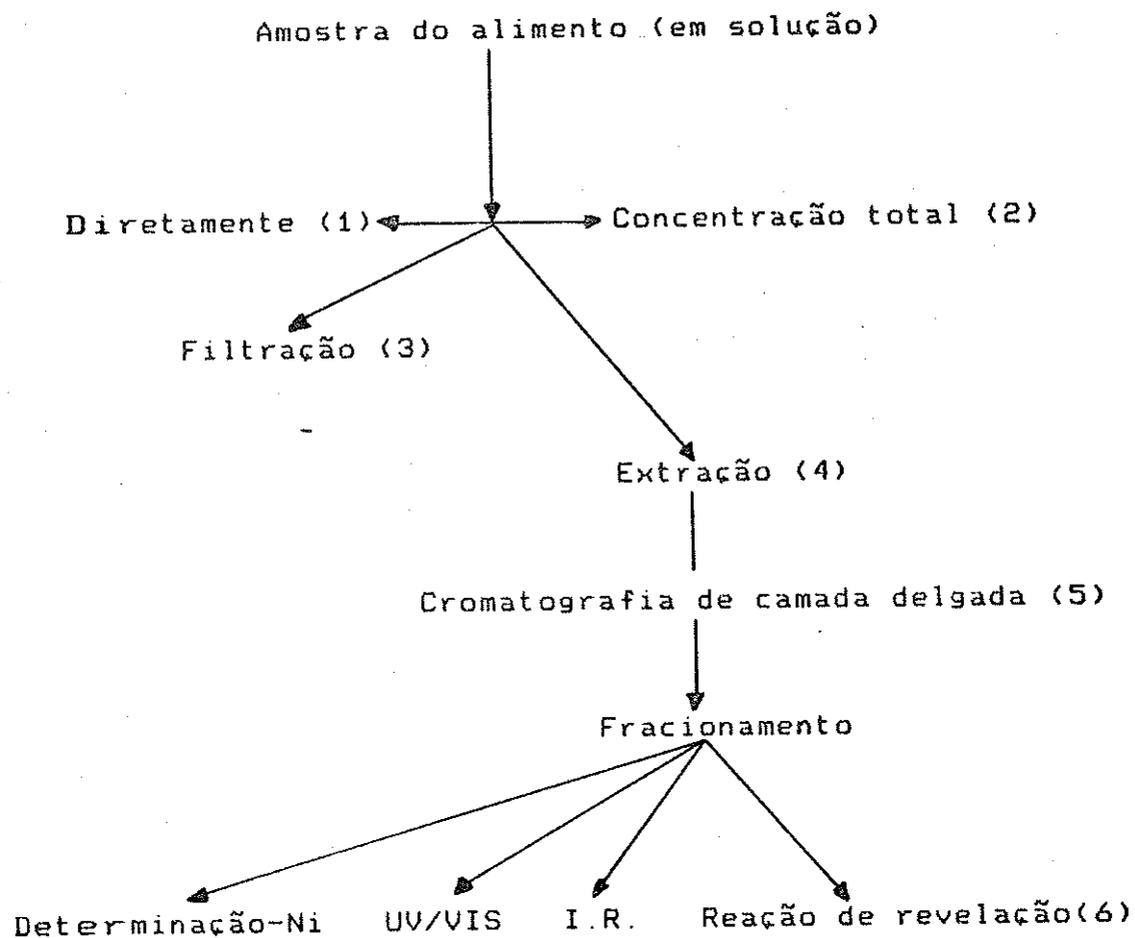


FIGURA 03. Esquema analítico para especificação de níquel em café, chá e vinho tinto.

(1) fotometria com piridina-2-aldeído-2-quinolilidrazona

(2) após digestão com ácido nítrico

(3) por filtração através de membrana (0,45 $\mu$ m)

(4) com acetato de etila, éter etílico, clorofórmio

(5) sílica gel/acetato de etila

(6) vários reagentes.

TABELA I. Especificação do níquel em café, chá e vinho tinto.\*

Alimento	[Ni]	% do total		Extr. líquida-líquida			
	(ppm)	det. diret.	resíd. filtr.	acet. etila	CHCl <sub>3</sub>	MIBK	éter etíl.
Vinho tinto (Lambrusco)	0,14	54	7,1	36,4	12,1	8,6	(5)
Vinho tinto (frances)	0,09	82	20,4	6	9,7	9,2	(5)
Café (Nescafé)	1,22	59,1	20,9	42,3	59,0	40	17,3
Chá (Messmertee)	10,10	20	23,2	41,8	41,2	11,6	(5)

\* Conforme SCHWEDT (59)

( ) Valores estimados

Extr. - extração

MIBK - Metil-isobutil-cetona

acet. - acetato

etíl. - etílico

det. diret. - determinado diretamente

resíd. filtr. - resíduo do filtrado

WEBER (68) apresentou esquema para a separação e identificação de diferentes espécies de estanho (Sn) em suco de limão. As espécies de estanho foram separadas dos outros constituintes por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e detectadas por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite. Na identificação dos ligantes orgânicos foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa. A Tabela II apresenta as diferentes espécies de estanho presentes em amostras de suco de limão.

TABELA II. Especificação do estanho em suco de limão.

Amostras	Sn total (ng/ml)	Sn solúvel		Sn insolúvel		Sn orgânico	
		(ng/ml)	%	(ng/ml)	%	ng/ml	sol. insol.
1	15,4	9,4	61	6,0	39	-	-
2	3,1	3,1	100	-	-	-	-
3	<0,1	-	-	-	-	-	-
4	4,7	2,1	45	2,6	55	-	-
5	133,4	83,4	62	50,0	38	15,8	5,9
6	142,5	82,7	58	59,8	42	-	-

sol. - solúvel

insol. - insolúvel

Os procedimentos dos esquemas de especiação aqui descritos são aplicáveis a matrizes de alta complexidade, tais como os alimentos. No entanto, embora desenvolvidos para um fim específico, os obstáculos operacionais encontrados na manutenção da integridade físico-química da amostra ainda são os principais fatores para explicar o desestímulo e a escassez de dados observados, mesmo a nível internacional, na especiação de metais em alimentos.

#### 1.4 A importância da especiação do ferro em alimentos

A determinação do ferro em alimentos é importante devido à necessidade de se estimar seu teor para fins nutricionais, bem como o da ação contaminante, resultado da sua oxidação, que causa sabor metálico em alimentos. Além disso, pode provocar a rancidez em lipídeos e a decomposição das vitaminas. Torna-se ainda interessante distinguir, no alimento, o ferro total do ferro biodisponível.

A adição incidental do ferro na preparação dos alimentos, por meio de utensílios, tem sido frequentemente citada como sendo significativa sob o ponto de vista nutricional (19, 57). ROSANOFF & KENNEDY (56), mediram a biodisponibilidade do ferro formado pela corrosão de pregos de aço (99 % Fe) em contato com maçãs. Para isso, utilizaram o teste de depleção e repleção em ratos. Este estudo mostrou que a corrosão do ferro dentro da maçã, pode não somente gerar um acréscimo apreciável na concentração do metal no alimento, mas também apresentá-lo em uma forma mais biodisponível. Os autores concluíram que a ingestão das maçãs que estiveram em contato com o prego de aço, durante o cozimento ou processamento contribuíram com quantidades significativas de ferro nutricionalmente disponível.

Um estudo abrangendo 147 indústrias de alimentos mostrou que os contaminantes mais comumente encontrados nas matérias-primas e nos produtos acabados eram partículas metálicas, nas quais o ferro era o metal predominante. Tal contaminação é proveniente do desgaste do maquinário, especialmente nas operações de moagem,

lâminas gastas, juntas inadequadas e outros (10, 57)

O teor de ferro em alimentos enlatados aumenta durante a estocagem, como resultado da corrosão interna da lata, a qual varia com as propriedades da folha-de-flandres, com o processamento, as condições de estocagem e a natureza do produto alimentício. Níveis excessivos de ferro podem causar mudanças inaceitáveis na cor, sabor ou limpidez do produto, diminuindo, deste modo, sua vida-de-prateleira (44, 60).

A velocidade de corrosão de muitos metais em solução aquosa pode ser aumentada pela adição de determinados compostos orgânicos. O ácido ascórbico é um desses compostos. Desde que o íon férrico, Fe(III), atua na oxidação do ácido ascórbico para ácido desidroascórbico em uma reação de autocatálise, a corrosão do ferro em solução de ácido ascórbico pode produzir concentrações de Fe(III) suficientes para iniciar o processo (57).

Diversos países estabeleceram limites máximos para determinados metais em produtos alimentícios enlatados, incluindo o ferro. O Comitê Misto FAO/WHO do Codex Alimentarius tem estabelecido níveis tentativos de tolerância para o ferro em muitos produtos enlatados. Para suco de frutas e néctares enlatados foi recomendado o limite máximo de 15 mg/kg (60), enquanto o limite de 50 mg/kg está sob discussão para vegetais, frutas e leite (44).

A anemia nutricional ferropriva é um problema de saúde mundialmente detectado, embora a média de ferro presente na dieta esteja geralmente além da quantidade necessária para os propósitos metabólicos (11, 13, 19, 24, 34, 62). Isto é atribuído à baixa biodisponibilidade do ferro no alimento, ou seja, à quantidade

de ferro da dieta realmente absorvido pelo trato gastrintestinal e subseqüentemente estocado ou incorporado à hemoglobina (13, 37, 35).

Em particular, a deficiência de ferro, muitas vezes, é predominante em áreas onde cereais e legumes constituem a maior fração da dieta, pois a biodisponibilidade do ferro de produtos de origem vegetal é menor (35, 45, 46, 59).

Tradicionalmente o ferro sempre foi considerado um nutriente inerte e não reativo. Todavia, dados mais recentes indicam que tal hipótese pode não ser verdadeira. De acordo com LEE & CLYDESDALE (38) sabe-se que o ferro pode sofrer significativas mudanças na sua biodisponibilidade, como resultado de interação com o alimento, ou resultante do seu processamento (40, 41).

A biodisponibilidade do ferro tem mostrado ser extremamente variável (39). Muitos fatores influenciam a absorção do ferro, incluindo a necessidade individual - depende da idade e estado de saúde do indivíduo, condições íntimas do trato gastrintestinal, composição da dieta - quantidade e forma química do ferro ingerido e da quantidade e proporção de vários outros componentes orgânicos e inorgânicos da dieta (58, 66).

Outros fatores químicos importantes que também influenciam a biodisponibilidade do ferro em alimentos (55) incluem o estado de oxidação, a solubilidade, a facilidade de ionização e o grau de quelação, ou a formação de complexos de ferro com os componentes dos alimentos (39, 42,).

Alguns componentes dos alimentos, como produtos de proteína de soja, têm um efeito inibidor sobre a absorção do ferro,

enquanto outros, como o ácido ascórbico, promovem este processo (12, 20, 35). Outros ácidos orgânicos, incluindo o cítrico, o láctico, o pirúvico e o succínico também aumentam a absorção do ferro (45, 46, 66).

Nos numerosos estudos conduzidos para avaliar a biodisponibilidade dos vários compostos de ferro, usados como fonte de enriquecimento alimentar, pode-se concluir que, independentemente das condições experimentais, os compostos ferrosos são absorvidos e utilizados mais eficientemente pelo homem do que os compostos férricos (38, 39, 45, 47, 48).

As diferentes formas com que o ferro pode se apresentar nos alimentos são mostradas na Figura 04: ferro elementar, ferro solúvel, ferro complexado e ferro iônico. Este último, compreendendo as formas ferrosa ou férrica, pode ocorrer em teores variáveis, dependendo da interação química com os ligantes presentes nos alimentos (39).

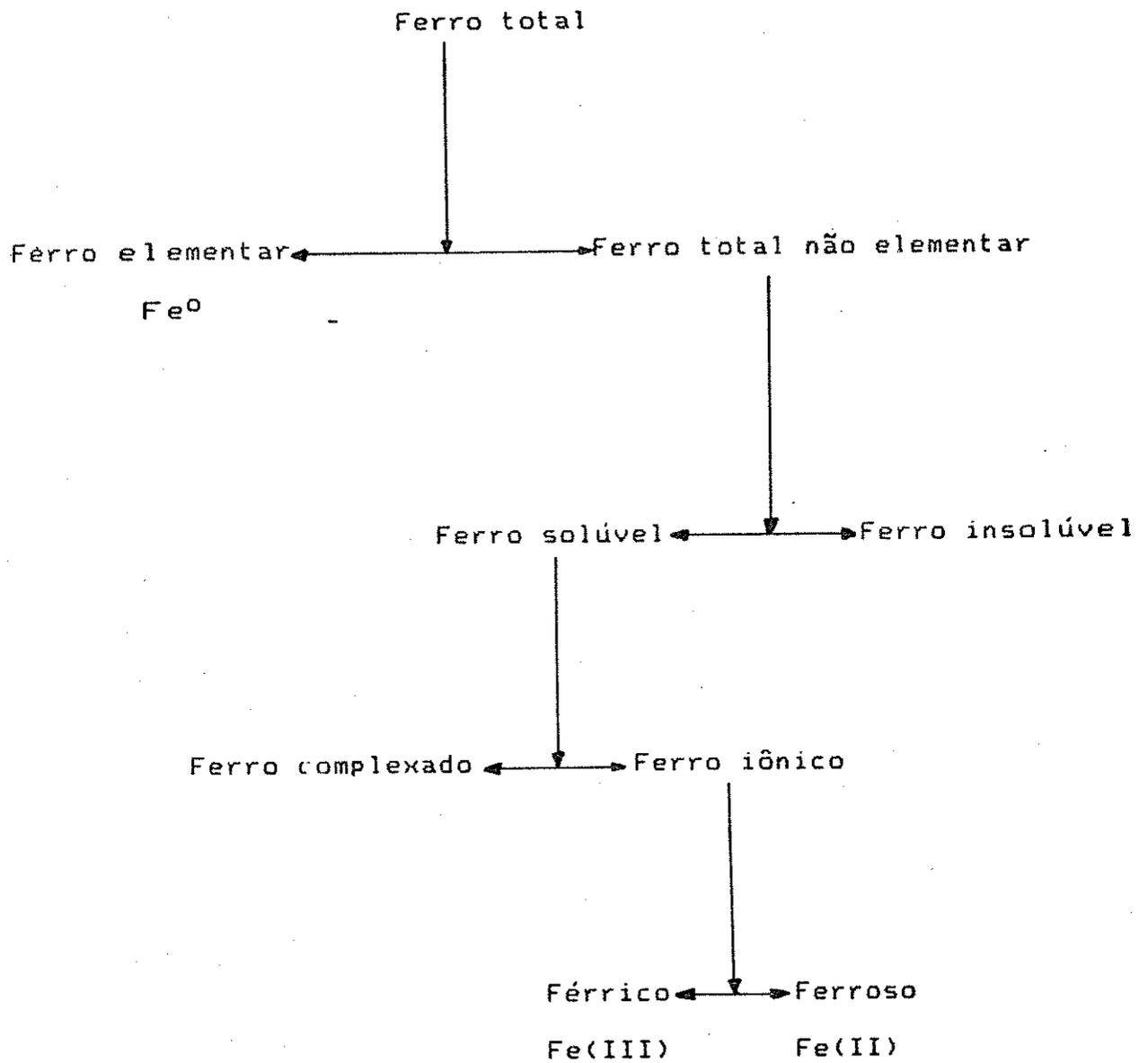


FIGURA 04. Espécies químicas do ferro que podem ocorrer em alimentos.

#### 1.4.1 Química do ferro.

O elemento ferro ( $Z=26$ ) apresenta vários estados de oxidação, variando de Fe(VI) para Fe(-II), exceto Fe(V) e Fe(-I), dependendo do meio químico. A forma férrica, ( $\text{Fe}^{3+}$ ), e sua forma reduzida, a ferrosa, ( $\text{Fe}^{2+}$ ), são as mais estáveis em meio aquoso e ocorrem naturalmente nos alimentos. O ferro elementar,  $\text{Fe}^0$ , é raramente encontrado em meio biológico, mas ocorre em alimentos como aditivo incidental (38, 39, 40, 61).

Os íons ferrosos e férricos, bem como outros ácidos fortes de Lewis, não ocorrem no estado livre em solução ácida, mas hidratados, como  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  e  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ .

Em pH 7, se levarmos em consideração o produto de solubilidade do  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ , a concentração máxima do íon metálico em solução é da ordem de  $10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ . No entanto os íons férricos, precipitando-se como  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , são muito menos solúveis, e a concentração máxima permitida para o íon metálico é agora da ordem de  $10^{-16} \text{ mol.l}^{-1}$ , como apresentado na Figura 05 (38, 61).

A formação dos hidróxidos de ferro causada pelo aumento do pH tem importância biológica, pois a solubilidade do metal é um pré-requisito para a sua absorção pelo intestino (38, 39, 61).

A precipitação do ferro em pH alcalino pode ser inibida por agentes complexantes (38). Os complexantes mais comuns em alimentos incluem proteínas, aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos e fosfatos. A estabilidade dos complexos de ferro pode ser avaliada em sistemas-modelo, mas é muito difícil a determinação dos tipos de complexos que são formados em sistemas

heterogêneos, tais como os alimentos. A complexidade desta matriz faz com que sejam propostos protocolos e não métodos gerais de análise.

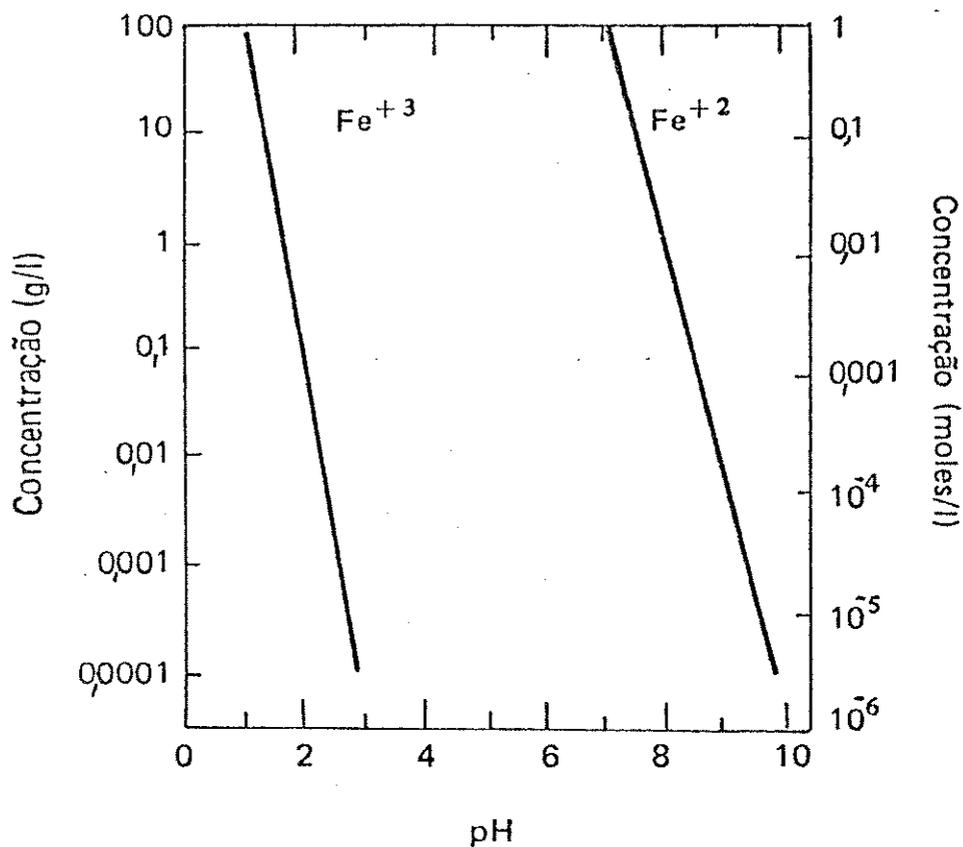


FIGURA 05. Concentração de íons férricos e ferrosos presentes em solução em função do pH. As retas foram obtidas assumindo  $K_{so} = 10^{-15}$  e  $K_{so} = 10^{-37}$  para os compostos  $Fe(OH)_2$  e  $Fe(OH)_3$ , respectivamente. Conforme CLYDESDALE (38).

#### 1.4.2 Fatores que afetam a eficiência da absorção do ferro presente no alimento

As três principais características químicas dos alimentos, que influenciam a absorção do ferro são o pH, o potencial de oxidação-redução e a capacidade de complexação (38).

**Solubilidade.** A solubilidade dos vários compostos de ferro está diretamente relacionada à sua biodisponibilidade, uma vez que o ferro deve estar em solução para ser absorvido pelo trato gastrintestinal (38, 24).

Com base na solubilidade, CLYDESDALE (11) e JARDIM (29) apontaram que a ingestão oral de mercúrio metálico não produzirá praticamente nenhum sintoma toxicológico.

A maior solubilidade dos sais ferrosos sobre os férricos é, em parte, responsável pela maior disponibilidade destes íons. Teoricamente, a concentração máxima possível de íons férricos e ferrosos no pH do intestino está ao redor de  $10^{-18}$  e  $10^{-3}$  M, respectivamente, como apresentado na Figura 05. Então, a facilidade de solubilização deveria ser conhecida, onde quer que o ferro fosse adicionado no alimento, para fins nutricionais (38).

**Potencial de oxidação-redução.** Há evidências de que sais ferrosos são mais facilmente utilizados pelo homem do que os sais férricos (38, 39, 47, 48). A maior absorção dos sais ferrosos sobre os férricos procedia da hipótese de que somente sais ferrosos poderiam ser absorvidos e que os sais férricos deveriam primeira-

mente serem reduzidos a sais ferrosos para terem alguma significância nutricional. Esta suposição tem suscitado dúvidas. LEE & CLYDESDALE (38) apresentaram evidências de que ambas as formas do ferro são utilizadas pelo transporte intestinal mas, como já foi dito, baseados no princípio da solubilidade.

Sais simples de Fe(II) são mais facilmente absorvidos do que sais complexos e sais de ferro(III). A maior disponibilidade dos íons ferrosos se deve ao fato de que as macro-moléculas de hidróxido férrico são grandes para serem absorvidas (38).

**Formação de complexos.** Numerosos ligantes orgânicos capazes de formar complexos de coordenação com o ferro estão naturalmente presentes nos alimentos (38, 57) e podem inibir ou aumentar a ingestão de ferro, dependendo do valor da constante de formação dos complexos.

O ferro, em alimentos de origem animal apresenta-se complexado na hemoglobina, acarretando maior disponibilidade do que aquele contido em alimentos de origem vegetal, onde ele se apresenta na forma de sais inorgânicos (24).

O espinafre é conhecido como uma significantiva fonte do ferro, porque suas folhas contêm de 3 a 5 mg de ferro por 100 g. Entretanto, o espinafre é uma fonte pobre de ferro disponível biologicamente, apresentando uma absorção média de 1,3 % (42).

A fraca absorção do ferro de fontes vegetais pode ser atribuída à presença de fibra, fosfatos e particularmente fitatos, os quais ligam-se ao ferro inorgânico e reduzem sua solubilidade (24, 38, 42, 59). Geralmente carnes contêm proteínas em

quantidades superiores às encontradas em vegetais e o produto de degradação dessas proteínas tem sido apresentado como fator que aumenta a disponibilidade de ambos os compostos de ferro (heme e não-heme) (24).

A retenção do ferro pode ser afetada por vários carboidratos na ordem de lactose > sacarose > glicose > amido. Açúcares simples como a frutose e o sorbitol podem, em contraste, aumentar a absorção do ferro. Aminoácidos como a histidina, a lisina e a cisteína aumentam a absorção da espécie férrica. A habilidade desses aminoácidos em formar quelatos tridentados é essencial para sua eficácia no aumento da absorção do ferro (66).

A pouca absorção dos sais férricos pode ser aumentada se forem complexados como quelatos solúveis de baixo peso molecular. Isto tem sido demonstrado com a frutose (38).

Há evidências de que o chá inibe a absorção do ferro, pois acredita-se que o efeito inibidor da bebida sobre a disponibilidade do ferro é, em parte devido aos compostos polifenólicos (taninos), que complexam fortemente o metal (28, 53).

### 1.4.3 A química do ferro em alimentos processados

Há poucos dados disponíveis com referência às formas químicas do ferro, seu estado de oxidação, solubilidade e grau de quelação em alimentos, após o processamento ou a estocagem (25,40)

O efeito do acondicionamento em vidro e em latas, do armazenamento em latas estanhadas e do congelamento foi estudado para frutas e vegetais. Verificou-se que o ferro nos alimentos congelados apresentava uma solubilidade maior que nos não-acondicionados ou nos enlatados (38).

O processamento dos alimentos também altera a biodisponibilidade e a forma química do ferro (34). LEE & CLYDESDALE (40) verificaram o efeito de várias fontes de ferro (usadas para fortificação de alimentos) em bebidas contendo ascorbato, através de processamento por secagem por congelamento ("freeze-drying") e secagem por pulverização ("spray-drying"). Após três dias de estocagem, o ferro de certas fontes apresentou modificações, resultado da sua reação com a matriz da bebida. O processo de secagem por pulverização acelerou a conversão entre as espécies de ferro para bebidas fortificadas, o mesmo não ocorrendo com o processo de secagem por congelamento.

O efeito do processamento térmico sobre o ferro endógeno e o adicionado em purê de espinafre enlatado foi estudado por LEE & CLYDESDALE (42). Foram utilizados quatro tratamentos, o controle, o não-processado, o processado e o processado com ascorbato. O ferro endógeno do espinafre puro estava 93 % na forma insolú-

vel, enquanto o ferro adicionado variou largamente no seu grau de insolubilidade. Para certas fontes de ferro, o processamento aumentou a proporção de insolúveis, bem como a de íons ferrosos sobre aquela presente no espinafre não-processado. O processamento com ácido ascórbico também aumenta a concentração de íons ferrosos em alguns casos.

Entre alguns grãos, a biodisponibilidade do ferro segue a ordem: trigo > arroz > farinha de milho. O arroz em casca é beneficiado para remover a casca e o farelo, produzindo o arroz polido ou o branco. Estas etapas do processamento também retiram parte do ferro, junto com outros componentes, tais como proteínas, lipídeos e vitaminas, os quais afetam a absorção do ferro. Um dos meios empregados para aumentar a biodisponibilidade do ferro em arroz é a adição deste elemento e de outros nutrientes no arroz beneficiado. KADAN & ZIEGLER (33) estudaram o efeito de vários ingredientes e três fontes de fortificação de ferro, comumente utilizadas em alimentos à base de arroz polido e de farinha de arroz. Concluíram que nenhuma das fontes de ferro empregadas, quando adicionadas individualmente, aumenta a concentração de ferro solúvel. Somente o pirofosfato férrico de sódio combinado com açúcar e ácido ascórbico fez com que houvesse um acréscimo na concentração de ferro solúvel, realçando a importância deste e, talvez, outros ingredientes em alimentos à base de arroz para aumentar a biodisponibilidade do ferro.

O processo de panificação tem sido mostrado como causa significativa da mudança da forma química do ferro (34). Farinhas enriquecidas com ferro, quando utilizadas em panificação, produ-

zem formas insolúveis de ferro (41).

KADAN & ZIEGLER (34) realizaram estudos experimentais do efeito dos ingredientes sobre a solubilidade e o estado químico do ferro em pães. Concluíram que altas concentrações de sal (NaCl) têm efeito inibidor sobre o ferro solúvel e aparentemente sobre a sua biodisponibilidade. Entretanto, o fermento biológico pode aumentar a biodisponibilidade do elemento.

Os efeitos do alimento e do processamento sobre a química do ferro podem ajudar a explicar a grande variação na absorção deste elemento, observada em vários alimentos e dietas (42).

## 2 OBJETIVO

A presente pesquisa visou estabelecer um protocolo para a caracterização qualitativa e quantitativa das diversas espécies do ferro (especiação) presentes em concentrado de tomate.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Amostra

As amostras de concentrado de tomate foram adquiridas em supermercado e estavam acondicionadas em latas envernizadas de 140g, segundo o procedimento normalmente utilizado neste campo.

#### 3.2 Vidraria

Toda a vidraria utilizada foi lavada com detergente Extran-MA 01 (Merck), mantida em solução de ácido nítrico (1:3) por uma noite e enxaguada com água destilada.

#### 3.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, marca Merck, com exceção do 2-2'-dipiridila, marca Carlo Erba.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Preparo da amostra para análise

As amostras foram abertas imediatamente antes do início da análise (para evitar oxidação da fração ferrosa para férrica), homogeneizadas com bastão de vidro, acondicionadas em frascos de vidro sob atmosfera de nitrogênio e armazenadas em refrigerador em temperatura ao redor de 4° C.

### 4.2 Determinações preliminares

#### 4.2.1 pH

O pH foi determinado diretamente na amostra utilizando-se potenciômetro ALFATEC, modelo 3.500d, (6, 69), calibrando-se o aparelho conforme o manual do usuário.

#### 4.2.2 Sólidos solúveis (°Brix)

Foi determinado em refratômetro tipo Abbe - CARL ZEISS, modelo 88120, com escala de grau Brix e divisões de 0,2°. O método baseia-se na correspondência entre o índice de refração e a percentagem de sacarose dissolvida em água, à qual se dá o nome de grau Brix. Na prática, a leitura refratométrica, ou o corres-

pondente grau Brix é usado para expressar o teor de sólidos solúveis (<sup>o</sup>Brix) contido em amostras líquidas ou em pastas a 20° C (6, 31, 69).

#### 4.2.3 Cloreto de sódio

Método argentométrico de VOLHARD. Baseia-se na argentometria indireta, que consiste em precipitar o cloreto com excesso de nitrato de prata e titular a prata residual, em presença de ácido nítrico, com uma solução-padrão de tiocianato de amônio, empregando-se sulfato férrico amoniacal como indicador (7, 8).

#### 4.2.4 Acidez total

Método acidimétrico usando potenciômetro na titulação de uma solução da amostra a 10 % m/v com uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio (6, 69).

#### 4.2.5 Cromatografia de ácidos orgânicos

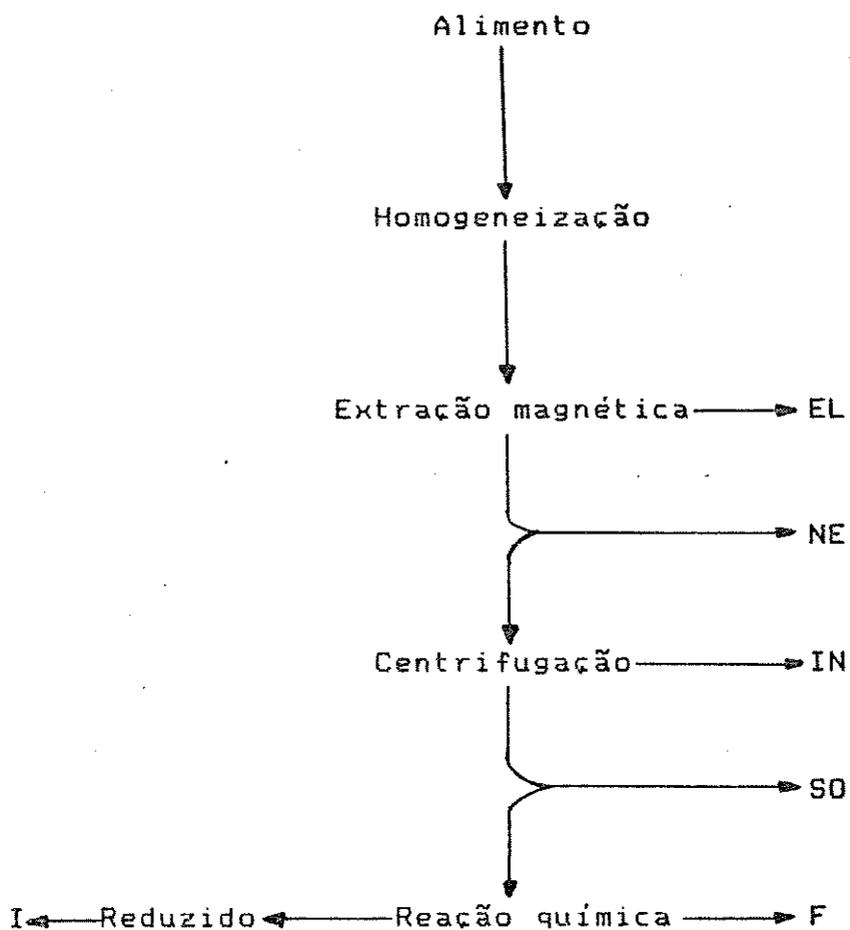
Este procedimento visa à separação e identificação dos ácidos orgânicos presentes no concentrado de tomate, por cromatografia em papel (6).

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de azul de bromofenol em n-butanol (1 g/l) e solução aquosa de ácido acético a 50 % v/v e a revelação final foi feita secando-se o papel ao ar livre. As manchas referentes aos ácidos presentes na amostra ad-

quirem coloração amarelada sobre um fundo azul.

#### 4.3 Determinação quantitativa do ferro

A análise das várias formas químicas do ferro foi realizada segundo o fluxograma disposto na Figura 06 (39, 40).



sendo:

EL	elementar	EL + NE	total
NE	não elementar	SO + I	complexada
IN	insolúvel	I - F	férrica Fe(III)
SO	solúvel	EL + NE + SO	particulada
I	ferrosa + férrica		
F	ferrosa Fe(II)		

FIGURA 06. Análise das várias formas químicas do ferro em uma amostra de alimento.

As formas EL, NE, e SO foram extraídas por meios físicos e quantificadas por espectrofotometria de absorção atômica, enquanto as formas I e F foram extraídas quimicamente da fração solúvel do Ferro e quantificadas espectrofotometricamente (40)..

#### 4.3.1 Quantificação por espectrofotometria de absorção atômica

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN ELMER, modelo 5.000, usando as condições recomendadas na Tabela III (51).

As soluções-padrão de ferro, contendo 0,00 , 1,00 , 2,50 e 5,00 mg Fe/l foram preparadas em solução aquosa de ácido clorídrico a 2 % m/v, a partir da solução-estoque de ferro (padrão hidrossolúvel Merck, contendo 1,000 g  $\pm$  0,002 g de Fe/l na forma de FeCl<sub>3</sub> em HCl a 15 %) conforme manual de instrução.

TABELA III. Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN-ELMER, modelo 5.000, para determinação do ferro.

---

Comprimento de onda (nm)	248,3
Corrente da lâmpada (mA)	30
Abertura espectral da fenda (nm)	0,2
Chama (oxidante)	ar - acetileno
Vazão (l/min)	50 - 45

---

#### 4.3.2 Quantificação do ferro por espectrofotometria no visível, com 2-2'-dipiridila.

Foi utilizado o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (27)

Pipetaram-se 5 ml da amostra e 1 ml de solução de cloridrato de hidroxilamina a 10 % m/v em béquer de 150 ml. A mistura foi aquecida em forno de microondas, em potência baixa, durante 2 minutos e após esfriar foi transferida para balão volumétrico de 50 ml. Foram adicionados 5 ml de solução de ácido clorídrico 2 % m/v; 5 ml de solução-tampão acetato de sódio/ácido acético (0,1 M)-pH 4,5; 2 ml de solução de 2-2'-dipiridila a 0,1 % m/v e o volume foi completado com água destilada.

Foi preparado uma prova em branco, de forma similar, com todos os reagentes usados na amostra. Mediu-se a intensidade da cor vermelha, desenvolvida após 10 minutos, a 510 nm, em cubetas de 1 cm, em espectrofotômetro UV-VIS - VAN DEN, modelo VDC - 2.500.

Em virtude da amostra apresentar coloração avermelhada, proveniente do licopeno e outros pigmentos oriundo da polpa do tomate, preparou-se uma segunda prova em branco com a mesma alíquota de amostra e foram adicionados todos os reagentes, excluindo a solução de 2-2'-dipiridila. O valor de absorbância deste branco foi subtraído do valor de absorbância da amostra.

Determinou-se o teor de ferro por interpolação em uma curva-padrão previamente estabelecida.

#### Preparação da curva-padrão

Em cinco béqueres de 150 ml, foram adicionados 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,00 ml de uma solução estoque de ferro (0,01 mg de Fe/l). A seguir, adicionaram-se 5 ml da solução tampão e 2 ml da solução do reagente 2-2'-dipiridila. A solução foi então tratada conforme já descrito acima. O volume final foi ajustado utilizando-se balões volumétricos de 50 ml.

#### 4.3.2.1 Ensaio com cloridrato de hidroxilamina

Como o 2-2'-dipiridila reage apenas com a espécie ferroso, Fe(II), a determinação do ferro total é feita após a redução

da espécie férrica, Fe(III), com o cloridrato de hidroxilamina. A quantificação das espécies Fe(II) e Fe(III) é obtida por diferença.

A completa redução da espécie Fe(III) para Fe(II) foi verificada modificando-se o volume da solução de cloridrato de hidroxilamina (1 e 2 ml) e o tempo de redução (5 e 10 minutos).

Não houve variação significativa quando trabalhou-se com os volumes de 1 ml por 10 minutos e 2 ml por 5 minutos como apresentado na Tabela IV e visualizado na Figura 07, sendo utilizado, neste trabalho, o volume de 2 ml e o tempo de redução de 5 minutos.

TABELA IV. Concentração do ferro iônico (mg/kg), obtida pelo ensaio com cloridrato de hidroxilamina.

---

Dias	1ml/5min	1ml/10min	2ml/5min
00	51,3	60,3	60,1
01	51,0	58,0	58,5
02	50,3	58,7	58,7

---

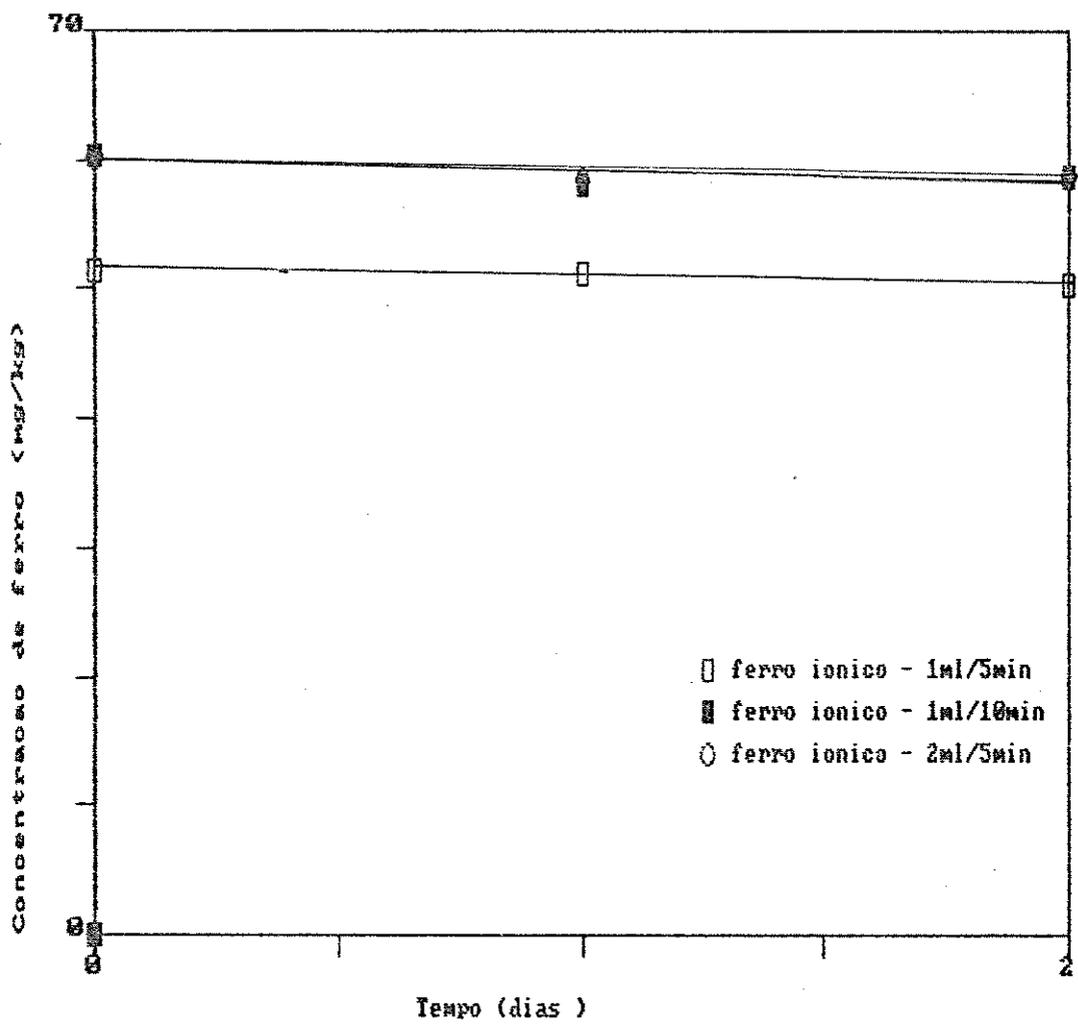


FIGURA 07. Variação na concentração do ferro iônico (mg/kg) em função do tempo para o ensaio com cloridrato de hidroxilamina.

#### 4.4 Tratamentos preliminares da amostra para determinação do ferro total

Em virtude da Association of Official Analytical Chemists - A.O.A.C (69) não descrever um método oficial para a determinação de ferro em produtos vegetais processados, entre os quais se enquadrasse o concentrado de tomate, tornou-se necessário adaptar um procedimento analítico para ser utilizado neste trabalho. Assim, foram realizados dois diferentes tipos de digestão da amostra.

##### 4.4.1 Digestão com ácido clorídrico concentrado

A digestão foi conduzida segundo o método recomendado por PRICE & ROOS (52).

Pesaram-se cerca de 5 g, com precisão de 0,1 mg, de amostra em béquer de 50 ml. Em seguida foram adicionados 5 ml de ácido clorídrico concentrado. Após repouso de 5 minutos, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com água destilada. A solução foi agitada e filtrada em papel de filtro quantitativo faixa-preta FRAMEX nº 3891.

Este mesmo tratamento foi conduzido para uma solução padrão aquosa contendo 2,00 mg Fe/l e também para a amostra, na qual foi adicionada uma alíquota da solução-padrão contendo 2,00 mg Fe/l.

#### 4.4.2 Digestão com ácido nítrico (1 M) e peróxido de hidrogênio (30 volumes)

Pesaram-se cerca de 5 g, com precisão de 0,1mg, de amostra em um béquer de 100 ml. Adicionaram-se 5 ml da solução de ácido nítrico e a amostra foi colocada em chapa de aquecimento. Lentamente, foram adicionados 5 ml de peróxido de hidrogênio, obtendo-se uma solução clara. Após esfriar, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com água destilada. A solução foi agitada e filtrada em papel de filtro quantitativo faixa-preta.

O mesmo tratamento foi conduzido para a solução-padrão contendo 2,00 mg Fe/l e também para a amostra na qual foi adicionada uma alíquota da solução-padrão contendo 2,00 mg Fe/l. Nestas duas soluções determinaram-se as concentrações do ferro por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) e com 2-2'-di-piridila.

Pelos resultados contidos na Tabela V pode-se verificar que o tratamento 4.4.1 foi o que apresentou maior percentagem de recuperação do teor de ferro adicionado, para ambas as técnicas utilizadas.

O tratamento 4.4.2, talvez por ter sido conduzido em recipiente aberto, pode ter sofrido uma perda, apresentando um menor percentual de recuperação.

Assim, o tratamento selecionado para a determinação do teor de ferro total neste trabalho foi o 4.4.1, que além de apresentar maior percentual de recuperação, ainda tem a vantagem de

ser um método mais rápido, além de se trabalhar a frio.

TABELA V. Resultados obtidos nos tratamentos preliminares da amostra, para determinação de ferro total.

Tratamentos	Métodos	Amostra (mg Fe/l)	Ferro adicionado (mg Fe/l)	Total recuperado (mg Fe/l)	Recupe- ração (%)
	EAA	2,43	2,06	4,46	98
4.4.1					
	2-2'-dip.	2,47	2,06	4,53	100
	EAA	2,51	2,05	4,11	82
4.4.2					
	2-2'-dip.	2,40	1,95	3,98	81

EAA = espectrofotometria de absorção atômica

2-2'-dip. = 2-2'-dipiridila

#### 4.5 Determinação do ferro elementar

O ferro elementar foi extraído da amostra, sob agitação, por meio de barras de teflon magnetizadas. O magneto, quando retirado da amostra, foi imerso em ácido clorídrico concentrado para solubilização do ferro metálico. A solução diluída foi aspirada em espectrofotometro de absorção atômica conforme descrito em 4.3.1 (39).

O ferro elementar é proveniente de limalhas liberadas dos utensílios utilizados durante o processamento.

No processamento do concentrado de tomate são utilizados, em sua maioria, equipamentos de aço inoxidável, diminuindo a incidência da presença de ferro elementar no produto.

Não constam deste estudo dados para o ferro elementar, uma vez que esta espécie não foi detectada nas primeiras amostras analisadas.

#### 4.6 Determinação do ferro solúvel

Pesaram-se cerca de 25 g, com precisão de 0,1 mg, da amostra em béquer de 50 ml e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água destilada. A solução foi agitada e centrifugada em centrífuga HERAEUS, modelo UJ3S, a 10.000 r.p.m. durante vinte minutos em atmosfera de nitrogênio.

Três alíquotas de 10 ml do centrifugado foram tratadas conforme selecionado em 4.4.1 e quantificadas por espectrofotometria de absorção atômica (4.3.1).

#### 4.7 Determinação da fração ferrosa mais férrica

Na quantificação da fração ferrosa mais férrica, utilizou-se o método espectrofotométrico com 2-2'-dipiridila, conforme descrito em 4.3.2, em três alíquotas da solução centrifugada.

#### 4.8 Determinação da fração ferrosa

Para a quantificação da fração ferrosa, seguiu-se o mesmo procedimento descrito em 4.3.2, porém excluindo-se a adição da solução de cloridrato de hidroxilamina, redutor da forma férrica.

Por diferença, foi calculado o teor da fração férrica na amostra.

#### 4.9 Determinação da fração orgânica do ferro

A fração orgânica do ferro foi extraída da amostra com cinco porções de 20 ml de diclorometano. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo MARCONI, modelo TE 120, e o resíduo ressuspendido em 1 ml de ácido clorídrico concentrado e 4 ml de água destilada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN-ELMER, modelo 303, equipado com forno de grafite 2.000, nas condições recomendadas na Tabela VI (50).

Foram injetadas, no forno de grafite, alíquotas de 20  $\mu$ l de soluções-padrão de 0,10 , 0,20 e 0,40 mg Fe/l, para o traçado da curva-padrão.

TABELA VI. Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN-ELMER modelo 303, para a determinação do ferro orgânico.

---

Comprimento de onda (nm)	248,3
Corrente da lâmpada (mA)	30
Gás inerte	argônio
Volume injetado ( $\mu$ l)	10
Tempo e temperatura de secagem	10 s - 100 °C
Tempo e temperatura de incineração	15 s - 1100 °C
Tempo e temperatura de atomização	2 s - 2700 °C

---

#### 4.10 Avaliação do procedimento

O procedimento utilizado na quantificação do ferro solúvel total foi avaliado mediante a adição de solução-padrão na amostra, nos níveis de 25,00; 50,00 e 100,00 mg/kg, para ambas as técnicas utilizadas.

TABELA VII. Percentagem de recuperação do teor de ferro adicionado na amostra nos níveis de 25,00 ; 50,00; 100,00 mg/kg.

Técnica	Níveis de recuperação (mg/kg)		
	25,00	50,00	100,00
<sup>a</sup> EAA	94 %	96 %	96 %
2-2'-dipiridila	95 %	95 %	98 %

\* O teor de ferro na amostra inicial foi de 94,00mg/kg.

<sup>a</sup>EAA - espectrofotometria de absorção atômica.

Os resultados contidos na Tabela VII indicam que o procedimento aplicado está adequado para a determinação de ferro solúvel em concentrado de tomate.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se avaliar um procedimento analítico que permitisse a quantificação nas diferentes formas do ferro, foi escolhido o concentrado de tomate que, do ponto de vista alimentício, é um produto bastante consumido pela população e apresenta alto teor do elemento estudado. Outro fator que influenciou na escolha foi o de ser um produto que, após aberto, não é totalmente consumido, podendo a lata permanecer aberta em refrigerador.

Do ponto de vista analítico, o concentrado de tomate é uma matriz que, embora complexa, permite manuseio relativamente simples e dispensa pré-tratamentos que possam alterar quimicamente os seus componentes.

### 5.1 Determinações preliminares

O pH é um dos fatores que afetam o desenvolvimento da cor no método espectrofotométrico e pode se verificar, pela Tabela VIII, que o pH do concentrado de tomate se encontra na faixa ótima de trabalho para o método escolhido, ou seja, 4,30.

TABELA VIII. Determinações preliminares no concentrado de tomate

pH	4,30
°Brix	20,90
Sal (% de NaCl)	1,59
Cromatogr. ác. orgânicos	presença ác. cítrico
Acidez total (% ác. cítrico anidro)	1,01
Ferro (mg/kg)	55,45

Outro fator relevante é a presença de ácidos orgânicos, provenientes do próprio alimento, adicionados intencionalmente ou resultantes de alterações químicas do produto. Na amostra foi comprovada a presença de ácido cítrico, mas na quantificação do ferro por espectrofotometria com 2-2'-dipiridila, o citrato não interferiu.

## 5.2 Verificação da precisão dos métodos

Para os dois métodos utilizados na determinação do ferro solúvel total, à concentração de 45,00 mg/kg, o desvio-padrão relativo foi de 0,94 % (n=10) por espectrofotometria de absorção atômica e de 0,95 % (n=10) com 2-2'-dipiridila.

A curva de calibração pelo método por espectrofotometria de absorção atômica foi linear na faixa de 1,00 a 5,00 mg Fe/l, conforme mostrado na Figura 08. Para a determinação espectrofotométrica na região do visível, a faixa linear situou-se entre e 10,00 e 100,00 mg Fe/l conforme mostrado na Figura 09.

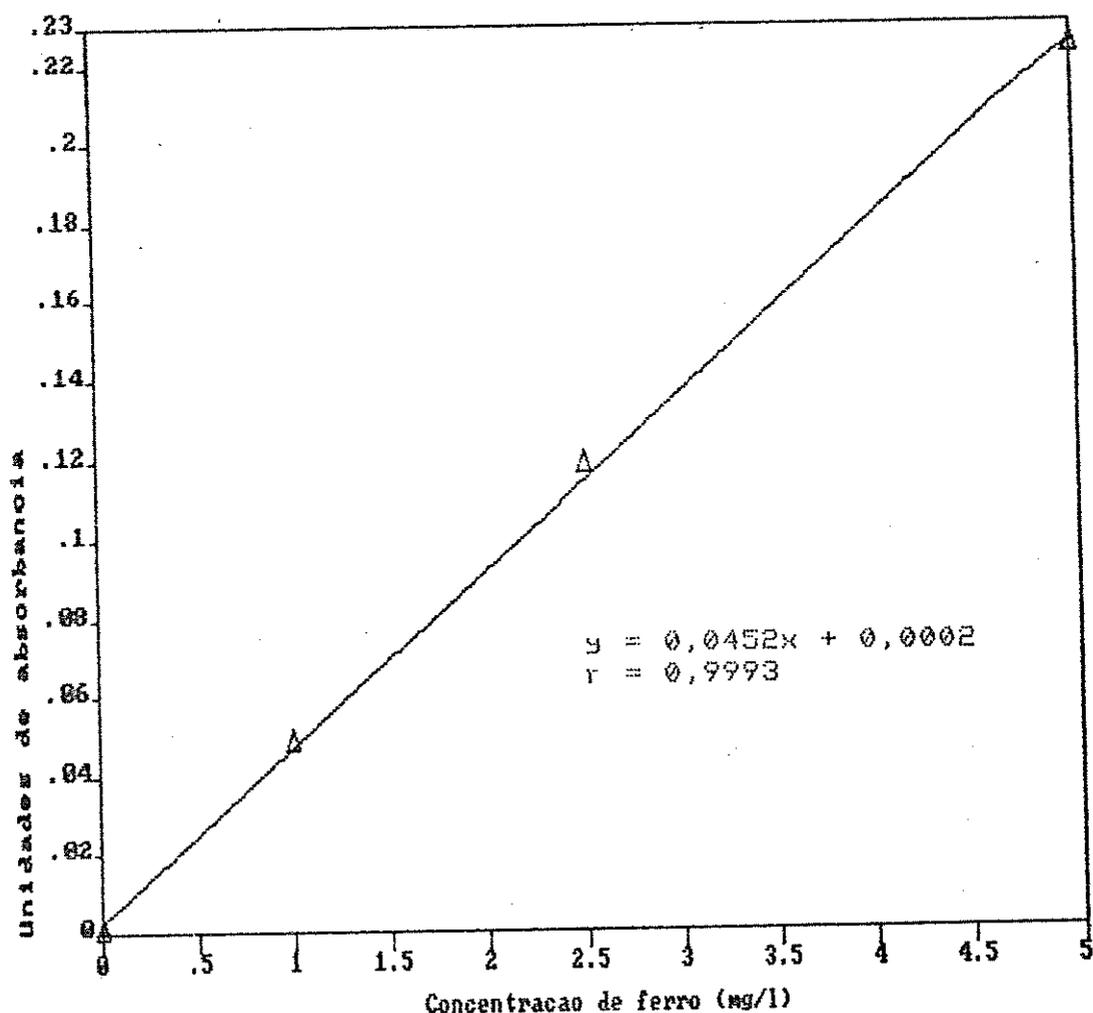


FIGURA 08. Curva-padrão para o ferro obtida pelo método por espectrofotometria de absorção atômica.

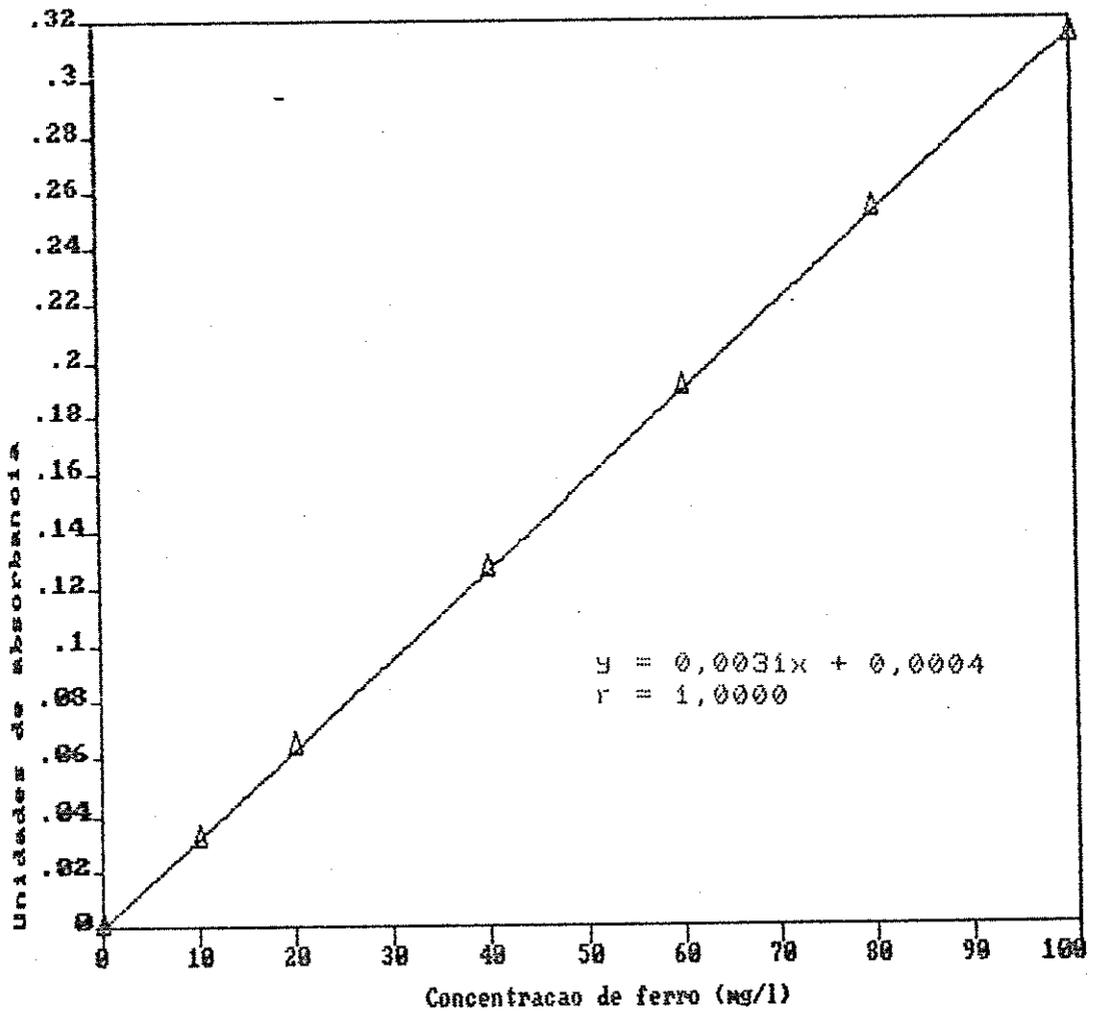


FIGURA 09. Curva-padrão para o ferro obtida pelo método espectrofotométrico.

Os possíveis interferentes causados pela matriz foram avaliados através do Método da Adição de Padrão (2, 51). Por este procedimento, alíquotas conhecidas da solução-padrão são adicionadas na amostra previamente preparada para a análise. As misturas são diluídas a um mesmo volume final, de modo que qualquer interferente esteja presente na mesma concentração em todas as soluções.

As Figuras 10 e 11 apresentam as curvas obtidas pelo método de adição de padrão para ambos os métodos. As curvas de calibração original, ou seja, aquelas obtidas para as soluções aquosas do padrão são incluídas como referências.

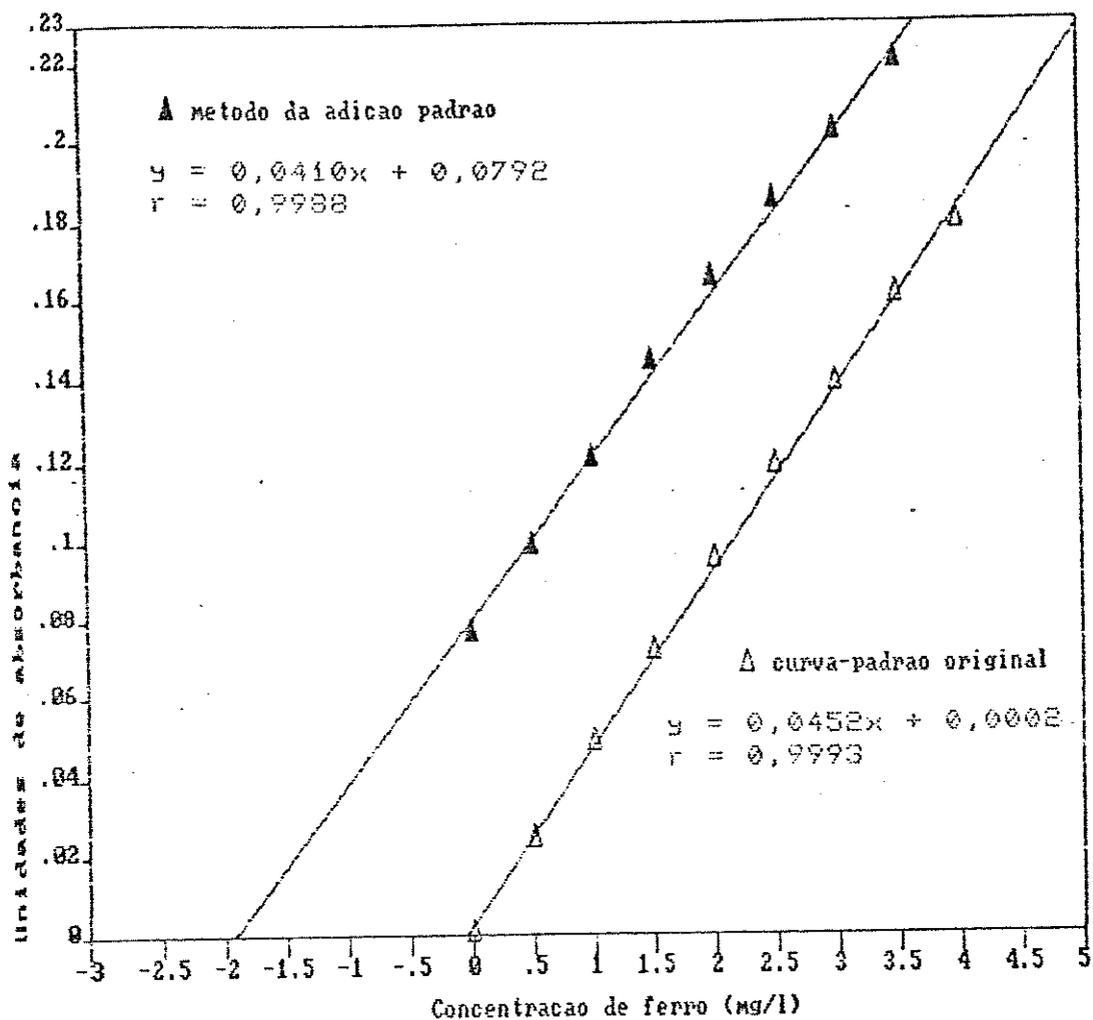


FIGURA 10. Curva-padrão original e curva pelo método de adição de padrão por espectrofotometria de absorção atômica.

Na determinação do ferro por espectrofotometria de absorção atômica, a concentração encontrada utilizando-se o método da adição de padrão foi de 170,00 mg/kg. Por interpolação da curva-padrão obteve-se a concentração de 168,00 + 3,93 mg/kg, para um grau de confiança de 95 %.

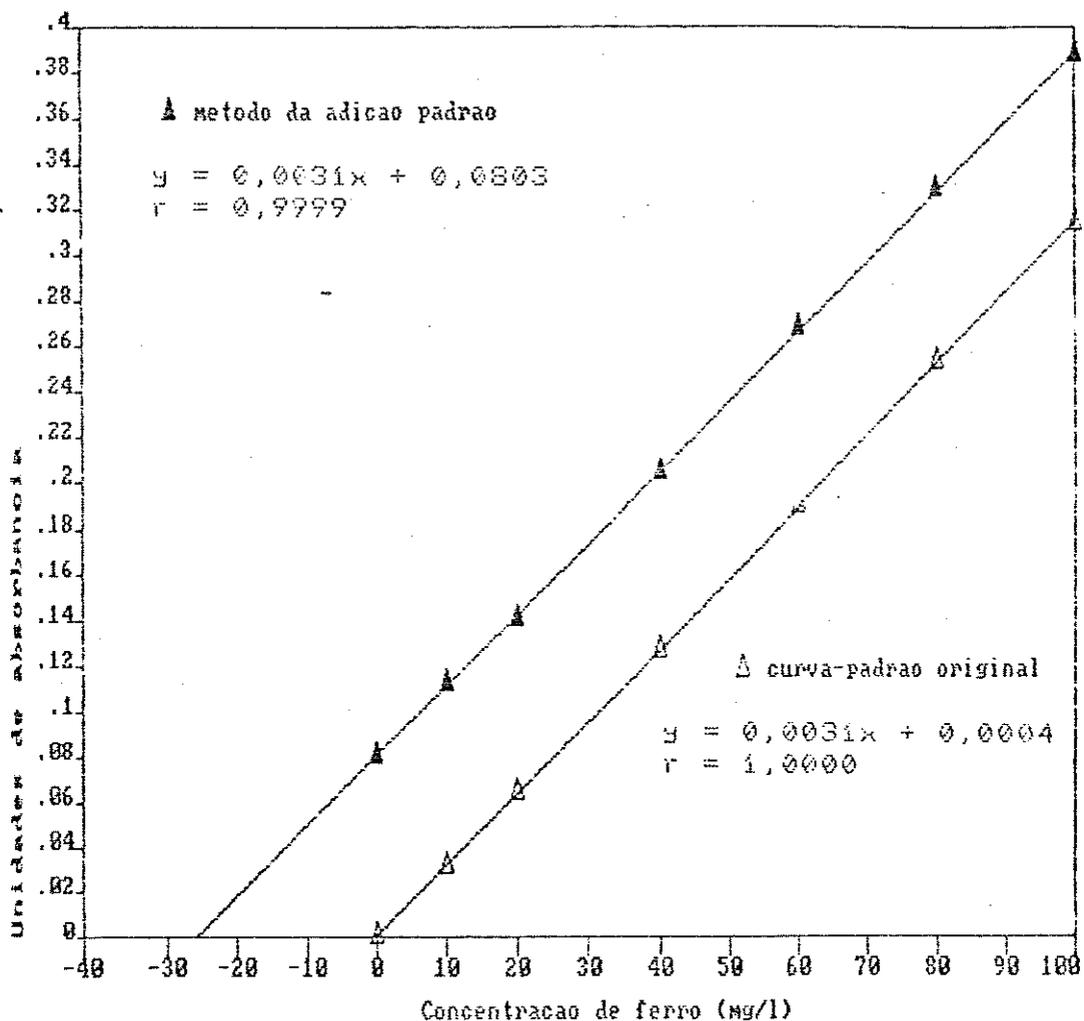


FIGURA 11. Curva-padrão original e curva pelo método da adição padrão, no método espectrofotométrico.

Quando se trabalhou com o método espectrofotométrico, a concentração obtida pelo método da adição padrão foi de 173,00 mg/kg. Por interpolação da curva-padrão a concentração foi de 169,00 + 8,59 mg/kg, para um grau de confiança de 95%.

### 5.3 Quantificação do ferro

Na quantificação inicial das diferentes espécies do ferro presentes no concentrado de tomate utilizando-se os métodos indicados para cada espécie, em particular, obtiveram-se os resultados contidos na Tabela IX.

TABELA IX. Concentração (mg/kg) das diferentes espécies químicas do ferro em concentrado de tomate.

---

Total	53,96
Solúvel	48,34
Iônico Fe(II) + Fe(III)	47,20
Ferroso Fe(II)	40,00
Férrico Fe(III)	7,20
Particulado	5,62
Fortemente complexado	1,14
Orgânico	0,25

---

Os resultados obtidos são representativos das concentrações das várias espécies do ferro que o concentrado de tomate contém, imediatamente após a lata ter sido aberta. Nota-se que cerca de 89 % do metal contido na amostra encontravam-se na forma

solúvel, sendo que desta fração, aproximadamente, 98 % apresentaram-se na forma iônica, Fe(II) + Fe(III). Também é importante salientar que 85 % da fração iônica estavam na forma de Fe(II), enquanto que 15 % se apresentavam como Fe(III). Em relação ao ferro total, cerca de 10% formaram compostos insolúveis, enquanto o ferro fortemente complexado somente participou com pouco mais de 2 %.

Somente 0,46 % do ferro total se encontrava como ferro orgânico, representando uma fração mínima da concentração total. Com base neste percentual, esta fração não foi mais extraída no decorrer do trabalho. Outro fator que determinou a exclusão da quantificação do ferro na fração orgânica, foram as dificuldades operacionais surgidas neste passo. A formação de uma emulsão devido à extração da fração orgânica fez com que a repetibilidade dos dados fosse comprometida.

A faixa de concentração do ferro nas amostras estudadas não foi constante durante o desenvolver do trabalho devido à necessidade de se utilizar novas amostras para cada experimento.

Como o ferro presente no concentrado de tomate é quase que totalmente proveniente da embalagem metálica, a sua concentração aumenta com a vida-de-prateleira do produto.

Neste estudo, trabalhou-se com um produto cuja matéria-prima inicial possuía aproximadamente 13,00 mg de ferro por quilograma de amostra e com o armazenamento atingiu uma concentração de até 170,00 mg/kg.

Através da especificação do ferro no produto, verificou-se que este metal, apesar de proveniente quase que totalmente da la-

ta, se encontrava inicialmente 85 % na forma ferrosa e que segundo ROSANOFF & KENNEDY (56), pode ser biodisponível.

#### 5.4 Oxidação do Fe(II) em concentrado de tomate

A biodisponibilidade do ferro está diretamente relacionada à presença da espécie Fe(II) (38). Com o intuito de se avaliar a variação da concentração do Fe(II) na amostra, foi realizado um estudo de verificação da velocidade de oxidação da espécie.

##### 5.4.1 Curva de oxidação do Fe(II), em solução aquosa

Para se verificar a velocidade de oxidação do Fe(II) em solução, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante subdividido em duas alíquotas.

Uma das alíquotas foi armazenada em refrigerador com temperatura ao redor de 4° C. A outra ficou exposta à temperatura ambiente, ao redor de 26° C.

As amostras provenientes das duas alíquotas foram analisadas quanto ao teor de Fe(II) durante um período de nove dias. A quantificação foi efetuada pelo método com 2-2'-dipiridila.

As concentrações de Fe(II), obtidas nestas condições, estão contidas na Tabela X e podem ser visualizadas na Figura 12.

TABELA X. Concentração de Fe(II), em solução aquosa, em duas condições, em função do tempo.

Tempo (dias)	Concentração de Fe(II) (mg/kg)	
	Temp. ambiente	Sob refrigeração
00	46,44	46,44
01	16,50	28,33
02	8,00	23,84
03	7,17	13,34
06	7,10	12,24
07	7,03	7,00
09	6,87	7,01

Temp. ambiente = temperatura ambiente

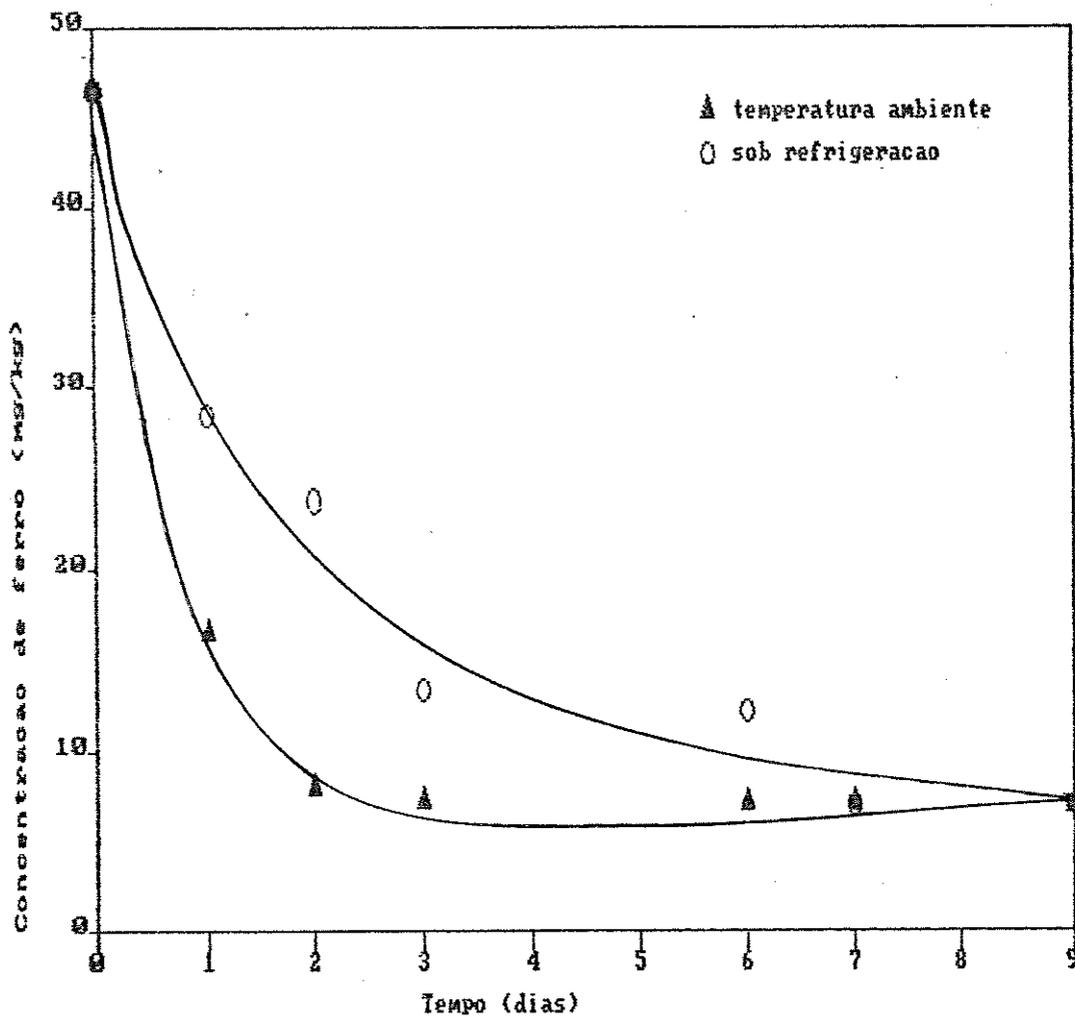


FIGURA 12. Curva de oxidação do Fe(II) no concentrado de tomate, em solução aquosa, em duas condições.

Como pode ser visto, a velocidade de oxidação do Fe(II) no concentrado de tomate, em solução aquosa, foi maior na amostra que ficou exposta à temperatura ambiente para os primeiros dias de exposição.

Pela Tabela X, pode-se verificar que a tendência da concentração de Fe(II) é se estabilizar com o tempo. Essa estabilidade ocorreu mais rapidamente à temperatura ambiente.

#### 5.4.2 Variação nas concentrações das diversas espécies do ferro

O concentrado de tomate é um produto que pode permanecer em refrigerador após a embalagem ter sido aberta. Assim, foi verificada a variação sofrida pelas várias espécies do ferro durante um período de permanência da amostra em refrigerador, procurando reproduzir as condições reais de consumo do produto.

Para evitar erros gerados pela perda de umidade da amostra durante o período em que o experimento foi realizado, o lote homogeneizado foi distribuído em placas de Petri com os pesos controlados, conforme mostrado na Figura 13.

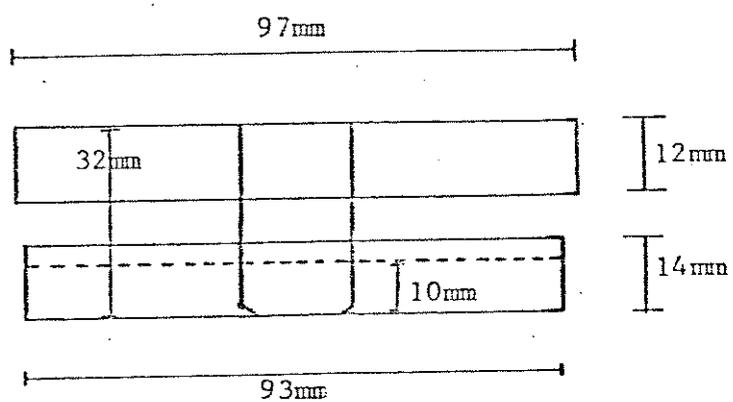
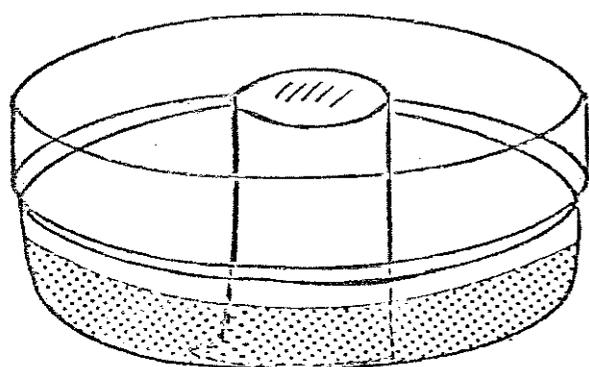


FIGURA 13. Placas com amostras para estudo da variação das várias espécies do ferro.

Foram pesados aproximadamente 80 g de amostras em cada placa e colocados sob refrigeração. Antes de cada análise, a placa foi pesada e calculada a percentagem de umidade. O peso da amostra para análise foi recalculado, com base na perda de água ocorrida.

Foram realizados vários experimentos com a finalidade de se verificar a reprodutibilidade de variações das concentrações das várias espécies do ferro. Os dados obtidos em um destes experimentos estão contidos na Tabela XI e podem ser visualizados na Figura 14.

TABELA XI. Especificação do ferro, em função do tempo.

Tempo (dias)	Concentração (mg/kg)				
	Fe total	Fe sol.	Fe(II)+Fe(III)	Fe(II)	Fe(III)
00	83,03	77,10	76,00	55,40	20,60
01	81,93	76,45	75,25	31,00	44,25
02	82,53	76,25	75,33	30,47	44,86
03	83,52	76,65	75,15	28,31	46,84
04	83,41	77,46	75,58	26,24	49,34
07	83,44	74,32	73,71	16,32	57,39
09	84,61	76,63	75,91	11,73	64,18
10	82,82	75,41	74,19	11,01	63,18

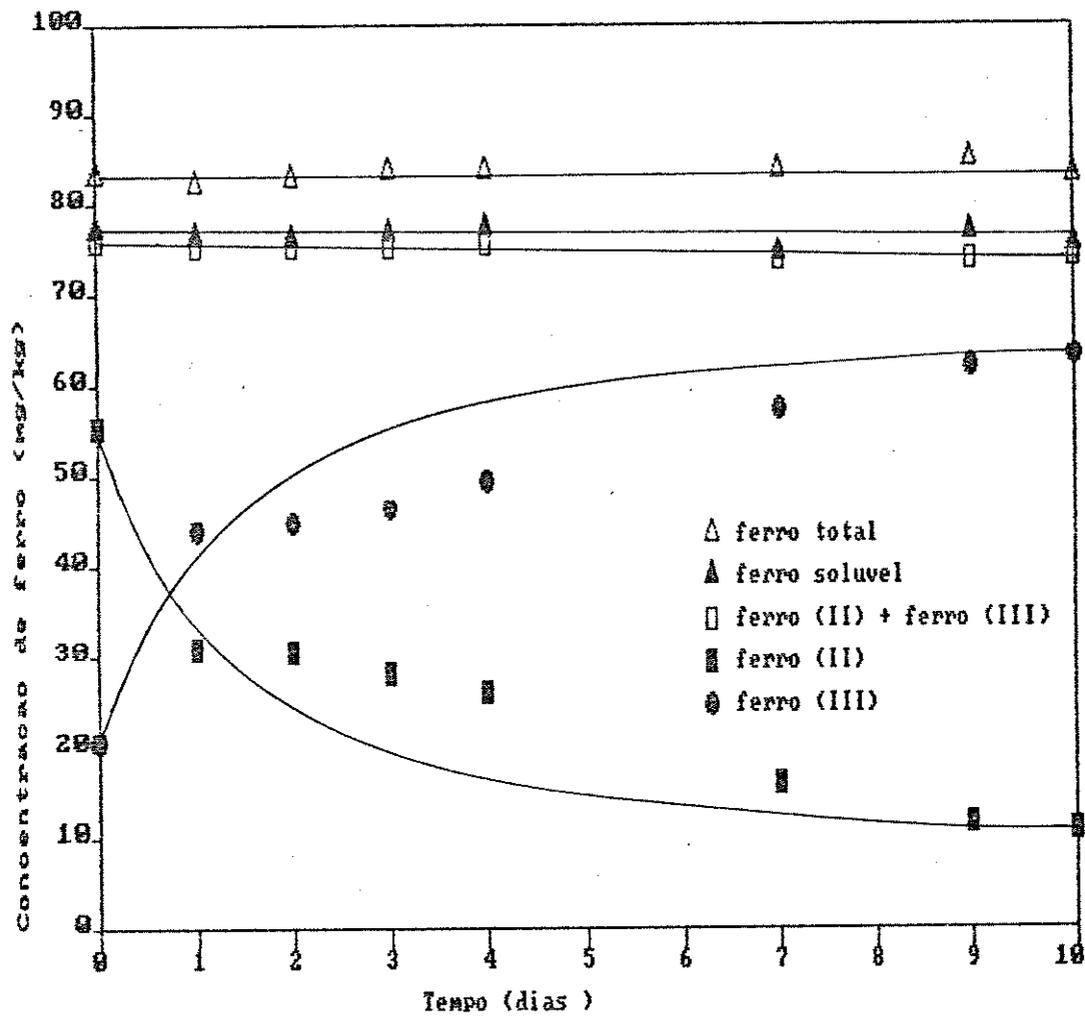


FIGURA 14. Variação das concentrações das diversas espécies do ferro.

Analisando a Figura 14, verificou-se que a abertura da lata de concentrado de tomate, mesmo quando mantida sob refrigeração, provocou modificações nas formas químicas do ferro contido na amostra.

Enquanto as concentrações das espécies do ferro total, do solúvel e do iônico permaneceram praticamente constantes durante o experimento, a concentração da espécie Fe(II) foi reduzida em até 80 % do seu valor original, com um aumento concomitante na concentração na espécie oxidada do metal.

## 6 CONCLUSÕES

A determinação de elementos traços em alimentos tem requerido novos conhecimentos, visto que, a determinação da concentração total do elemento já não satisfaz às necessidades da comunidade científica ligada à área de alimentos.

Tanto sob o ponto de vista nutricional ou toxicológico, faz-se necessário conhecer a forma química na qual o elemento se encontra no alimento, pois a sua toxicidade ou o valor nutricional estão intimamente relacionados com a sua espécie química.

A especiação, um novo campo da química, tem sido aplicada com êxito em estudos dos elementos traços em águas e sedimentos, no que diz respeito, principalmente, à sua toxicidade.

No campo da análise de alimento, este estudo têm se desenvolvido mais lentamente devido a dois fatores: primeiramente pela complexidade da matriz, a qual faz com que surjam protocolos de análise do elemento para cada produto ou grupos de alimentos. Em segundo lugar, pela comunicação limitada que persiste entre químicos, engenheiros de alimentos e nutricionistas, os quais são os principais profissionais atuando nesta área de interface.

Com base nos resultados obtidos na procura de um protocolo para especiação do ferro em concentrado de tomate, chegou-se às seguintes conclusões:

\* O método espectrofotométrico, na região do visível, utilizando o reagente 2-2'-dipiridila, mostrou-se adequado para as determinações das espécies Fe(II) e Fe(III).

\* O estudo da velocidade de oxidação da espécie Fe(II) em função do tempo de estocagem do produto após a abertura da lata, mostrou que a concentração dos íons Fe(II) diminui em até 80%, alterando assim sua biodisponibilidade em aproximadamente sete (7) dias quando armazenado sob refrigeração.

Este trabalho apesar de apresentar um procedimento relativamente simples, em termos analíticos, é de grande importância pois inicia as pesquisas com especificação na área de nutrição.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, H.E., HALL, R.H. & BRISBIN, T.D. Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. Environ. Sci. & Technol., Washington, 14(4):441-443, 1980.
2. ANDRADE, J.C. O papel dos erros determinados em análises químicas. Quím. Nova, Campinas, 10(3):159-165, 1987.
3. ——— ; ROCHA, J.C.; PASQUINI, C. & BACCAN, N. Effect of on-line complexes formation kinetics on the flow injection analysis signal: the spectrophotometric determination of chromium (VI). Analyst, London, 108:621-625, 1983.
4. ——— ; ——— & BACAN, N. On-line oxidation of Cr(III) to Cr(VI) for use with the flow injection analysis. Analyst, London, 109:645-647, 1984.
5. ——— ; ——— & ——— Sequential spectrophotometric determination of chromium (III) and chromium (VI) using flow injection analysis. Analyst, London, 110:197-199, 1985.
6. ANGELUCCI, E.; ARIMA, H.K.; MANTOVANI, D.M.B.; FIGUEIREDO, I.B. & MORAES, R.M. de. Análise química de bebidas não-

-alcoólicas, Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1984. p. 1-3 e 7.

7. \_\_\_\_\_ & MANTOVANI, D.M.B. Minerais em alimentos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1986. p. 21-22
8. \_\_\_\_\_ ; CARVALHO, C.R.L.; CARVALHO, P.R.N.; FIGUEIREDO, I.B ; MANTOVANI, D.M.B. & MORAES, R.M. de. Análises químicas de alimentos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p. 87-89.
9. BERTSCH, P.M. & ANDERSON, M.A. Speciation of aluminum in aqueous solutions using ion chromatography. Anal. Chem., Washington, 61(6):535-539, 1989.
10. CAMPEN, D.V. Iron bioavailability techniques : An overview. Food Technol., Chicago, 37(10):127-132, 1983.
11. CLYDESDALE, F.M. Physicochemical determinants of iron bioavailability. Food Technol., Chicago, 37(10):133-138 e 144, 1983.
12. \_\_\_\_\_ & NADEAU, D.B. Effect of acid pretreatment on the stability of ascorbic acid complexes with various iron sources in wheat flake cereal. J. Food Sci., Chicago, 50(5):1342-1347, 1985.

13. CONSAUL, J.R. & LEE, K. Extrinsic tagging in iron bioavailability research: A critical review. *J. Agric. Food Chem* Washington, 31(4):684-689, 1983.
14. ERDMAN Jr, J.W. Bioavailability of trace minerals from cereals and legumes. *Cereal Chem.*, St. Paul, 58(1), 1981.
15. FELL, G.S. Bioavailability and speciation of trace elements in human nutrition and toxicology. *Trends Anal. Chem.* Amsterdam, 4(4):IV-V, 1985.
16. FLORENCE, T.M. Development of physico-chemical speciation procedures to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium and zinc towards aquatic biotax. *Anal. Chem. Acta*, Amsterdam, 141:73-94, 1982.
17. \_\_\_\_\_ . The speciation of trace elements in waters. *Talanta*, Elmsford, 29 (5):345-364, 1982.
18. \_\_\_\_\_ . Trace elements speciation and aquatic toxicology *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, 2(7):162-166, 1983.
19. FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; ROBERTS, T.; BOEHNE, J. W. & HOVE, E L. Biological availability in animals of iron from common dietary sources. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 18(4):647-651, 1970.

20. GORMAN, J.E. & CLYDESDALE, F.M. The behavior and stability of iron-ascorbate complexes in solution. *J. Food Sci., Chicago*, 48(4):1217-1220 e 1225, 1983.
21. GREGER, J.L. & BAIER, M. Tin and iron content of canned and bottled foods. *J. Food Sci., Chicago*, 46(6):1751-1754, 1981.
22. HART, B.T. & DAVIES, S.H.R. Trace metal speciation in the freshwater and estuarine regions of the Yarra River, Victoria. *Estuarine, Coastal and Shelf Sci., London*, 12:353-374, 1981.
23. HATTULA, M.L.; SARKKA, J.; JANATUINEN, J.; PAASIVIRTA, J. & ROOS, A. Total mercury and methyl mercury contents in fish from lake paijanne. *Environ. Pollut., Basing, Essex* 17(1):19-29, 1981.
24. HAZELL, T. Mineral in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, New York, 46:1-23, 1985.
25. \_\_\_\_\_ & JOHNSON, I.T. Effects of food processing and fruit juices on in-vitro estimated iron availability from cereals, vegetables and fruits. *J. Sci Food Agric., Washington*, 38(1):73-82, 1987.

26. HORVATH, D.J. Trace elements and health. In: NEWBERNE, P.M. ed. Trace substances and health : a handbook, New York, Marcel Dekker, 1976. part 1, p. 319-356.
27. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Determinação espectrofotométrica com 2-2'-dipiridila. In: . Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 39a. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1985. vol. 1, p. 40-41.
28. JACKSON, L.S. & LEE, K. Chemical forms of iron, calcium, magnesium and zinc in black, colong, green and instant black tea. J. Food Sci., Chicago, 53(1):181-184, 1988.
29. JARDIM, W.F. Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias. Ciênc. Hoje, São Paulo, 7(41):78-79, 1988.
30. \_\_\_\_\_ & ALLEN, H.E. Measurement of copper complexation by naturally occurring ligands. In: KRAMER, C.J.M. & DUINKER, J.(ed.) Complexation of trace metals in natural waters. Netherlands, Martinus Nijhoff/W. Junk Publishers, 1984. p. 1-15.
31. JOSLYN, M.A. Methods in food analysis, 2a ed. London, Ed. Academic Press, 1970. p. 250-257.
32. KACPRZAK, J.L. & CHVOJKA, R. Determination of methyl mercu-

- ry in fish by flameless atomic absorption spectroscopy and comparison with an acid digestion method for total mercury. J. A.O.A.C., Washington, 59(1):153-157, 1976.
33. KADAN, R.S. & ZIEGLER Jr., G.M. Iron status in experimental Drum-Dried rice foods. Cereal Chem., St. Paul, 62(3):154-158, 1985.
34. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Effects of ingredients on iron solubility and chemical state in experimental breads. Cereal Chem., St. Paul, 63(1):47-50, 1986.
35. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Changes in iron forms during extrusion processing. Cereal Chem., St. Paul, 64(4):256-259, 1987.
36. LAKSO, J.U.; ROSE, L.J.; PEOPLES, S.A. & SHIRACHI, D.Y. A colorimetric method for the determination of the arsenite arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in biological and environmental samples. J. Agric. Food Chem., Washington, 27(6):1229-1233, 1979.
37. LATUNDE-DADA, G.O. & NEALE, R.J. Review: Availability of iron from foods. J. Food Technol., London, 21(3):255-268 1986.
38. LEE, K. & CLYDESDALE, F.M. Iron sources used in food forti-

- fication and their changes due to food processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, West Palm Beach, 11(2):117-153, 1979.
39. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complexed iron in foods. *J. Food Sci.*, Chicago, 44(2):549-554, 1979.
40. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Chemical changes of iron in food and drying processes. *J. Food Sci.*, Chicago, 45(3):711-715, 715, 1980.
41. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Effect of baking on the forms of iron in iron-enriched flour. *J. Food Sci.*, Chicago, 45(6):1500-1504, 1980.
42. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Effect of thermal processing on endogenous and added iron in canned spinach. *J. Food Sci.*, Chicago, 46(4):1064-1073, 1981.
43. LIU, Y. & INGLE Jr., J.D. Automated two-column ion exchange system for determination of the speciation of trace metals in natural waters. *Anal. Chem.*, Washington, 61(6):525-529, 1989.
44. MANNHEIM, C. & PASSY, N. Internal corrosion and shelf-life of food cans and methods of evaluation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, West Palm Beach, 17(4):371-407, 1982.

45. NADEAU, D.B. & CLYDESDALE, F.M. Effect of acid pretreatment on the stability of citric and malic acid complexes with various iron sources in a wheat flake cereal. *J. Food Biochem.*, Westport, 10(4):241-257, 1986.
46. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Effect of acid pretreatment on the stability of EDTA, cysteine, lactic and succinic acid complexes of various iron sources in a wheat flake cereal. *J. Food Protec.*, Ames, 50(7):587-597, 1987.
47. NOJEIM, S.J. & CLYDESDALE, F.M. Effect of pH and ascorbic acid on iron valence in model systems and in foods. *J. Food Sci.*, Chicago, 46(2):606-611, 1981.
48. \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_ & ZAJICEK, O.T. Effect of redox potential on iron valence in model systems and foods. *J. Food Sci.*, Chicago, 46(4):1265-1268, 1981.
49. NEUBECKER, T.A. & ALLEN, H.E. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.*, Elmsford, NY, 17: 1-14, 1983.
50. PERKIN-ELMER. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry using the HGA graphite furnace. Connecticut, Perkin-Elmer Co., 1981.

51. \_\_\_\_\_ . Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Connecticut, Perkin-Elmer Co., 1982.
52. PRICE, W.J. & ROOS, J.T.H. Analysis of fruit juice by atomic absorption spectrophotometry. I- The determination of iron and tin in canned juice. J. Sci. Food Agric., Washington, 20(7):437-439, 1969.
53. RADHAKRISHNAN, M.R. & SIVAPRASAD, J. Tannin content of sorghum varieties and their role in iron bioavailability. J. Agric. Food Chem., Washington, 28(1):55-57, 1980.
54. RAPSOMANIKIS, S.; DONARD, O.F. & WEBER, J.H. Speciation of lead and methyllead ions in water by chromatography/Atomic absorption spectrometry after ethylation with sodium tetraethylborate. Anal. Chem., Washington, 58(1):35-38, 1986.
55. ROESER, H.P. Iron. J. Food Nutr., 42(2):82-92, 1986.
56. ROSANOFF, A. & KENNEDY, B.M. Bioavailability of iron produced by the corrosion of steel in apples. J. Food Sci., Chicago, 47(2):609-613, 1982.
57. \_\_\_\_\_ ; BRIGGS, G.M. & LUMEN, B.O. Corrosion of iron by ascorbic acid and catalysis of ascorbate oxidation by products of the iron corrosion. J. Agric. Food Chem., Washington, 33(5):891-896, 1985.

58. SCHRICKER, B.R.; MILLER, D.D. & STOUFFER, J.R. Measurement and content of nonheme and total iron in muscle. *J. Food Sci.*, Chicago, 47(3):740-743, 1982.
59. SCHWEDT, G. Species analysis of elements in foods. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, 2(2):39-42, 1983.
60. SEOW, C.C.; ABDUL RAHMAN, Z. & ABDUL AZIS, N.A. Iron and tin content of canned juices and nectars. *Food Chem.*, Barking, 14(2):125-134, 1984.
61. SMITH, K.T. Effects of chemical environment on iron bio-availability measurements. *Food Technol.*, Chicago, 37(10):115-120, 1983.
62. SUBBA RAO, K. & NARASINGA RAO, B.S. In-vitro studies on chelating agents as potential iron absorption promoters. *Food Chem.*, Barking, 17(1):13-23, 1985.
63. SUBRAMANIAN, K.S. Determination of chromium (III) and chromium (VI) by ammonium pyrrolidinecarbodithioate methyl isobutyl ketone furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, Washington, 60(1):11-15, 1988.
64. THOMAS, G. Létain dans les aliments. *Ann. Fals. Exp. Chem.* Paris, 77(826):125-132, 1984.

65. URASA, I.T. & NAM, S.H. Direct determination of chromium (III) and chromium (VI) with ion chromatography using direct current plasma emission as element-selective detector. *J. Chron. Sci.*, Niles, IL, 27(1):30-37, 1989.
66. UNDERWOOD, E.J. Trace elements in human and animal nutrition. 4th ed., New York, Academic Press, 1976., 346p.
67. WATTS, J.D.; BOYER, K.W.; CORTEZ, A. & ELKINS Jr., E.R. A simplified method for the gas-liquid chromatographic determination of methyl mercury in fish and shellfish. *J. A.O.A.C.*, Washington, 59(6):1226-1233, 1976.
68. WEBER, G. Speciation of tin in lemon juice: an example of trace metal speciation in food. *Anal. Chem. Acta*, Amsterdam, 200:79-88, 1987.
69. WILLIAMS, S.ed. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed., Arlington, A.O.A.C., 1984.
70. WILSON, D.L. Separation and concentration techniques for atomic absorption: a guide to the literature. *Atom. Abs. Newsl.*, Norwalk, Connecticut, 18(1):113-17, 1979.
71. YAMANAKA, S. & UEDA, K. High ethylmercury in river fish by man-made pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New

York, 15(3):405-414, 1976.

72. YASUI, A.; TSUTSUMI, C. & TODA, S. Selective determination of inorganic arsenic (III), (V) and organic arsenic in biological materials by solvent extraction atomic absorption spectrophotometry. *Agric. Biol. Chem., Tokyo*, 42 (11):2139-2145, 1978.