



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GREICE TREVISAN MACAROVSCHA

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS METÁLICOS EM NUTRIÇÃO
ENTERAL**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: SOLANGE CADORE

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR GREICE TREVISAN MACAROVSCHA, E ORIENTADA PELO PROFA. DRA. SOLANGE CADORE.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M118d Macarovscha, Greice Trevisan (1978-).
Determinação de elementos metálicos em nutrição
enteral / Greice Trevisan Macarovscha,. – Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

Orientador: Solange Cadore.
Doutorado (tese) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Nutrição enteral. 2. ICP OES. 3. GF AAS.
I. Cadore, Solange. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Determination of metallic elements in enteral nutrition

Palavras-chave em inglês:

Enteral nutrition
ICP OES
GF AAS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Solange Cadore [Orientador]
Rafael Arromba de Sousa
Marcelo Antonio Morgano
Celio Pasquini
Carol Hollingworth Collins

Data de defesa: 19/12/2011

Programa de pós-graduação: Química

*Dedico esta tese aos meus pais,
meu irmão e ao meu namorado.*

Agradecimentos

A minha orientadora Solange Cadore por todo apoio e amizade durante todos esses anos. Ao professor Nivaldo Baccan pelos conselhos e toda sua experiência.

Ao Instituto de Química da Unicamp e ao CNPq por me propiciar a estrutura e a bolsa para esse projeto. Ao INCTAA pelo apoio ao projeto.

Aos meus amigos queridos que estiveram comigo ao longo desses anos, em especial a Mirla, Rafael, Sabrina, Thiago, Gisele, Larissa e Laís. Todos que estiveram comigo nessa longa caminhada com períodos tristes e felizes, por pouco tempo ou muito tempo tiveram papel fundamental para a finalização desse projeto.

Aos meus pais que foram meu apoio durante esses anos. Ao meu irmão.

Ao meu querido Michel que não tenho nem palavras para descrever a importância de sua presença em minha vida.

E a Deus por me conceder a vida e seu amor.

*“Que o teu alimento seja o teu remédio e
que teu remédio seja o teu alimento”*

Hipócrates

Súmula Curricular

- **Formação**

- **Mestrado em Química (área de Química Analítica)** - Avaliação de interferências na pré-concentração *on-line* de arsênio utilizando sílica gel modificada com óxido de zircônio, *UNICAMP, 2002 – 2005*;

- **Bacharelado em Química** – *UNICAMP, 1997 – 2002*.

- **Participação no Programa de Estágio Docente:**

- Atuação como estagiária do Grupo 1, na disciplina de QA-313 (Química III - Engenharia Química), ministrada no 2º semestre de 2006. Supervisão do professor Jarbas José Rodrigues Rohwedder.

- Atuação como PED B, na disciplina de QA-282 (Química Clássica), ministrada no 1º semestre de 2009. Supervisão da professora Solange Cadore.

- Atuação como PED C, na disciplina de QA-213 (Química II), ministrada no 1º Semestre de 2010. Supervisão da professora Solange Cadore.

- **Participação em congressos:**

- Macarovscha, G. T.; Cidade, M.; Cadore, S., “Avaliação da disponibilidade *in vitro* de espécies metálicas essenciais em nutrição enteral”, 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão, Brasil.

- de Oliveira, A.; Macarovscha, G. T.; Bacchan, N.; Cadore, S., “Extração de metais assistida por ultrassom em amostras de arroz e folhas empregando EDTA em meio alcalino e detecção por ICP OES”, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia, Brasil.

- Macarovscha, G. T., Pereira, C. D., Santos, M. C., Nóbrega, J. A., Cadore, S., “Avaliação do uso de ICP-MS na determinação de elementos essenciais e contaminantes em amostras de nutrição enteral industrializadas”, XV Encontro Nacional de Química Analítica, 2009, Salvador, Brasil.

- Macarovscha, G. T. , Cadore, S., “Evaluation of an analytical method for determination of inorganic species in enteral nutrition using ICP OES”. Euroanalysis 2009, Innsbruck, Austria.

- Macarovscha, G. T.; Peixoto, R. R. A.; Cadore, S., “Determinação direta de Na, Mg e Ca por FAAS em soro de leite”, XI Encontro nacional de Contaminantes Inorgânicos e VI Simpósio sobre Essencialidade de Elementos na Nutrição, 2008, Campinas, Brasil.

- Gianeti, T. M. R.; Castro, T. S.; Macarovscha, G. T.; Cadore, S., “Fotólise oxidativa versus digestão ácida no preparo de amostras de mel: comparação dos diferentes métodos”, XI Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos e VI Simpósio sobre Essencialidade de Elementos na Nutrição, 2008, Campinas, Brasil.

- Macarovscha, G. T., Cadore, S., “Determinação de alumínio em amostras de alimentos para nutrição enteral industrializados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite”, II Congresso Iberoamericano y IV Congresso Argentino de Química Analítica, 2007, Buenos Aires, Argentina.

- Macarovscha, G. T., Sousa, R. A., Motoda, L. K., Cadore, S., “Estudo de um método para a determinação direta de espécies metálicas em amostras de nutrição enteral líquidas por ICP OES”, 14^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa, Paraíba.

- Macarovscha, G. T., Franco, C. M., Gianeti, T. M. R., Sousa, R. A., Cadore, S., "Otimização dos fatores experimentais de um reator de fotólise oxidativa para a determinação de espécies metálicas em mel por ICP OES", 30^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, Brasil.

- Macarovscha, G. T., Bortoleto, G. G., Cadore, S., "Estudo de interferentes na pré-concentração e determinação *on line* de arsênio utilizando sílica gel modificada com oxido de zircônio, 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador, Brasil.

- **Participação em trabalhos apresentados**

- Macarovscha, G. T., Teles, V. L. G, Peixoto, R. R. A., Mendes, T. M. F. F., Cadore, S., "Determinação de espécies metálicas em Ingá (*Ingá edulis Mart.*), Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum.*) e Dão (*Ziziphus mauritiana Lam.*) de origem amazônica por ICP OES", 32^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, Brasil.

- Atauri, G. ; Macarovscha, G. T. ; Sousa, R. A. ; Cadore, S., "Determination of mineral constituents in milk whey", IDF/INRA International Symposium, 2008, Saint-Malo, França.

- Gianeti, T. M. R. ; Castro, T. S. ; Macarovscha, G. T. ; Cadore, S., "Determination of inorganic species in honey using ICP OES after oxidative photolyse", European Symposium on Atomic Spectrometry: Electrothermal Atomization, Vaporization and Laser Sampling, 2008, Weimar, Alemanha.

- Macarovscha, G. T. , Santos, M. S., Motoda, L. K. , Cadore, S., "Determination of inorganic species in liquid enteral nutrition after microwave sample digestion by ICP OES", Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2008, Salvador, Brasil.

- Castro, T. S.; Gianeti, T. M. R.; Macarovscha, G. T.; Cadore, S., “Determinação de minerais em mel por ICP OES após tratamento da amostra”, XVI Congresso Interno de Iniciação Científica Unicamp 2008, Campinas, Brasil.

- Motoda, L. K. ; Macarovscha, G. T.; Cadore, S., “Determinação de espécies metálicas em nutrição enteral por ICP OES”, XVI Congresso Interno de Iniciação Científica Unicamp, 2008, Campinas, Brasil.

- Atauri, G. ; Macarovscha, G. T. ; Cadore, S., “Determinação de minerais em soro de leite com espectrometria de emissão óptica em plasma de argônio com acoplamento indutivo ICP OES”, XVI Congresso Interno de Iniciação Científica Unicamp, 2008, Campinas, Brasil.

- Macarovscha, G. T. ; Motoda, L. K. ; Atauri, G. ; Cadore, S., “Análise Inorgânica de soro de leite e nutrição enteral por ICP OES”, 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia, Brasil.

- Macarovscha, G. T., Bortoleto, G. G., Cadore, S., “A FIA-HG-AAS system to determination of arsenic in Brazilian beverages”, 10th International Conference on Flow Analysis, 2006, Porto, Portugal.

- Macarovscha, G. T., Bortoleto, G. G., Cadore, S., “Silica modified with zirconium oxide for the determination of arsenic in steels using a FI-HG AAS system”, VII European Furnace Symposium on Atomic Absorption Spectrometry, Electrothermal Vaporization and Atomization (VII EFS) and Solid Sampling Colloquium with Atomic Spectrometry (XII SSC), 2006, St. Petersburg, Russia.

- Martino, M. G., Sousa, R. A., Macarovscha, G. T., Cadore, S., “Determinação de íons metálicos em sucos de frutas por ICP OES”, 6^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2005, Campinas, Brasil.

- Macarovscha, G. T., Bortoleto, G. G., Cadore, S., "A factorial optimization of experimental parameters for As preconcentration and determination by FI-HG AAS", Euroanalysis XIII, 2004, Salamanca, Espanha.

- Ito, H. A., Macarovscha, G. T., Silva, J. C. J., Baccan, N., Cadore, S., "Multielementar determination in yogurt by inductively coupled plasma optical emission spectrometry", 8th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2004, Paraty, Brasil.

- **Artigos Publicados**

- 1) Peixoto, Rafaella R. A.; Macarovscha, Greice Trevisan; Cadore, Solange. "On-line preconcentration and determination of zinc using zincon and flame atomic absorption spectrometry", *Food Analytical Methods*, DOI: 10.1007/s12161-011-9316-z.
- 2) De Martino, Mariana Gonçalves ; Macarovscha, Greice Trevisan ; Cadore, Solange. "The use of zincon for preconcentration and determination of zinc by flame atomic absorption spectrometry", *Analytical Methods*, v. 2, p. 1258-1262, 2010.
- 3) Macarovscha, G. T., Bortoleto, G. G., Cadore, S., "Silica modified with zirconium oxide for on-line determination of inorganic arsenic using a hydride generation atomic absorption system", *Talanta*, v. 71, p. 1150-1154, 2007.
- 4) Bortoleto, G. G., Macarovscha, G. T., Cadore, S., "Determination of cadmium by flame-atomic absorption spectrometry after preconcentration with silica gel modified with cupferron", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 2, p. 313-317, 2004.

Resumo

Determinação de elementos metálicos em nutrição enteral

A nutrição enteral é um alimento com finalidade de suprir todas as necessidades nutricionais de um indivíduo que está incapacitado de se alimentar da forma convencional. São alimentos encontrados comercialmente em forma sólida ou líquida, prontos para o consumo, cuja composição inclui carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais em quantidades suficientes para atingir a ingestão diária recomendada para um indivíduo saudável.

A legislação brasileira regula os elementos metálicos essenciais e o limite máximo de contaminantes em alimentos. Para o estudo dessas espécies metálicas nas nutrições enterais, as técnicas de ICP OES e GF AAS foram utilizadas.

As amostras foram analisadas por ICP OES após o tratamento em forno de micro-ondas fechado. Após a otimização das condições experimentais do ICP OES (potência da RF, vazão de nebulização e vazão auxiliar) as espécies Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, V e Zn tiveram sua exatidão avaliada através de experimentos de adição e recuperação, obtendo-se valores entre 90 e 110% e RSD menores que 5%, para a maior parte dos elementos. Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn foram quantificados nas amostras enquanto que as espécies contaminantes (Cd, Hg, Pb e Se) e outros elementos essenciais (Cu, Cr, Mo, Se) não puderam ser quantificados pois estavam abaixo do LOQ do método.

Com as condições de GF AAS (tempo e temperatura de pirólise e de atomização, uso de modificador químico) otimizadas e as amostras suspensas em CFA-C foram obtidas exatidões adequadas e RSD menores que 5% para as determinações de Al nas amostras. Diferentes tipos de embalagem não influenciaram o teor de Al nas amostras. Chumbo e cádmio também foram determinados por GF AAS, usando amostras mineralizadas em forno de micro-ondas fechado. Nas condições experimentais otimizadas a exatidão foi avaliada por um estudo de recuperação obtendo-se recuperações adequadas.

O LOQ para Pb e Cd atendem os valores da legislação vigente. Essas espécies foram quantificadas nas amostras e todos os resultados observados se encontram abaixo do limite máximo tolerado de contaminantes.

Um estudo de disponibilidade foi feito para avaliar a fração disponível dos elementos metálicos declarados na amostra. Esse estudo foi realizado *in vitro*, visando uma simulação dos processos digestivos e de absorção que ocorrem no trato gastrointestinal de um indivíduo. Os resultados mostraram que a disponibilidade dos elementos estudados nas amostras de nutrição enteral tornam esse tipo de alimento adequado para o seu fim.

Abstract

Determination of metallic elements in enteral nutrition

Enteral nutrition is a food that aims to supply all the nutritional necessities of a person who is incapable of feeding in the conventional way. They are meals commercially available in solid or liquid forms, usually ready for consumption. These commercial meals include carbohydrates, proteins, lipids, vitamins and minerals in sufficient quantities in their composition, in order to reach the daily recommended amounts for a healthy individual.

Brazilian legislation regulates the essential metallic elements and the maximum contaminants in food. For the study of metallic elements in enteral nutriment, the techniques of ICP-OES and GF AAS were used.

ICP OES was used for the analysis after sample treatment in a closed microwave oven. After experimental optimization of the ICP OES parameters (RF power, nebulization flow, and auxiliary flow) the method accuracy was evaluated using addition and recovery experiments. For the majority of the elements recoveries between 90 and 110% and RSD less than 5% were obtained. Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na and Zn were quantified in the samples. The contaminants species (Cd, Hg, Pb, Se) and the other essential elements (Cr, Cu, Mo, Se) were below the LOQ and could not be quantified.

Using GF AAS optimized conditions (pyrolysis and atomization time and temperature and use of chemical modifiers) with the samples suspended in CFA-C it was possible to obtain adequate accuracies and RSD lower than 5% for the determination of Al in the enteral samples. Different types of packaging did not influence the content of Al in the samples. Lead and Cd were determined by GF AAS after sample treatment by microwave radiation. Under the optimized experimental conditions the method accuracy was evaluated by an addition and recovery study. The LOQ for Pb and Cd using GF AAS are in accordance with the values established by the legislation. The determination of Cd and Pb showed that the concentrations in all the samples analyzed are below the maximum tolerated value.

A bioavailability study was carried out to evaluate the available fraction of the metallic elements declared in the sample's label. The *in vitro* study simulated the digestive and absorption processes that occur in the gastrointestinal tract of an individual. The results showed that the availability of elements in the samples of enteral nutrition make this type of food suitable for their purpose.

Sumário

Lista de abreviaturas.....xix

Lista de tabelas.....xx

Lista de figuras.....xxii

1. Introdução.....	1
1.1 Terapia de Nutrição Enteral.....	1
1.2 Necessidades diárias de nutrientes.....	3
1.3 Importância dos elementos traços nas nutrições enterais.....	4
1.4 A determinação de elementos traços em amostras de nutrição enteral.....	11
1.5 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite.....	12
1.6 Espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado – ICP OES.....	15
2. Objetivos.....	18
3. Parte Experimental.....	19
3.1 Vidrarias, Reagentes e Amostras.....	19
3.2 Instrumentação.....	21
3.3 Tratamento da amostra.....	24
3.4 Procedimento para ensaio <i>in vitro</i> da bioacessibilidade das espécies estudadas.....	25
3.5 Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES.....	25
3.6 Otimização das temperaturas de pirólise e de atomização do GF AAS.....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1 Uso do ICP OES para determinação dos elementos metálicos de interesse nas amostras de nutrição enteral.....	27
4.1.1 Estudos preliminares.....	27
4.1.2 Otimização de parâmetros instrumentais do ICP OES.....	29
4.1.3 Avaliação do uso de padrão interno.....	31

4.1.4	Figuras de mérito para a determinação de espécies metálicas em nutrição enteral por ICP OES.....	34
4.1.4.1	Exatidão do método	34
4.1.4.2	Cálculo do limite de detecção e de quantificação	38
4.1.5	Aplicação do método desenvolvido para as amostras de nutrição enteral..	39
4.2	Uso de GF AAS para a determinação das espécies de interesse nas amostras de nutrição enteral.....	47
4.2.1	Determinação direta de espécies metálicas por GF AAS empregando reagente alcalino (CFA-C).....	47
4.2.1.1	Estudo da concentração de CFA-C.....	48
4.2.1.2	Influência do uso de CFA-C nas determinações de Al.....	50
4.2.1.3	Otimização multivariada das condições do GF AAS para determinação de Al utilizando CFA-C 10%.....	51
4.2.1.4	Figuras de mérito para determinação de Al por GF AAS usando CFA-C ...	53
4.2.1.5	Determinação de Al nas amostras de nutrição enteral.....	54
4.3	Determinação de Pb e Cd por GF AAS em amostras de nutrição enteral	56
4.3.1	Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para Cd e Pb.....	56
4.3.2	Perfil dos picos nas condições otimizadas	58
4.3.3	Influência da acidez	60
4.3.4	Figuras de mérito	62
4.3.4.1	Exatidão do método	62
4.3.4.2	Cálculo do limite de detecção e de quantificação	63
4.3.5	Determinação de Pb e Cd em amostras de nutrição enteral usando GF AAS.....	64
4.4	Avaliação da bioacessibilidade <i>in vitro</i> das espécies metálicas na nutrição enteral	64
5.	Conclusões	68
6.	Tratamento dos resíduos gerados	69
7.	Referências	70

Lista de Abreviaturas

- AAS: do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BEC: do inglês *Background Equivalent Concentration*
- CFA-C: mistura de aminas terciárias
- EDL: do inglês *Electrodless Discharge Lamp*
- EDTA: do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- EIE's: do inglês *Easily Ionizable Elements*
- ET AAS: do inglês *Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry*
- GF AAS: do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
- HG-AAS: do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*
- HPLC: do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IDR: Ingestão Diária Recomendada
- ICP-MS: do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*
- ICP OES: do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
- JECFA: do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
- LOD : do inglês *Limit of Detection*
- LOQ: do inglês *Limit of Quantification*
- RF: Radio-frequencia
- RSD: do inglês *Relative Standard Deviation*
- SBR: do inglês *Signal to Background Ratio*
- SCD: do ingles *Segmented Array Charge-coupled Detector*
- STPF: do inglês *Stabilized Temperature Platform Furnace*
- THGA: do inglês *Transversely Heated Graphite Atomizer*
- TNE: Terapia de Nutrição Enteral
- TNP: Terapia de nutrição Parenteral

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ingestão diária recomendada (IDR) segundo a ANVISA].....	5
Tabela 2: Formas em que os elementos essenciais são adicionados nas nutrições enterais (conforme descrito nas embalagens).	6
Tabela 3: Limites máximos de contaminantes nos alimentos segundo a ANVISA	7
Tabela 4: Funções fisiológicas de certos elementos metálicos no organismo.	8
Tabela 5: Alguns exemplos de modificadores químicos utilizados em GF AAS.....	15
Tabela 6: Apresentação, indicação e embalagens das amostras estudadas.....	20
Tabela 7: Condições experimentais utilizadas no ICP OES para os estudos preliminares.....	22
Tabela 8: Condições experimentais utilizadas na otimização e determinação das espécies metálicas no ICP OES.	23
Tabela 9: Condições instrumentais utilizadas no GF AAS.	24
Tabela 10: Programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas fechado de alta pressão.	24
Tabela 11: Temperaturas e modificadores químicos utilizados para otimização das condições para determinação de Cd, Pb e Al por GF AAS.....	26
Tabela 12: Concentrações encontradas nas amostras (Am.), concentrações declaradas (Conc decl.), média das recuperações (Rec) e LOD.....	28
Tabela 13: Concentrações finais adicionadas de analitos em mg L^{-1}	32
Tabela 14: Valores de recuperação, RSD e SBR para as amostras estudadas.	33
Tabela 15: Resultados obtidos para o estudo de exatidão do método, para as determinações por ICP OES.....	35
Tabela 16: Valores de LOD e de LOQ para o método proposto por ICP OES.....	38
Tabela 17: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L^{-1} , para as amostras da marca denominada como NUT.....	40
Tabela 18: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L^{-1} , para as amostras da marca denominada como ABB.....	41
Tabela 19: Concentrações obtidas e declaradas na embalagem, em mg L^{-1} , para as amostras da marca denominada como ABB.....	42

Tabela 20: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L ⁻¹ , para as amostras da marca denominada como NES.....	43
Tabela 21. Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L ⁻¹ , para as amostras da marca denominada como SUP.....	44
Tabela 22: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L ⁻¹ , para as amostras da marca denominada como NOV.	45
Tabela 23: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mgL ⁻¹ , para as amostras da marca denominada como NOV.	46
Tabela 24: Coeficientes angulares das curvas de calibração em diferentes concentrações de CFA-C.....	49
Tabela 25: Níveis escolhidos para o planejamento fatorial.	52
Tabela 26: Média das recuperações obtidas para amostras de nutrição enteral diluídas em CFA-C 10%.	54
Tabela 27: Concentração de Al encontrado nas amostras de nutrição enteral analisadas.....	55
Tabela 28: Condições otimizadas para Cd e Pb, utilizadas para obter os perfis dos picos, na ausência e na presença do modificador químico (Mg(NO ₃) ₂).	59
Tabela 29: Valores de inclinação encontrados para as diferentes curvas analíticas. ...	62
Tabela 30: Resultados obtidos para a exatidão do método para determinação de Cd e Pb por GF AAS.	63
Tabela 31: Valores de LOD, LOQ e LOQ do método, obtidos para Pb e Cd, na quantificação por GF AAS.....	63
Tabela 32: Concentrações disponíveis encontradas (mg L ⁻¹) (Conc) e fração bioacessível (%) para as amostras NUT3, NOV3,NOV4 e ABB1.	66
Tabela 33 Concentrações disponíveis encontradas (mg L ⁻¹) (Conc) e fração bioacessível (%) para as amostras ABB2, SUP1 e SUP3.....	66
Tabela 34: Absorção dos elementos metálicos descritas na literatura].....	67

Lista de Figuras

Figura 1: Métodos de fornecimento utilizados na terapia de nutrição enteral 1A: Via Nasogástrica, 1B: Via Nasoentérica, 1C: Gastrotomia e um 1D: Jejunostomia	3
Figura 2: Corte transversal de uma tocha de um ICP OES	17
Figura 3: Razões Mg II/MgI obtidas para as amostras “A” e “B” no estudo da vazão de nebulização da amostra.	29
Figura 4: Razões Mg II/MgI obtidas para as amostras “A” e “B” no estudo da potência do plasma.....	30
Figura 5: Razões Mg II/MgI obtidas para as amostras “A” e “B” no estudo da vazão do gás auxiliar.	31
Figura 6: Curvas de calibração até $70 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al em diferentes concentrações de CFA-C utilizando o modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	49
Figura 7: Curvas de pirólise e atomização do Al em diferentes diluições da amostra... ..	50
Figura 8: (a) Gráfico de Pareto para otimização das condições para determinação de Al em amostras de nutrição enteral por GF AAS. (b) Gráfico de efeitos principais na otimização das condições para determinação de Al em amostras de nutrição enteral por GF AAS.	52
Figura 9: Perfil das temperaturas de pirólise e de atomização para Cd, utilizando o modificador químico: Pd/ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	57
Figura 10: Perfil das temperaturas de pirólise e de atomização para Pb utilizando o modificador químico: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	58
Figura 11: Perfis dos sinais para Cd, em amostra de nutrição enteral.....	59
Figura 12: Perfil do pico para Pb, em amostra de nutrição enteral.	60
Figura 13: Comparação das curvas de Pb em diferentes concentrações finais de ácido nítrico.	61
Figura 14: Comparação das curvas de Cd em diferentes concentrações de ácido nítrico.	61

1. Introdução

A ingestão e absorção de uma dieta nutricional adequada são necessárias para manter a composição normal do corpo humano e o funcionamento do organismo, mas em alguns casos, como em pacientes incapacitados de se alimentar de forma convencional, alguns tipos de técnicas devem ser utilizadas para o fornecimento de todos os nutrientes de forma a garantir a sua recuperação e bem estar [1].

Já se sabe que a má nutrição é comum em pacientes hospitalizados, podendo-se considerar que 50% dos pacientes são desnutridos, não importando o tamanho/tipo de hospital, a idade, a doença de base ou a classificação socioeconômica dos mesmos. É evidente também que a desnutrição está ligada a um aumento de complicações no pós-operatório, como retardo na cicatrização das feridas e anastomoses intestinais, aumento da incidência de infecções por diminuição do sistema imunológico e, conseqüentemente, prolongamento no tempo de hospitalização e redução nas chances de sobrevivência [2].

A terapia nutricional torna-se então a forma mais difundida de garantir aos pacientes incapacitados todos os nutrientes necessários, através da Terapia de Nutrição Enteral (TNE) e Terapia de Nutrição Parenteral (TNP).

1.1 Terapia de Nutrição Enteral

Já se passaram mais de 30 anos desde que Gauderer *et al.* [3] descreveram um tubo gástrico para a alimentação enteral e, desde então, muitos centros ao redor do mundo têm publicado resultados favoráveis com esse conceito, sendo utilizado tanto em crianças como em adultos e idosos [4,5].

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a nutrição enteral é o “alimento para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida ou estimada, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializado ou não, utilizada exclusiva

ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas” [6].

Nos Estados Unidos existem à venda mais de 100 tipos de nutrições enterais [7].

No Brasil existem atualmente oito empresas que fornecem alimentos para nutrição enteral, das quais apenas três são nacionais: Prodieta Nutrição Clínica – Brasileira; Nuteral – Brasileira; Nutrimea – Brasileira; Support – Francesa; Nestlé Nutrition – Suíça; Abbott – Americana; Fresenius-Kabi – Alemã, e Bbraun – Alemã [8].

A alimentação enteral é indicada quando o paciente possui as funções gastrointestinais intactas, mas não está apto para consumir calorias suficientes para todas as demandas metabólicas. A técnica é aplicada com sucesso em pacientes com câncer, AIDS, doenças do fígado, falência respiratória, infecções intestinais, traumas, queimaduras, incapacidade cerebral e recuperações cirúrgicas tanto no campo neonatal e pediátrico como no geriátrico [9].

As contraindicações para a nutrição enteral incluem pacientes com obstrução intestinal, peritonites difusas, vômitos constantes, diarreias severas e paralisia do íleo [2].

Vários métodos de fornecimento de nutrição enteral podem ser utilizados, mas todos consistem basicamente de um tubo fino, macio e flexível, chamado sonda, que pode ser passada, pelo nariz, até o estômago ou até o intestino delgado. Em alguns casos, é preferível utilizar uma gastrostomia, que consiste numa sonda colocada no estômago pelo cirurgião, através da parede abdominal, ou uma jejunostomia, colocada da mesma forma no intestino. Os alimentos são administrados diretamente no estômago ou no intestino por uma destas sondas.

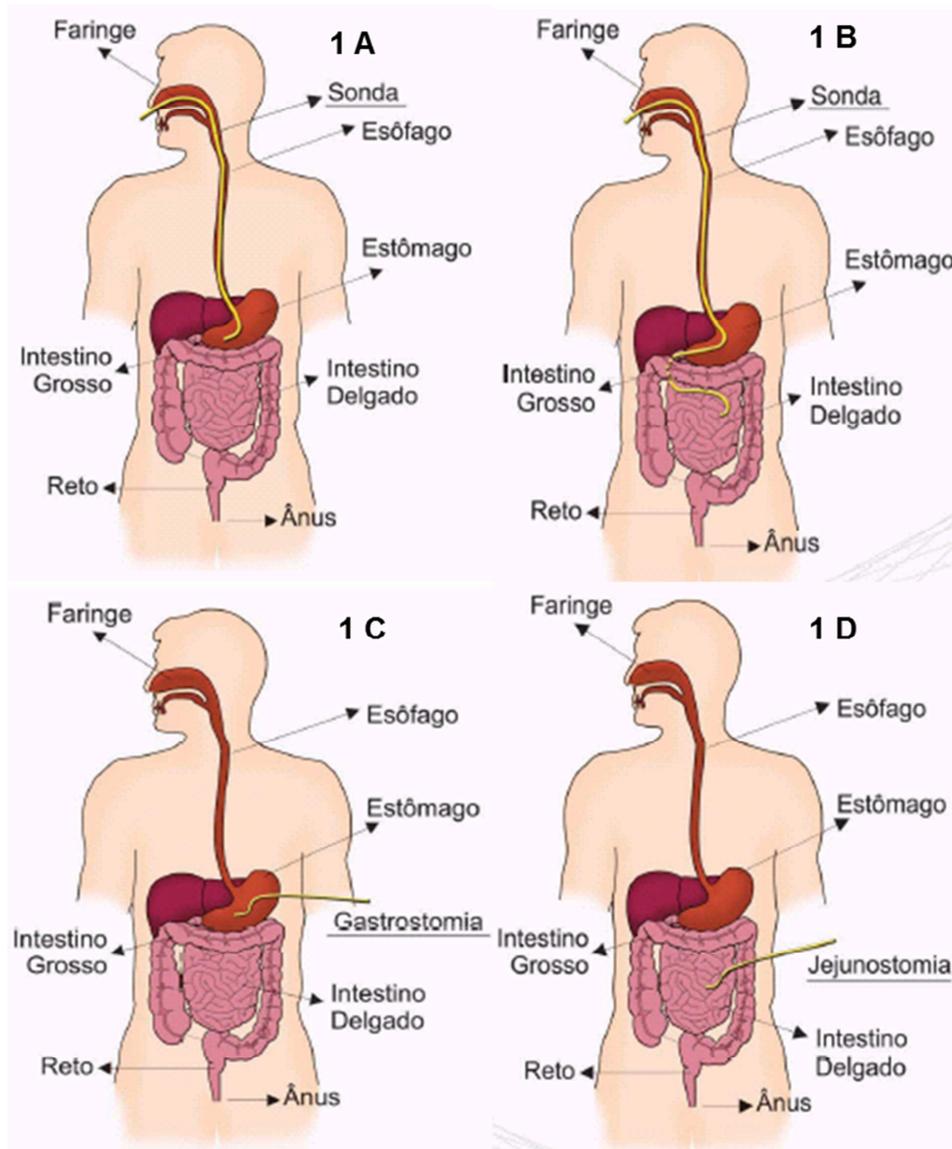


Figura 1: Métodos de fornecimento utilizados na terapia de nutrição enteral 1A: Via Nasogástrica, 1B: Via Nasoentérica, 1C: Gastrotomia e um 1D: Jejunostomia [10].

1.2 Necessidades diárias de nutrientes

Nesses últimos 30 anos, a ciência do suporte nutricional tem se desenvolvido e agora é amplamente aceita para o tratamento e prevenção da má nutrição e deficiência

nutricional [11,12]. Entretanto, deve ser lembrado que as necessidades variam de acordo com cada paciente individualmente.

Em geral as necessidades de nutrientes diárias para as células realizarem suas funções metabólicas são calculadas de acordo com a equação de Harris & Benedict, ou seja: $E = 66,47 + 13,75 \times P + 5,00 \times A - 6,76 \times I$ (homem).

$$E = 655,09 + 9,56 \times P + 1,85 \times A - 4,68 \times I \text{ (mulher)}$$

Onde: E = necessidades energéticas de base em kcal; P= peso em kg; A= altura em cm; I= idade em anos.

As necessidades diárias calculadas situam-se entre 20 e 30 kcal kg⁻¹dia⁻¹. No entanto, em situações de estresse metabólico, como por exemplo, na sepse, no pós-operatório ou no poli traumatismo, ocorre um importante incremento nessas necessidades energéticas de base. O cálculo calórico diário é, então, distribuído da seguinte maneira: em macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) e micronutrientes (oligoelementos e vitaminas), na seguinte proporção: proteínas: 0,8 - 1,0 g/kg de peso corpóreo, lipídeos: 1,0 – 1,5 g/kg de peso corpóreo, carboidratos: 4,0 – 5,0 g/kg de peso corpóreo e os restantes 50 a 60 % distribuídos entre os micronutrientes, incluindo vitaminas e elementos traços [2].

1.3 Importância dos elementos traços nas nutrições enterais

A maioria das fórmulas enterais contém eletrólitos, vitaminas e minerais para atingir a maioria das necessidades dos pacientes. As fórmulas em geral possuem 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) em 1200 a 2000 mL de formulação para consumo. O valor de IDR é estabelecido para atingir as necessidades diárias de indivíduos saudáveis e, portanto, isso pode ser inadequado para a população hospitalizada [13].

No termo *minerais* incluem-se os elementos metálicos que são considerados essenciais para o metabolismo humano normal: cobalto, cromo, cobre, iodo, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco. cromo, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco

são adicionados rotineiramente nas nutrições enterais e parenterais para evitar a sua deficiência [14,15].

A IDR dos elementos metálicos está mostrada na Tabela 1 [16].

Tabela 1: Ingestão diária recomendada (IDR) segundo a ANVISA [16].

	Valor							
	Adulto	Lactente		Crianças			Gestante	Lactante
		0-6 meses	7-11 meses	1-3 anos	4-6 Anos	7-10 anos		
Fe (mg)	14	0,27	9	6	6	9	27	15
Zn (mg)	7	2,8	4,1	4,1	5,1	5,6	11	9,5
I (µg)	130	90	135	75	110	110	200	200
Cu (µg)	900	200	220	340	440	440	1000	1300
Se (µg)	34	6	10	17	21	21	30	35
Mo (µg)	45	2	3	17	22	22	50	50
Cr (µg)	35	0,2	5,5	11	15	15	30	45
Mn (mg)	2,3	0,003	0,6	1,2	1,5	1,5	2,0	2,6

Nas nutrições enterais industrializadas, as espécies metálicas são adicionadas como seus respectivos sais ou como contra - íons de ânions orgânicos. A Tabela 2 exemplifica alguns tipos de compostos que podem ser utilizados como fonte dos elementos metálicos nas nutrições enterais.

Tabela 2: Formas em que os elementos essenciais são adicionados nas nutrições enterais (conforme descrito nas embalagens).

Elemento	Compostos
Na	Cloreto de sódio, caseinato de sódio, ascorbato de sódio, fosfato de sódio, citrato de sódio.
K	Fosfato de potássio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de potássio, citrato de potássio, cloreto de potássio.
Mg	Óxido de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio, hidróxido de magnésio.
Zn	Sulfato de zinco, cloreto de zinco.
Cu	Gluconato de cobre, sulfato de cobre.
Mn	Sulfato de manganês.
Ca	Panteonato de cálcio, caseinato de cálcio, fosfato tricálcico, hidróxido de cálcio, citrato de cálcio.
Se	Selenito de sódio, levedo de selênio, selenato de sódio.
Mo	Molibdato de sódio, levedo de molibdênio.
Cr	Cloreto de cromo, levedo de cromo.
Fe	Ferro reduzido, lactato ferroso, sulfato ferroso.

Muitos compostos inorgânicos, especialmente íons metálicos, podem desempenhar dupla função na fisiologia dos organismos: alguns são indispensáveis à vida, enquanto outros são tóxicos em elevadas concentrações, podendo afetar algumas atividades dos organismos levando à perda de funções, deformidade e, em alguns casos irreversíveis, à morte. Consequentemente, a toxicologia dos compostos

inorgânicos tem se tornado estudo de grande interesse e importância na química, medicina ocupacional e clínica [17].

Geralmente, o efeito tóxico provocado por alguns íons inorgânicos é devido a interação entre a forma livre do íon metálico e seu alvo (processos bioquímicos específicos, as membranas celulares e muitas organelas). Esses metais desalojam os elementos nutrientes, por possuírem metabolismos similares, interrompendo ou alterando muitos processos biológicos, provocando várias disfunções e doenças de difícil e demorado tratamento, os quais estão associados à administração de agentes quelantes como o EDTA, o dietilcarbamato e a penicilina [18].

A ANVISA, neste caso, estabelece valores máximos permitidos para alguns elementos metálicos - **Tabela 3** [19].

Tabela 3: Limites máximos de contaminantes nos alimentos segundo a ANVISA [19].

Elemento	Limite máximo (mg kg⁻¹)
Sb	2,0
As	1,0
Pb	0,8
Cd	1,0
Sn	250
Hg	0,01
Cu	30
Cr	0,1
Ni	5,0
Se	0,05
Zn	50

Observa-se nas **Tabelas 1 e 3** que alguns elementos (Zn, Se, Cr e Cu) são citados tanto como essenciais, tanto quanto tóxicos, isso dependendo da quantidade ingerida desses elementos e da sua forma química.

Serão discutidos a seguir alguns aspectos essenciais e toxicológicos de alguns elementos traços frente à saúde humana (Tabela 4) [20,21].

Tabela 4: Funções fisiológicas de certos elementos metálicos no organismo.

Elemento	Função Fisiológica	Efeitos Adversos
Cr	O cromo trivalente é um elemento traço essencial para aumentar a tolerância à glicose, mas o cromo hexavalente tem se mostrado carcinogênico.	Efeitos crônicos de exposição ao cromato estão relacionados ao aumento do câncer de pulmão, e a administração oral a diminuição do crescimento e danos ao fígado e rim.
Cu	É indispensável na absorção de ferro, na síntese da hemoglobina, na manutenção da saúde óssea e do sistema nervoso central. A carência do cobre pode favorecer a esclerose múltipla, causar redução da absorção de ferro, ocasionando o enfraquecimento ósseo e lesões cardíacas, anemias, infertilidade e defeitos na produção de melanina.	Um excesso do nível de cobre no organismo pode ser relacionado a casos de asma, hipertensão, depressão, esquizofrenia, convulsões, aumento no nível de colesterol e necrose do fígado.
Fe	A principal função do ferro no corpo humano envolve o transporte de oxigênio entre o sangue e o músculo. Sua ausência pode causar anemia.	A ingestão de ferro em excesso pode ser tóxica em condições raras. Isso ocorre geralmente pelos hábitos alimentares de certos indivíduos.
Zn	O zinco é um elemento constituinte da insulina, componente de 90 enzimas que são ativadas pelo metal, dentre elas a anidrase carbônica, a álcool desidrogenase e a	O excesso de zinco está associado a casos de úlcera, pancreatites, anemias, má circulação sanguínea e fibrose pulmonar.

	<p>carboxipeptidase, atuando significativamente em suas atividades catalíticas. Ajuda no metabolismo dos carboidratos e na síntese de proteínas. Sua carência provoca nanismo, anorexia, alopecia, dificuldades de cicatrização e provável prejuízo na resposta imunológica.</p>	
Se	<p>É necessário para o crescimento e fertilidade e para prevenção de várias doenças dependentes da vitamina E, como a distrofia muscular, diátese exsudativa, pancreatite fibrosa e desordem reprodutiva.</p>	<p>Em excesso o selênio causa a selenose, afeta a formação do esmalte dental e aumenta a incidência de cáries. Atualmente alguns estudos evidenciam o fator de proteção do selênio em casos de câncer, ao contrário do fator carcinogênico estudado anteriormente.</p>
Mn	<p>O Mn está distribuído amplamente em todos tecidos do corpo humano, sem uma concentração particular em um órgão, entretanto ele é mais concentrado nas mitocôndrias do que nas outras organelas das células. A deficiência de manganês se manifesta como impedimento de crescimento, anormalidades esqueléticas, distúrbios no sistema reprodutor e defeitos no metabolismo de lipídeos e proteínas.</p>	<p>O envenenamento crônico ocorre entre mineiros expostos a trabalho prolongado em minas de manganês e tem sintomas parecidos com o mal de Parkinson ou doença de Wilson.</p>
Co	<p>No homem o cobalto é requerido como um componente da vitamina B12, na qual sua deficiência pode causar a</p>	<p>Anemia causada pela diminuição da absorção do ferro.</p>

	anemia perniciosa.	
Mo	O nível de Mo no organismo está diretamente relacionado à ingestão de sulfato inorgânico. É cofator para enzimas envolvidas no catabolismo de sulfo-aminos ácidos, purinas e piridinas.	O excesso de Mo pode induzir uma deficiência de cobre.
Ni	O níquel parece estar envolvido nos processos bioquímicos das proteínas e ácidos nucléicos, bem como apresenta importantes funções no metabolismo e na estrutura das membranas. Catalisa grande número de sistemas enzimáticos, fosfatase, amilase pancreática e arginase, entre outras.	Inibe a ação da insulina, o contato do níquel com a pele pode acarretar reações alérgicas (asma, dermatites) e é um elemento cancerígeno.
Pb	Não existem evidências de essencialidade, apenas algumas sugestões que o chumbo possa ser um regulador homeostático.	Pode afetar três sistemas: neurológico, hematopoiético e renal, induzindo assim a anemia. A exposição prolongada causa insuficiência renal irreversível
Cd	Não existe evidência de essencialidade.	Seu potencial toxicológico é alto; pequenas quantidades podem provocar danos perigosos à saúde humana, podendo até ser cancerígeno, irritar os olhos e se inalado vir a ser fatal.

A importância dos elementos traços essenciais nas terapias nutricionais hoje em dia é amplamente reconhecida [22, 23, 24].

Outros contaminantes concomitantes com os elementos traços essenciais também podem ocorrer nas nutrições enterais e parenterais, porém os estudos quase

sempre mostram os resultados para as amostras parenterais, deixando em aberto um leque de possibilidades de contaminação nas nutrições enterais. Os trabalhos publicados na literatura indicam a presença de Pb [24,25], As [26], V [27], Ni, Cd [25] e Al [28] nas nutrições parenterais.

A presença das espécies metálicas nos alimentos não é garantia da sua utilização total pelo corpo humano. Altas absorções ocorrem entre indivíduos que são deficientes em minerais, enquanto que alguns compostos na dieta, por exemplo, o ácido oxálico ou oxalato, podem diminuir a disponibilidade pela ligação com o mineral [29,30]. Em contraponto, a ingestão em excesso de um mineral pode influenciar a absorção e o metabolismo de outros elementos. Por exemplo, uma grande ingestão de zinco diminui a absorção de ferro e cobre [31]. Por outro lado, a presença de algumas vitaminas aumenta a absorção de elementos nos alimentos, como por exemplo, a vitamina C aumenta a absorção de ferro e a vitamina D aumenta a absorção de cálcio, fósforo e magnésio [30]. As espécies metálicas provenientes de fontes animais são mais bem absorvidas que as de fontes provenientes de plantas. Isso porque os minerais presentes nas plantas são prontamente absorvidos e ligados a inibidores de absorção, tais como o fitato. Os vegetarianos do tipo *Vegan* (que são restritos a alimentos provenientes de plantas) podem ser afetados por esse problema [30].

Para avaliar a fração absorvida dos nutrientes pelo organismo existem estudos que simulam todo o processo de digestão e absorção das espécies. Esses estudos são chamados de estudos de biodisponibilidade.

1.4 A determinação de elementos traços em amostras de nutrição enteral

Os principais motivos que levam ao estudo dos elementos traços nas nutrições se devem ao fato de que geralmente esses alimentos são altamente concentrados em nutrientes e, portanto, a presença de contaminantes no produto final pode ser maior do que em outros tipos de alimentação. Outro fator importante é que esses alimentos são

utilizados em grandes volumes nos pacientes, introduzindo-se assim, proporcionalmente, uma grande quantidade de elementos, benéficos ou não, que se não forem controlados de forma rigorosa passam a ser tóxicos. As nutrições enterais são geralmente enriquecidas de forma artificial com elementos traços – micronutrientes. A faixa de concentração para os elementos traços nas nutrições enterais e parenterais varia na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ à mg L^{-1} , dependendo do elemento de interesse e da indicação do tipo de nutrição.

Trabalhos publicados na literatura utilizam diferentes técnicas para determinação dos elementos traços nesses tipos de matrizes: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [25], espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS), [26], espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) [27, 28], sendo quase sempre necessária uma etapa de concentração e preparo das amostras, dependendo-se grande tempo de trabalho. Em vista disso a utilização de técnicas analíticas apropriadas se torna indispensável na determinação de elementos traços em amostras de nutrição enteral e parenteral. Entre as técnicas analíticas disponíveis, duas são utilizadas no presente estudo. Uma pequena descrição das técnicas e suas vantagens são feitas a seguir.

1.5 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

A técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) foi proposta por L'vov [32], que introduziu um forno de grafite para gerar átomos livres em AAS, como uma alternativa para a chama. A idéia inicial era usar uma pequena quantidade de amostra e atomizá-la completamente num forno montado no caminho óptico de um espectrômetro. O sinal de absorção integrado deveria ser proporcional à concentração do analito na amostra. A ETAAS é adequada para a determinação de baixas concentrações de metais e semi-metais apresentando alta detectabilidade, uma vez que toda a amostra colocada no forno é atomizada e o tempo de residência médio dos átomos no caminho óptico é de 1 s ou mais. Além disso, esta técnica é seletiva, requer pequenos volumes de amostra (geralmente, 10 - 100 μL) e

possui limites de detecção, para a maioria dos elementos, no intervalo de concentração entre ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

A atomização ocorre no interior do tubo, que é aquecido pela passagem de uma corrente elétrica, em estágios distintos de temperatura: secagem, que consiste na evaporação do solvente e é feita a cerca de 100-120 °C, durante 10-20 segundos; a temperatura é então elevada para cerca de 600 °C, durante 20 segundos, para a eliminação dos componentes orgânicos da matriz (pirólise) e, em seguida, a 2000-3000 °C, para a atomização do elemento de interesse [33]. A grande detectabilidade dos atomizadores eletrotérmicos em AAS resulta de sua facilidade em reter uma porção substancial da espécie de interesse atomizada na zona de observação, por um período finito de tempo. Entretanto, desde sua introdução, o tubo de grafite de Massmann, largamente usado em instrumentos comerciais, mostra-se sensível a interferências de matriz, as quais podem causar severas reduções ou aumentos no sinal analítico [34]. Os métodos usados para reduzir as interferências de matriz, além da otimização dos parâmetros do forno, incluem o tratamento químico do tubo de grafite [35] e a utilização de condições denominadas STPF (stabilized temperature platform furnace) [36].

Buscando solucionar este problema, Ediger, em 1975, propôs o uso de substâncias para alterar as propriedades de secagem, pirólise e atomização da amostra. Estas substâncias, ele denominou de *modificadores de matriz* (atualmente *modificadores químicos*), cuja finalidade é volatilizar o interferente ou, então, tornar o analito menos volátil, possibilitando a separação térmica mais eficiente dos concomitantes da matriz da amostra, antes da etapa de atomização [37]. A modificação efetiva do analito ou da matriz reduz de forma significativa o número de interferências espectrais, devido à absorção da fonte de radiação por elementos com linhas atômicas concomitantes e espalhamento da radiação por partículas não volatilizadas da matriz.

Os principais requisitos para que uma substância atue como modificadores químicos são [38]: a) deve estabilizar o analito de maneira a alcançar a maior temperatura de pirólise possível, para permitir a volatilização da maior parte dos contaminantes; b) deve ser aplicável a vários elementos, se possível; c) deve ser puro e não conter o analito em concentrações mensuráveis; d) não deve reduzir

acentuadamente o tempo de uso do tubo de grafite; e) não deve produzir radiação de fundo excessiva no comprimento de onda do analito.

O modificador pode ser adicionado a uma alíquota do analito após a deposição no tubo ou na plataforma de grafite, antes do início do ciclo de aquecimento, ou pode ser adicionado num tempo conveniente, durante o ciclo de análise. Pode também ser pré-misturado com soluções de amostras ou padrões antes da introdução no tubo de grafite. Alguns autores, entretanto, consideravam que o emprego do modificador químico diminuía a vida útil do forno de grafite [39]. Desta forma, novos procedimentos foram propostos baseados na modificação da superfície do forno/plataforma de grafite, visando aumentar o tempo de vida útil dos mesmos.

O termo *modificação permanente* foi introduzido em 1992, num trabalho no qual Pd e Ir foram depositados sobre uma plataforma de L'vov e utilizados para reter hidretos de As, Bi e Se, sendo a modificação resistente por até 300 ciclos de atomização [40].

A deposição dos modificadores permanentes é realizada, geralmente, através de tratamento térmico ou por eletrodeposição. No tratamento térmico, uma solução aquosa do modificador é introduzida no tubo de grafite e submetida a um programa de aquecimento, que promove a redução do modificador à forma metálica. Na deposição por eletrodeposição o modificador é reduzido eletricamente sobre a superfície do forno ou da plataforma. Além de proporcionar limites de detecção mais baixos, esta forma de modificação permite a utilização de temperaturas de pirólise mais altas [41].

Atualmente, o uso de modificação química, permanente ou não, é um procedimento normal nas determinações das diferentes espécies químicas, em função das inúmeras vantagens que apresenta. Na Tabela 5 estão descritos alguns modificadores químicos utilizados em GF AAS.

Tabela 5: Alguns exemplos de modificadores químicos utilizados em GF AAS.

Elemento	Modificador estudado	Elemento	Modificador estudado
Se	Pd, Pt e Rh (42) Pd+Mg, Pt+Mg, Pt+Ni, Pt + Cu (43)	Pb	Pd e Pt (44) Rh, Pd e Ru (45)
Cd	Rh, Pd, Ru (45) Pd, Pt (46) Ir, Rh, Ir+Rh (47)	Zn	Rh, Pd e Ru (45)
Cr	Pd, Pt, Rh e Ru (48) Ir, W, Zr (49)	Mo	Pt, Rh, Ru e Ir (50) Pt+ Ac. Ascórbico (50)
Cu	Pd, Ru, e Rh [45] Ru, Pd+Mg [51]	Mn	Pd, Rh, Ru (45)

1.6 Espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado – ICP OES

Historicamente, a espectrometria de emissão atômica baseou-se na atomização e excitação por chama, arco elétrico e centelha elétrica, e todos esses métodos continuam tendo aplicações importantes na análise de elementos metálicos. Atualmente, entretanto, fontes de plasma tem se tornado o método mais importante e largamente utilizado para a espectrometria de emissão atômica [52].

Na espectrometria de emissão óptica (OES), a amostra é submetida a temperaturas altas o suficiente para causar não apenas a dissociação em átomos, mas também significativa quantidade de excitação colisional (e ionização) dos átomos da amostra. Uma vez que os átomos ou íons estão no seu estado excitado, eles podem decair para estados mais baixos de energia através de transições térmicas ou radiativas. A intensidade da luz emitida em comprimentos de ondas específicos é usada para determinar a concentração dos elementos de interesse. Devido à alta temperatura, os átomos e íons excitados podem emitir sua radiação característica

quase ao mesmo tempo. Isso resulta em vários comprimentos de onda para cada elemento e a capacidade de medir a emissão para vários elementos ao mesmo tempo [53].

A fonte de excitação, o plasma, é uma mistura gasosa condutora de eletricidade, que contém uma concentração significativa de cátions e elétrons, na qual a carga total se aproxima de zero. Em um plasma de argônio as duas principais espécies são os íons argônio e os elétrons. Os íons argônio, uma vez formados em um plasma, são capazes de absorver energia necessária para manter a temperatura suficientemente alta, na qual ionizações posteriores sustentem o plasma com o auxílio do acoplamento indutivo de uma radio frequência [52].

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio com acoplamento indutivo é constituído de 3 partes principais:

- Gerador de radiofrequência – plasma: transferência de energia para atomização, ionização e excitação;
- Sistema de introdução de amostras: produção e transporte de aerossol (solução ou sólido) ou vapor;
- Sistema óptico de detecção: transferência de radiação, resolução espectral e conversão de sinal radiante em sinal elétrico.

O gerador de radiofrequência (RF) no ICP são osciladores que proporcionam corrente alternadas a frequências de 27,12 MHz ou 40,68 MHz, dependendo do fabricante, e potência nominal de 2 kW. Esse dispositivo elétrico é a fonte de potência e tem a função de sustentar o plasma [54].

Os sistemas de nebulização são compostos por um nebulizador e uma câmara de nebulização. Os nebulizadores são dispositivos que convertem um líquido em aerossol para ser transportado ao plasma. A câmara de nebulização tem a finalidade de deixar que apenas as gotas muito pequenas, formadas no aerossol, cheguem ao plasma [53].

A tocha consiste de três tubos concêntricos de quartzo, através dos quais passam os fluxos de gás argônio principal, auxiliar e nebulizador. A tocha é dividida em um tubo externo mais grosso, que fica mais próximo à bobina de indução, e um tubo interno por onde a amostra é introduzida no plasma através do tubo injetor. Entre o tubo externo e o interno existe um fluxo auxiliar de argônio (Figura 2).

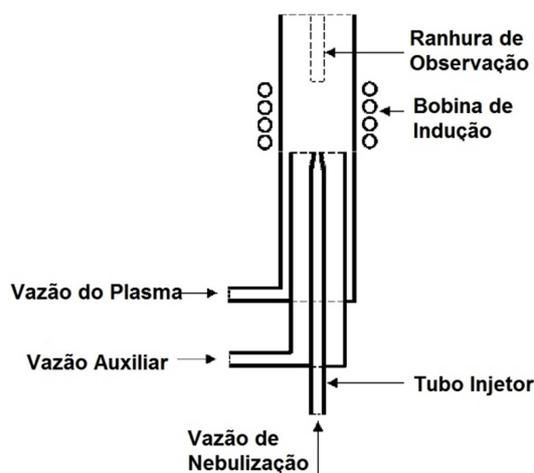


Figura 2: Corte transversal de uma tocha de um ICP OES [53].

A detecção da radiação de emissão do plasma obtida da região analítica pode ser observada na lateral do plasma, em uma configuração chamada radial, ou então observada horizontalmente (ou no final da tocha), chamada de visão axial. Os equipamentos atuais podem incluir as visões axial e radial e são chamados de *dual view*.

Os espectrômetros sequenciais normalmente estão programados para se moverem de uma linha de um elemento para a linha de um segundo elemento, pausando tempo suficiente (uns poucos segundos) em cada uma até obter uma relação sinal ruído satisfatória. Em contraste, os instrumentos multicanal estão projetados para medir as intensidades das linhas de emissão para um grande número de elementos (algo em torno de 50 a 60) simultaneamente, ou quase isso. Tanto os espectrômetros de emissão multicanal como o sequencial são dois tipos gerais, um empregando um monocromador clássico de rede, e outro usando um monocromador tipo *echelle*.

2. Objetivos

- Desenvolver um método de análise para a determinação de espécies metálicas nas nutrições enterais industrializadas, valendo-se das técnicas disponíveis: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS);
- Estudar as concentrações dos elementos essenciais adicionados nas nutrições enterais e a possibilidade de contaminação por determinadas espécies metálicas;
- Avaliar a possibilidade da introdução direta da amostra utilizando um reagente alcalino;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de nutrições enterais industrializadas, comparando os valores declarados nas embalagens com os valores encontrados;
- Avaliar a influencia da embalagem na concentração final de alumínio nas amostras;
- Usar um método de digestão *in vitro* para avaliar a bioacessibilidade das espécies de interesse nas nutrições enterais.

3. Parte Experimental

3.1 Vidrarias, Reagentes e Amostras

Os materiais (balões volumétricos, béqueres, pipetas, frascos de plástico, etc.) foram limpos antes de sua utilização, deixados em banho de HNO_3 10 % (v/v) por 24 h, no mínimo, e, em seguida, enxaguados com água desionizada pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA), apresentando condutividade de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm.

Soluções-estoque na concentração de 1000 mg L^{-1} em HNO_3 2 % v/v de K (preparada a partir de KCl 99,97 % - Nuclear), Ca, Ni e Co (preparadas a partir de solução padrão Titrisol – Merck), Mg (preparada a partir de MgO 99,6 % - Baker), Mn (preparada a partir de Mn metálico 99,9 % - Riedel De Haën), Fe (preparada a partir de Fe metálico 99,5 % - ACS), Zn (preparada a partir de Zn metálico 99,8 % - Baker), Cu (preparada a partir de Cu metálico 99,96 % - Baker), Cd (solução padrão - Assurance), Pb (preparada a partir de Pb metálico 99,5 % - Baker), Se (preparada a partir de SeO_2 99,59 % - Riedel De Haën), Na (solução padrão – Carlo Erba), Mo (solução padrão Carlo Erba), Cr (preparada a partir de Cr metálico 99,9 % - Baker), As (preparado a partir do sal As_2O_3 - Baker), Ba, V e Al (solução padrão – SPEX) foram empregadas no preparo de padrões multielementares.

Y 1000 mg L^{-1} (solução padrão – SPEX) foi empregado como padrão interno para as medidas por ICP OES.

HNO_3 destilado (65% v/v - Merck) e H_2O_2 (30% v/v - Carlo Erba) foram utilizados na mineralização das amostras no forno de micro-ondas fechado.

Os modificadores químicos utilizados foram preparados a partir dos sais de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Acros), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck) e $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck).

Uma solução de aminas terciárias - CFA-C (Spectrasol, Warwick, NY, EUA), ajustada em pH 8 com NaOH 1 mol L^{-1} , foi utilizada para a introdução direta das amostras de nutrição enteral no GF AAS.

As soluções estoques para o processo de digestão enzimática foram preparadas a partir da dissolução de 975 mg de pepsina (Acros) em 25 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ e a solução de pancreatina/bile foi preparada pela dissolução de 215 mg de pancreatina (Acros) e 333 mg de bile (Acros) em 50 mL de NaHCO₃ 0,1 molL⁻¹ (Merck).

As amostras foram adquiridas na cidade de Campinas, em loja especializada na venda de produtos alimentícios para nutrições especiais, e foram classificadas em grupos de acordo com a marca. As amostras, depois de abertas, foram armazenadas em frascos plásticos polipropileno (Nalgon), descontaminados previamente, sob congelamento em freezer. Na Tabela 6 podem ser visualizadas as formas de apresentação, indicação e tipos de embalagens das nutrições enterais estudadas.

Tabela 6: Apresentação, indicação e embalagens das amostras estudadas.

Amostra	Apresentação	Indicação	Embalagem
NOV1	Líquida	Geral	Tetrapack [®]
NOV2	Líquida	Geral	Tetrapack [®]
NOV3	Líquida	Diabetes e situações de hiperglicemia	Tetrapack [®]
NOV4	Líquida	Situações gastro-intestinais	Tetrapack [®]
NOV5	Líquida	Adição de fibras	Plástico
NOV6	Líquida	Geral	Tetrapack [®]
SUP1	Líquida	Diabetes e situações de hiperglicemia	Tetrapack [®]
SUP2	Líquida	Geral	Tetrapack [®]
SUP3	Líquida	Adição de fibras	Vidro
SUP4	Líquida	Crianças de 1 a 6 anos	Vidro
NUT1	Líquida	Geral	Tetrapack [®]
NUT2	Líquida	Adição de fibras	Tetrapack [®]
NUT3	Líquida	Pacientes com função renal	Tetrapack [®]

		comprometida	
ABB1	Líquida	Fibras e FOS	Lata de Al
ABB2	Líquida	Pacientes com comprometimentos renais que não fazem diálise	Lata de Al
ABB3	Líquida	Nutrição para paciente renal em diálise	Lata de Al
ABB4	Líquida	Paciente com diabetes tipo 1 e 2	Lata de Al
ABB5	Líquida	Fibras e FOS	Plástico
NES1	Líquida	Geral	Lata de Al
NES2	Líquida	Crianças de 1 a 6 anos	Lata de Al
NES3	Líquida	Geral	Lata de Al
NES4	Líquida	Fibras e FOS	Lata de Al

3.2 Instrumentação

Para as determinações das espécies metálicas utilizaram-se dois equipamentos:

- a) Espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (Perkin-Elmer, modelo Optima 3000 DV), utilizado para a determinação das espécies: Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, V e Zn. O equipamento possui configuração para leitura radial e axial, é equipado com uma fonte de rádio-freqüência (RF) de 40 MHz, um detector multielementar simultâneo de estado sólido do tipo SCD (segmented array charge-coupled detector), uma bomba peristáltica, câmara de nebulização duplo-passo do tipo "Scott" e um nebulizador de fluxo cruzado (*cross-flow*).
- b) Um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS, Perkin Elmer AAnalyst 600), foi utilizado para determinação de Al, Pb e Cd. O GF AAS é equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman e

possui aquecimento transversal (THGA). Os fornos de grafite usados possuíam plataforma integrada. A fonte de radiação para o elemento Al foi uma lâmpada de cátodo oco (Perkin Elmer) e para os elementos Pb e Cd foram utilizadas lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL). O tempo de aquecimento da lâmpada para atingir a energia necessária foi de 30 minutos.

As condições experimentais utilizadas nos equipamentos estão descritas nas **Tabelas 7,8 e 9.**

Tabela 7: Condições experimentais utilizadas no ICP OES para os estudos preliminares.

Potência de RF (W)	1300
Vazão de nebulização (L min⁻¹)	0,8
Vazão do argônio auxiliar (L min⁻¹)	0,5
Vazão do argônio principal (L min⁻¹)	15
Vazão de bombeamento (mL min⁻¹)	1,5
Correção de fundo	2 pontos
Tempo de integração (s) e de leitura (s)	1-5; 30
Número de replicatas	3
Elementos (λ /nm) – Leitura na posição axial	Na (I 588,99); K (I 766,49); Mg (I 279,07); Ca (II 317,93); Fe (II 238,20); (Cu I 324,75); Mn (II 257,61); Zn (I 213,86); Co (II 228,61); Ni (I 232,00); Pb (II 220,35); Se (I 196,02); As (I 188,97); Cd (II 214,44); Mo (I 220,03); Cr (II 205,56) e Al (I 308,21).

(I):Linha de emissão atômica; (II): Linha de emissão iônica

Tabela 8: Condições experimentais utilizadas na otimização e determinação das espécies metálicas no ICP OES.

Potência de RF (W)	1000 -1500 (1400: valor otimizado)
Fluxo de nebulização (L min⁻¹)	0,3 – 0,8 (0,6: valor otimizado)
Fluxo do argônio auxiliar (L min⁻¹)	0,3 – 1,0 (0,6: valor otimizado)
Fluxo do argônio principal (L min⁻¹)	15
Vazão de bombeamento (mL min⁻¹)	1,0
Correção de fundo	2 pontos
Tempo de integração (s) e de leitura (s)	1-5; 30
Número de replicatas	3
Padrão Interno (λ /nm)	Y (I 371,029)
Elementos (λ /nm) – Leitura na posição axial.	Al (II 167,022); Al (I 308,215); Al (I 309,271); As (I 188,979); As (I 193,696); Ba (II 233,527); Ca (II 317,933 ^a); Ca (II 396,847 ^a); Cd (II 214,440); Cd (I 228,802); Co (II 228,616); Co (II 238,892); Cr (II 205,560); Cr (II 206,158); Cr (I 357,869); Cu (II 224,700); Cu (I 324,752); Fe (II 238,204); Fe (II 239,562); Hg (II 194,168); Hg (I 253,652); K (I 404,721 ^a); K (I 766,490 ^a); Mg (I 279,077 ^a); Mg (I 280,271 ^a); Mg (I 285,213 ^a); Mn (II 257,610); Mn (II 260,568); Mn (I 279,482); Mo (I 202,031); Mo (I 203,845); Na (I 330,237 ^a); Na (I 588,995 ^a); Ni (II 231,604); Ni (I 232,003); Pb (I 217,000); Pb (II 220,353); Sb (I 206,836); Sb (I 217,582); Se (I 196,026); Se (I 203,985); V (II 292,402); V (II 309,310); Zn (II 202,548) e Zn (I 213,857).

(I): Linha de emissão atômica; (II) =: Linha de emissão iônica: (^a) Elementos lidos também na posição radial.

Tabela 9: Condições instrumentais utilizadas no GF AAS.

Parâmetro	Al ^a	Cd ^b	Pb ^b
Comprimento de onda (nm)	309,271	228,802	283,306
Corrente da lâmpada (mA)	25	210	430
Abertura da fenda (nm)	0,2	0,7	0,7
Volume de amostra (µL)	20	20	20
Volume de modificador (µL)	5	5	5

^a Lâmpada de Cátodo Oco, ^b Lâmpada de EDL

3.3 Tratamento da amostra

Cerca de 1,0000 g das amostras de nutrição enteral líquidas foi pesada diretamente no frasco de teflon de 100 mL de alta pressão juntamente com 2 mL de HNO₃ (conc.) destilado e 1 mL de H₂O₂ (30% v/v) e 5 mL de água deionizada . As amostras foram submetidas ao programa de aquecimento (Tabela 10) no micro-ondas Milestone (modelo Ethos). As soluções resultantes nos frascos de alta pressão foram avolumadas com água desionizada para 25 mL.

Tabela 10: Programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas fechado de alta pressão.

Etapa	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	6	até 80
2	2	80
3	3	até 120
4	2	120
5	10	até 180
6	10	180

3.4 Procedimento para ensaio *in vitro* da bioacessibilidade das espécies estudadas

O ensaio de bioacessibilidade das espécies estudadas foi realizado seguindo o método descrito por Corneau *et al.* [55]. Nesse procedimento 10 g de cada amostra foram tratados com HCl 1,5 mol L⁻¹ até pH 1,9 e então 2 mL de solução de pepsina foram adicionadas. As amostras foram incubadas a 37 °C em um banho de aquecimento, com agitação Dubnoff (Quimis). Após 30 minutos, o pH da amostra foi medido e reajustado para 1,9 com HCl 0,2 mol L⁻¹. As amostras foram incubadas novamente por um período adicional de 90 minutos. As amostras tiveram, então, seu pH aumentado para 5,0 e, após 1 hora, para 6,8 com NaHCO₃ 1 mol L⁻¹. Foram adicionados 3 mL da solução estoque de pancreatina-bile e as amostras em seguida foram incubadas por 2 horas.

Após a digestão, uma alíquota da amostra foi retirada e centrifugada por 30 minutos a 3500 rpm em uma centrifuga microprocessada (Quimis). O sobrenadante foi separado, transferido para outro frasco e mantido em geladeira até sua leitura.

3.5 Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES

A otimização dos parâmetros potência do plasma, vazão de nebulização da amostra e vazão do gás auxiliar foi feita observando-se a robustez do plasma, isto é, a razão das intensidades de emissão para as linhas iônica (280,270 nm) e atômica (285,213 nm) do Mg [56]. Para este estudo, duas amostras de nutrição enteral líquidas de marcas diferentes, nomeadas como A e B, foram submetidas ao tratamento por micro-ondas e a diferentes condições de potência (de 1,0 a 1,5 kW), vazão de nebulização (de 0,4 a 1,0 L min⁻¹) e vazão do gás auxiliar (de 0,3 a 1,0 L min⁻¹), de forma univariada. Os resultados foram avaliados comparando-se a robustez obtida nas diversas condições estudadas. Com a condição robusta definida, a escolha do comprimento de onda para cada espécie foi feita a partir de um estudo de adição e

recuperação e pela razão sinal/fundo (SBR) para os elementos em estudo. O SBR foi calculado dividindo-se a intensidade de emissão da espécie estudada na amostra, pelo sinal do branco analítico.

3.6 Otimização das temperaturas de pirólise e de atomização do GF AAS

A otimização das temperaturas de pirólise e de atomização do Cd, Pb e Al nas amostras submetidas à mineralização em forno de micro-ondas fechado e nas amostras diluídas em CFA-C foram feitas com as amostras enriquecidas com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb. Para a otimização do Al não foi necessária a adição do analito, pois o sinal analítico da amostra já era suficiente para a otimização. As temperaturas foram variadas como descrito na Tabela 11, mantendo as outras condições recomendadas pelo fabricante.

Tabela 11: Temperaturas e modificadores químicos utilizados para otimização das condições para determinação de Cd, Pb e Al por GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)		
	Cd	Pb	Al
Pirólise	300 - 1000	250 -1500	250 -1500
Atomização	1000 - 2000	1500 - 2000	1500 – 2000
Modificador químico	5 μg Pd + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	50 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	15 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

4. Resultados e Discussão

4.1 Uso do ICP OES para determinação dos elementos metálicos de interesse nas amostras de nutrição enteral

4.1.1 Estudos preliminares

Usando as condições default do ICP OES (Tabela 7), algumas medidas foram feitas em duas amostras diferentes, mineralizadas segundo procedimento descrito em 3.3. Este estudo foi feito para verificar se seria necessário otimizar as condições operacionais do ICP OES para um melhor desempenho analítico.

Os resultados obtidos (Tabela 12) mostraram que para alguns elementos as concentrações determinadas por ICP OES estão próximas aos valores declarados na embalagem das amostras. Alguns dos valores declarados não puderem ser determinados, uma vez que estão abaixo do limite de detecção (LOD) para o ICP OES, nas condições estudadas. Entretanto, para outros elementos, mesmo estando acima do LOD as concentrações encontradas não concordam com os valores declarados no rótulo das embalagens.

As recuperações obtidas para os elementos também foram consideradas inadequadas, pois, para a maioria dos elementos encontrava-se fora da faixa considerada quantitativa, isto é, entre 90 e 110% [57].

Tabela 12: Concentrações encontradas nas amostras (Am.), concentrações declaradas (Conc decl.), média das recuperações (Rec) e LOD.

	Am. A (mg L ⁻¹)	Conc decl. A (mg L ⁻¹)	Am. B (mg L ⁻¹)	Conc decl. B (mg L ⁻¹)	Am. C (mg L ⁻¹)	Conc decl. C (mg L ⁻¹)	Rec. (%)	LOD (mg L ⁻¹)
Na	2,19	2,64	4,88	3,73	6,53	4,11	115	0,11
Ca	3,96	3,84	5,96	6,48	3,81	3,63	106	0,38
Fe	0,14	0,0864	0,12	0,088	0,078	0,053	155	0,011
Cu	0,012	0,010	0,069	0,010	0,066	0,005	111	0,005
Mn	0,015	0,013	0,024	0,025	0,013	0,010	84	0,0002
Zn	0,120	0,117	0,121	0,112	0,078	0,053	117	0,045
Co	< LOD	n/d	< LOD	n/d	< LOD	n/d	102	0,0008
Ni	< LOD	n/d	< LOD	n/d	< LOD	n/d	115	0,0008
Mg	1,47	1,44	1,14	0,98	0,96	1,05	233	0,02
Cd	< LOD	n/d	0,012	n/d	0,013	n/d	106	0,0002
Cr	< LOD	0,0002	< LOD	n/d	< LOD	0,0002	107	0,0047
Se	0,0120	0,0002	< LOD	n/d	< LOD	0,0002	120	0,0071
As	< LOD	n/d	< LOD	n/d	< LOD	n/d	131	0,0010
K	8,14	7,20	5,06	5,13	6,44	6,53	109	0,29

LOD: 3 x SD para 10 leituras do branco da curva; n/d: concentrações não declaradas

As recuperações não quantitativas observadas nesse experimento podem ser devidas às seguintes características: efeito de matriz: do ácido ou sólidos totais dissolvidos, configuração da tocha, elementos facilmente ionizáveis (Na, K, Ca e Li) e comprimento de onda inadequado.

Com esse estudo preliminar foi possível concluir que as condições experimentais do ICP OES devem ser otimizadas para que sejam obtidos resultados mais exatos e menor limite de detecção do método para que os micro-constituintes possam ser determinados.

4.1.2 Otimização de parâmetros instrumentais do ICP OES

O desempenho analítico de um espectrômetro de emissão óptica pode ser avaliado através da robustez do plasma. O termo robustez representa quão eficiente é a transferência de energia e a resposta do plasma para as mudanças nas condições de atomização e excitação devido à composição química da amostra aspirada. Nas condições robustas as interferências causadas pelo efeito da matriz, pelos elementos facilmente ionizáveis (EIEs) – Na, K e Ca e pela matéria orgânica são minimizados. A robustez é dada pela razão de emissão das linhas iônica (280,270 nm) e atômica (285,213 nm) do Mg, sendo robusta a condição que apresenta uma razão Mg II/Mg I maior do que 10 [56,58].

Inicialmente, para a otimização da **vazão de nebulização da amostra**, fixou-se a potência do plasma em 1300 W variando-se a vazão de nebulização de argônio entre 0,4 e 0,8 L min⁻¹. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.

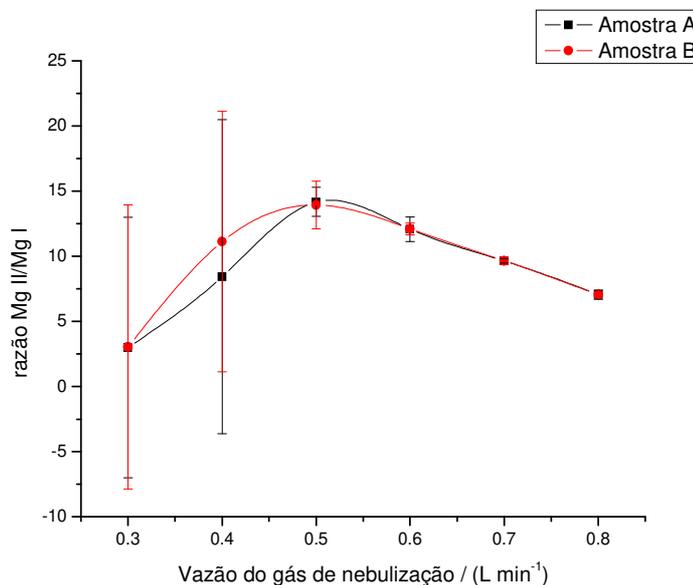


Figura 3: Razões Mg II/MgI obtidas para as amostras “A” e “B” no estudo da vazão de nebulização da amostra.

As duas curvas de vazão de nebulização para a razão Mg II/Mg I mostraram o mesmo perfil. As condições consideradas robustas se apresentam na faixa de 0,5 a 0,6 L min⁻¹. Apesar de a razão ser maior na vazão de 0,5 L min⁻¹, o RSD nessas medidas é maior do que na vazão de 0,6 L min⁻¹. Portanto, esta vazão foi estabelecida como a mais adequada.

Com a vazão de nebulização da amostra otimizada em 0,6 L min⁻¹, a **potência do plasma** foi avaliada no intervalo entre 1000 e 1500 W.

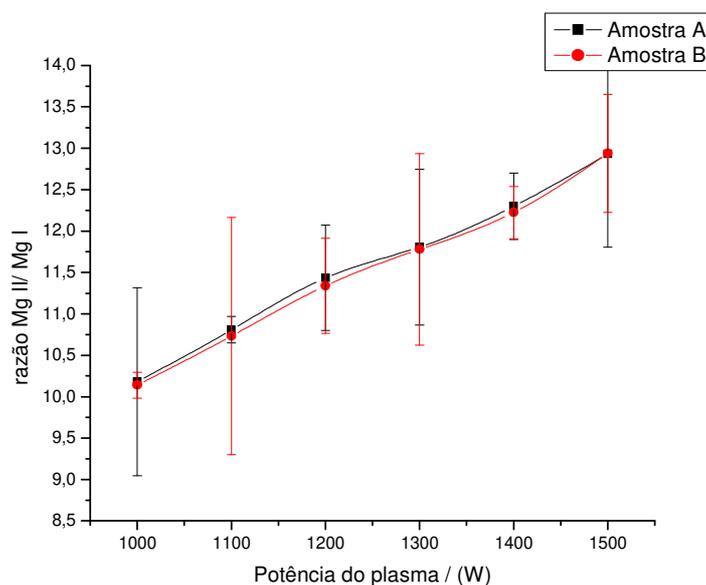


Figura 4: Razões Mg II/MgI obtidas para as amostras “A” e “B” no estudo da potência do plasma.

As curvas apresentadas na Figura 4 mostram que as razões Mg II/Mg I foram maiores que 10 para todas as potências avaliadas, ou seja, para qualquer uma dessas potências as condições do plasma são robustas e o seu aumento é diretamente proporcional ao aumento da robustez no equipamento. Entretanto, a maior robustez foi obtida nas potências de 1400 e 1500 W, sendo que na potência de 1400 W os RSD obtidos são menores para as duas amostras. Além disso, a potência de 1500 W é a potência limite do equipamento, o que sugere que a potência de 1400 W é a mais adequada.

Assim, empregando-se vazão de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$ e potência do plasma de 1400 W , avaliou-se a **vazão do gás auxiliar**. Os resultados obtidos constam na Figura 5.

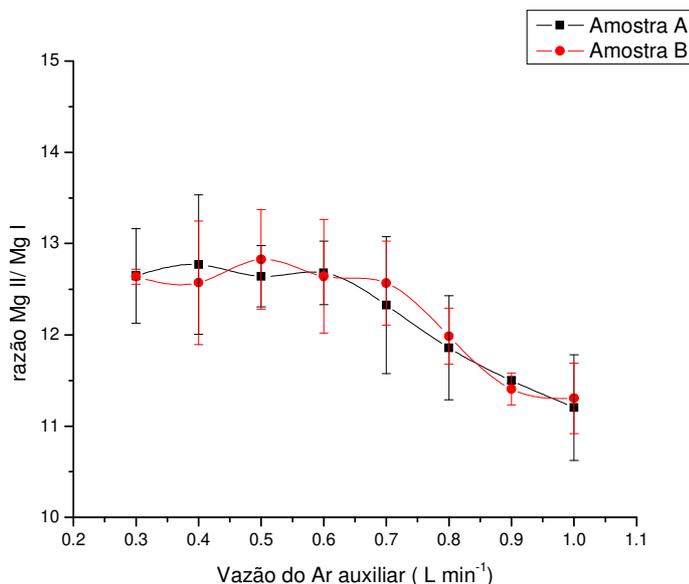


Figura 5: Razões Mg II/Mg I obtidas para as amostras "A" e "B" no estudo da vazão do gás auxiliar.

As curvas obtidas mostram que a robustez é maior que 10 para todas as condições estudadas, porém vazões superiores a $0,6 \text{ L min}^{-1}$ levam a uma diminuição na razão Mg II/Mg I. Na faixa de $0,3$ a $0,6 \text{ L min}^{-1}$ os valores são praticamente constantes e os valores de RSD são próximos, porém observa-se que na vazão de $0,6 \text{ L min}^{-1}$ as razões das duas amostras são muito próximas. Portanto, a vazão de $0,6 \text{ L min}^{-1}$ foi considerada a vazão ótima e foi usada nos experimentos posteriores.

4.1.3 Avaliação do uso de padrão interno

A avaliação da necessidade do uso de padrão interno foi feita com um experimento de adição e recuperação dos analitos de interesse, com concentrações

suficientes para uma avaliação crítica desse parâmetro. Os analitos foram adicionados a partir das soluções padrão de cada elemento e as concentrações finais esperadas estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13: **Concentrações finais adicionadas de analitos em mg L⁻¹.**

Elementos	Adição 1 (mg L⁻¹)	Adição 2 (mg L⁻¹)
Na	30	60
Ca	26	52
K	35	70
Mg	7,5	15
Zn	0,5	1
Fe	0,45	0,9
Cu, Mn, Co, Ni, Mo, Cd, Cr, Ba, V, Se, As, Sb, Hg, Al e Pb	0,1	0,2

A escolha do ítrio como padrão interno deve-se ao fato de ser um elemento inexistente na matriz, além de ser eficiente na correção de interferências provocadas por elementos facilmente ionizáveis, como Na, K e Ca e, também, por corrigir variações no processo de nebulização [52, 59].

Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14: Valores de recuperação, RSD e SBR para as amostras estudadas.

	Amostras sem padrão interno			Amostras enriquecidas com padrão interno Y (1 mg L ⁻¹)		
	Rec. (%)	RSD (%)	SBR	Rec. (%)	RSD (%)	SBR
Na (588,99)	93	0,3	22	94	1,0	20
Ca (317,93)	94	0,6	326	95	0,0	307
K (766,49)	93	0,9	150	94	0,3	141
Mg (279,07)	93	0,7	630	94	0,6	594
Zn (213,86)	93	0,4	83	95	0,8	82
Fe (238,20)	94	0,7	57	95	1,0	54
(Cu 324,75)	98	0,8	2,7	100	1,1	2,5
Mn (257,61)	94	0,8	5,1	96	0,8	5,8
Co (228,61)	96	159	149	98	184	-140,5
Ni (232,00)	96	20	511	95	23	-252
Mo (220,03)	95	72	198	98	22	186
Cd (214,44)	93	71	2,3	96	45	2,2
Cr (205,56)	99	55	12	101	74	12
Ba (455,393)	93	2,2	9,3	94	2,9	8,7
V (309,31)	90	64	110	N/C	N/C	95
Se (196,02)	90	63	154	51	79	145
As (188,97)	95	117	12	97	114	-24
Sb (206,833)	90	54	14	92	10	13
Hg (194,163)	100	16	46	102	13	43
Al (308,21)	92	10	8,9	N/C	N/C	8,2
Pb (220,35)	89	14	14	N/C	N/C	14

N/C: não foi possível obter a curva de calibração para o elemento estudado nessas condições.

Nas determinações com padrão interno usa-se a razão de intensidades entre as linhas espectrais do elemento de interesse e a escolhida para o padrão interno. O padrão interno age como uma testemunha em todo o processamento da amostra, incluindo a nebulização, o transporte e também no plasma. Na medida da razão de intensidades as possíveis flutuações ocorridas durante a análise são compensadas [54].

Essas variações podem ser observadas numericamente por uma diminuição do valor de RSD e aumento da relação sinal/fundo, que indica uma maior precisão entre as medidas, característica direta de um processo de nebulização e atomização eficientes.

Pode ser observado na **Tabela 14** que o padrão interno ítrio teve um comportamento variável, mas de forma geral sua presença não melhorou os valores de RSD, nem as porcentagens de recuperação dos analitos. A relação sinal fundo (SBR), de forma geral, também não aumentou, indicando que o ítrio não contribuiu para a melhora do sinal analítico nas amostras de nutrição enteral.

4.1.4 Figuras de mérito para a determinação de espécies metálicas em nutrição enteral por ICP OES.

4.1.4.1 Exatidão do método

Um material certificado deve ser usado sempre que possível para avaliar a exatidão de um método, porém nem todos os tipos de amostras estão disponíveis na forma de material certificado. No caso de nutrições enterais, não existe a disponibilidade desse material, portanto, um estudo de adição e recuperação foi feito para avaliar a exatidão do método. Neste experimento duas amostras diferentes foram enriquecidas em dois níveis de concentrações esperadas e mantidas por uma noite em geladeira.

Elementos metálicos com concentrações mais elevadas, como Na, K, Ca e Mg, foram enriquecido com valores dos analitos correspondentes de 50 a 100% da sua

concentração declarada. Os elementos em concentrações mais baixas ou não declarados pelos fabricantes foram adicionados de forma que atingissem o primeiro ponto da curva de calibração e o dobro desse valor.

As leituras também foram realizadas em mais de um comprimento de onda para avaliar qual deles era o mais sensível para as determinações. No caso dos elementos presentes nas amostras em concentrações mais baixas a avaliação do BEC (background equivalent concentration) permite selecionar o comprimento de onda mais sensível, já que os mesmos possuem os menores valores de BEC.

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos nesse experimento de adição e recuperação, para os diferentes elementos investigados.

Tabela 15: Resultados obtidos para o estudo de exatidão do método, para as determinações por ICP OES.

	Valores médios declarados	Concentração final adicionada: 0,05 mg L⁻¹		Concentração final adicionada: 0,10 mg L⁻¹		BEC (mg L⁻¹)
		Recuperação (%)		Recuperação (%)		
Al 394,394	n/d	110	110	108	98	3,23
Al 237,314	n/d	105	104	106	95	3,43
Al 309,309	n/d	107	110	107	102	0,29
As 188,979	n/d	90	108	104	98	0,98
As 197,199	n/d	95	94	101	89	2,88
Ba 233,525	n/d	102	107	105	100	0,09
Ba 455,393	n/d	104	111	103	99	0,05
Cd 228,804	n/d	97	99	97	91	0,12
Cd 214,428	n/d	97	101	101	94	0,06
Co 228,618	n/d	101	104	102	95	0,18
Co 238,892	n/d	89	85	105	97	0,26
Cr 267,712	0,0028 ± 0,0017	97	100	97	91	0,30

Cr 205,558	0,0028 ± 0,0017	98	102	99	92	0,17
Cu 327,376	0,07 ± 0,03	102	107	105	102	0,83
Cu 324,758	0,07 ± 0,03	102	117	105	105	0,36
Hg 194,163	n/d	139	236	140	164	0,93
Mn 257,612	0,14 ± 0,06	104	120	105	107	0,03
Mn 260,571	0,14 ± 0,06	105	120	106	107	0,05
Mo 202,03	0,0043 ± 0,0027	109	110	109	100	0,31
Mo 203,844	0,0043 ± 0,0027	111	109	110	100	0,63
Ni 231,604	n/d	97	104	97	95	0,42
Ni 221,646	n/d	119	96	111	96	0,36
Pb 220,351	n/d	95	104	99	98	1,58
Pb 217,00	n/d	108	96	95	91	4,50
Sb 206,833	n/d	99	117	101	104	1,20
Sb 217,581	n/d	111	114	104	100	2,38
Se 196,027	0,0028 ±0,0010	112	99	109	97	1,94
Se 203,985	0,0028 ±0,0010	109	104	105	97	4,70
Sr 407,763	n/d	106	119	106	108	0,58
Sr 421,54	n/d	83	105	68	87	0,12
V 310,233	n/d	116	103	120	101	2,99
V 309,31	n/d	108	117	111	106	0,30
		Concentração final adicionada: 0,15 mg L⁻¹		Concentração final adicionada: 0,22 mg L⁻¹		
		Recuperação (%)		Recuperação (%)		
Fe 238,209	0,63 ± 0,18	98	105	102	105	0,12
Fe 259,942	0,63 ± 0,18	98	118	103	106	0,15

Zn 206,201	0,69 ± 0,24	100	113	102	104	0,09
Zn 213,856	0,69 ± 0,24	100	113	102	104	0,11
		Concentração final adicionada: 5 mg L⁻¹		Concentração final adicionada: 10 mg L⁻¹		
		Recuperação (%)		Recuperação (%)		
Mg 285,214	10,87 ± 3,51	103	117	104	107	0,11
Mg 279,081	10,87 ± 3,51	102	115	104	106	2,34
		Concentração final adicionada: 10 mg L⁻¹		Concentração final adicionada: 15 mg L⁻¹		
		Recuperação (%)		Recuperação (%)		
P 213,62	32	102	117	105	108	2,26
P 178,225	32	103	119	107	110	2,14
		Concentração final adicionada: 20 mg L⁻¹		Concentração final adicionada: 30 mg L⁻¹		
		Recuperação (%)		Recuperação (%)		
Ca 317,933	35,40 ± 10,17	103	118	106	110	0,44
Ca 315,891	35,40 ± 10,17	104	115	105	106	0,73
K 766,596	57,84 ± 14,53	104	106	105	106	2,44
K 404,703	57,84 ± 14,53	103	128	108	113	1960
Na 330,242	37,18 ± 11,38	104	124	108	115	137

n/d: valores não declarados na embalagem

Os resultados expressos na Tabela 15 mostraram recuperações quantitativas para os elementos estudados [57]. Os comprimentos de onda selecionados após esse estudo serão utilizados para as análises posteriores das nutrições enterais.

4.1.4.2 Cálculo do limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) foram calculados pela fórmula: $LOD = (3 \times RSD \times BEC)/100$; $LOQ = 5 \times LOD$. Nesta fórmula, o RSD corresponde ao desvio padrão relativo de 10 medidas do branco analítico e o termo BEC corresponde à quantificação, em unidades de concentração, do elemento da intensidade de emissão correspondente ao fundo naquela linha espectral que se deseja usar ($BEC = C_0 / SBR$) [54]. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de LOD e de LOQ para o método proposto por ICP OES.

	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹) método
Al (309,309)	0,003	0,010	0,253
As (188,979)	0,013	0,043	1,075
Ba (455,393)	0,001	0,003	0,082
Ca (317,933)	0,004	0,015	0,369
Cd (228,804)	0,001	0,002	0,048
Co (228,618)	0,001	0,004	0,105
Cr (205,558)	0,002	0,005	0,133
Cu (324,758)	0,004	0,014	0,346
Fe (238,209)	0,000	0,001	0,035
Hg (194,163)	0,007	0,023	0,578
K (766,596)	0,032	0,104	2,611
Mg (285,214)	0,001	0,003	0,063
Mn (257,612)	0,000	0,001	0,018
Mo (202,03)	0,002	0,006	0,155
Na (330,242)	1,774	5,855	1,460
Ni 221,646)	0,002	0,008	0,198
P (213,62)	0,011	0,037	0,936
Pb (220,351)	0,012	0,039	0,969

Sb (206,833)	0,011	0,036	0,895
Se (196,027)	0,019	0,064	1,608
Sr (421,54)	0,001	0,005	0,119
V (309,31)	0,003	0,011	0,264
Zn (206,201)	0,001	0,003	0,080

LOQ do método: 25 *LOQ

Comparando-se os limites de quantificação calculados para o método com as médias das concentrações esperadas nas amostras (Tabela 15) observamos que os elementos Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn, que são adicionados nas amostras, podem ser quantificados pelo método proposto. Para as espécies que precisam atender a legislação da ANVISA (**Tabela 3**), os limites de quantificação obtidos não são suficientes para as determinações de Pb, Cd, Hg e Se. Para esses elementos é necessária a utilização de uma técnica com melhor detectabilidade, como por exemplo GF AAS ou ICP-MS.

4.1.5 Aplicação do método desenvolvido para as amostras de nutrição enteral

As amostras de nutrição enteral adquiridas no comércio de Campinas, SP, foram analisadas utilizando as condições definidas pelo método proposto. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e foi realizado um branco da digestão com os reagentes utilizados no preparo da amostra.

Os elementos determinados incluem aqueles declarados na embalagem das amostras de nutrição enteral, os elementos definidos como contaminantes segundo a Anvisa [19] e outros elementos essenciais e contaminantes.

Os resultados obtidos estão expressos nas **Tabelas 17 a 23**, onde as amostras foram separadas em grupos, de acordo com as marcas estudadas. As marcas nomeadas como NUT e SUP são produzidas no Brasil, e as restantes são comercializadas no país, porém importadas.

Tabela 17: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como NUT.

	NUT1	NUT1 declarado	NUT2	NUT2 declarado	NUT3	NUT3 declarado
Al	0,383	n/d	0,413	n/d	0,336	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	< LOQ	<LOQ	< LOQ
Ba	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ca	1410	1050	251	1050	548	650
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,095	<LOQ	0,120	<LOQ	0,100
Cu	1,00	2,00	0,64	2,00	1,33	2,00
Fe	10,3	17,0	4,68	17,0	8,03	20,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	1694	1700	1500	1700	634	550
Mg	269	400	105	400	214	250
Mn	3,33	5,00	1,00	5,00	3,30	5,00
Mo	<LOQ	0,12	<LOQ	0,12	<LOQ	0,15
Na	2089	900	1267	900	3203	600
Ni	1,41	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
P	1414	1000	363	1000	1246	650
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,100	<LOQ	0,095	<LOQ	0,040
Sr	9,34	n/d	1,31	n/d	2,36	n/d
V	0,394	n/d	0,430	n/d	0,348	n/d
Zn	8,78	15,0	2,39	15,0	9,65	15,0

n/d : não declarado

Tabela 18: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como ABB.

	ABB1	ABB1 declarado	ABB2	ABB2 declarado	ABB3	ABB3 declarado
Al	0,586	n/d	0,400	n/d	0,382	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	0,189	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ca	1126	1200	1419	1390	1452	1370
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,120	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cu	2,24	2,00	2,50	2,10	2,62	2,10
Fe	18,7	20,0	19,8	19,0	24,9	19,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	1600	1900	1094	1100	1159	1050
Mg	415	400	259	210	249	210
Mn	4,96	5,00	5,28	5,30	6,50	5,50
Mo	<LOQ	0,150	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Na	1315	1350	830	800	928	850
Ni	<LOQ	n/d	1,87	n/d	1,88	n/d
P	1193	1200	757	730	880	700
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,070	<LOQ	0,080	<LOQ	0,100
Sr	4,09	n/d	3,41	n/d	2,97	n/d
V	0,600	n/d	0,412	n/d	0,393	n/d
Zn	24,0	20,0	25,2	24,0	32,5	24,0

n/d : não declarado

Tabela 19: Concentrações obtidas e declaradas na embalagem, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como ABB.

	ABB4	ABB4 declarado	ABB5	ABB5 declarado
Al	0,499	n/d	0,582	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	0,251	n/d	0,283	n/d
Ca	864	710	1222	1200
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	n/d	<LOQ	0,120
Cu	1,90	n/d	2,14	2,00
Fe	20,3	12,8	18,4	18,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	1613	1400	1579	1900
Mg	363	285	407	400
Mn	3,77	3,50	5,20	5,00
Mo	<LOQ	n/d	0,178	0,150
Na	977	850	1277	1350
Ni	1,96	n/d	<LOQ	n/d
P	813	710	1197	1200
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,050	<LOQ	0,070
Sr	6,39	n/d	4,33	n/d
V	0,511	n/d	0,597	n/d
Zn	18,8	16,0	23,9	23,0

n/d : não declarado

Tabela 20: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como NES.

	NES1	NES1 declarado	NES2	NES2 declarado	NES3	NES3 Declarado
Al	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ca	326	670	1186	1000	1186	800
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,040	<LOQ	0,030	<LOQ	0,040
Cu	1,77	1,40	1,14	1,00	1,14	2,00
Fe	12,2	12,0	21,0	14,0	21,0	18,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	961	1250	1296	1300	1296	1500
Mg	220	260	225	200	225	300
Mn	1,47	2,80	2,15	1,50	2,15	2,80
Mo	0,179	0,120	<LOQ	0,030	<LOQ	0,120
Na	1723	900	510	450	510	550
Ni	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
P	679	670	855	800	855	700
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,040	<LOQ	0,030	<LOQ	0,050
Sr	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
V	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Zn	13,1	13,6	17,0	15,2	17,0	24,4

n/d : não declarado

Tabela 21. Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como SUP.

	SUP1	SUP1 declarado	SUP2	SUP2 declarado	SUP3	SUP3 declarado	SUP4	SUP4 declarado
Al	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ca	723	800	636	910	607	600	656	600
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,120	<LOQ	0,100	<LOQ	0,035	<LOQ	0,035
Cu	1,18	1,80	1,83	2,70	0,918	0,900	0,850	0,900
Fe	15,3	16,0	13,5	24,0	9,46	10,0	9,07	10,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	1336	1500	1394	1590	880	1100	1022	1100
Mg	214	230	227	230	106	110	110	110
Mn	3,44	3,30	2,62	5,00	1,57	1,50	1,46	1,50
Mo	<LOQ	0,100	<LOQ	0,150	<LOQ	0,040	<LOQ	0,040
Na	965	1000	611	900	560	600	548	600
Ni	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
P	665	720	396	780	464	500	435	500
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,075	<LOQ	0,086	<LOQ	0,030	<LOQ	0,030
Sr	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
V	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Zn	11,1	12,0	10,8	18,0	9,85	10,0	9,83	10,0

n/d : não declarado

Tabela 22: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mg L⁻¹, para as amostras da marca denominada como NOV.

	NOV1	NOV1 declarado	NOV2	NOV2 declarado	NOV3	NOV3 declarado
Al	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	0,540	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	0,171	n/d
Ca	348	613	376	670	2091	1100
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,1	<LOQ	0,100	<LOQ	0,101
Cu	1,79	2,00	1,77	1,00	<LOQ	2,00
Fe	10,8	12,0	12,2	12,0	18,4	15,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	938	950	1784	1700	1881	1772
Mg	216	229	277	267	395	338
Mn	1,42	2,00	2,26	3,00	2,65	2,00
Mo	<LOQ	0,18	0,200	0,200	<LOQ	0,063
Na	1600	1600	1184	1050	<LOQ	950
Ni	<LOQ	n/d	1,77	n/d	1,37	n/d
P	651	800	533	668	1324	1097
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,100	<LOQ	0,100	<LOQ	0,059
Sr	2,44	n/d	2,50	n/d	14,7	n/d
V	0,399	n/d	0,430	n/d	0,555	n/d
Zn	12,7	15,0	14,0	17,0	17,5	13,0

n/d : não declarado

Tabela 23: Concentrações obtidas e declaradas nas embalagens, em mgL⁻¹, para as amostras da marca denominada como NOV.

	NOV4	NOV4 declarado	NOV5	NOV5 declarado
Al	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
As	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ba	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Ca	797	750	477	670
Cd	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Co	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Cr	<LOQ	0,040	<LOQ	0,100
Cu	1,32	1,00	1,19	1,00
Fe	10,6	11,0	11,7	12,0
Hg	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
K	1372	1350	1641	1800
Mg	209	218	259	267
Mn	2,54	2,00	2,58	3,00
Mo	<LOQ	0,070	<LOQ	0,200
Na	1149	850	1165	1150
Ni	2,04	n/d	1,48	n/d
P	789	754	473	668
Pb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Sb	<LOQ	n/d	<LOQ	n/d
Se	<LOQ	0,050	<LOQ	0,100
Sr	3,00	n/d	2,58	n/d
V	0,350	n/d	0,428	n/d
Zn	12,0	11,0	14,1	17,0

n/d : não declarado

Pelos resultados obtidos pode ser observado, de forma geral que existe uma variação da concentração dos elementos declarados nas embalagens das amostras e nos resultados obtidos pelo método proposto, em algumas marcas. É importante ressaltar também que, de uma forma geral, os contaminantes possíveis de serem determinados, de acordo com o LOQ, não foram detectados nessas análises. Além disso, foi possível quantificar os elementos Ba, Sr, Al e V, que não são declarados nas embalagens, mas que também não são regulados pela ANVISA [19].

Considerando que alguns elementos, importantes pelo seu potencial tóxico, não podem ser quantificados por ICP OES, devido ao limite de quantificação do método, foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

4.2 Uso de GF AAS para a determinação das espécies de interesse nas amostras de nutrição enteral

4.2.1 Determinação direta de espécies metálicas por GF AAS empregando reagente alcalino (CFA-C)

A maioria das técnicas utilizadas na determinação de elementos metálicos envolve o preparo da amostra, para eliminar a matriz orgânica. O procedimento, entretanto, pode envolver várias etapas, aumentando o tempo de análise, o gasto de reagentes, além de ser uma fonte de contaminação, levando à obtenção de resultados pouco confiáveis.

O uso de aminas terciárias (CFA-C) e reagentes alcalinos como forma de tratamento da amostra pode ser uma boa alternativa para a determinação de alguns analitos em diversos tipos de matrizes [60,61,62].

O CFA-C foi utilizado com sucesso em determinações de elementos metálicos utilizando GF AAS. Cádmio, Cu e Pb foram determinados em amostras de cabelo [60]. Aleixo *et al.* determinaram Fe e Se [61] e Vanhoe *et al.* determinaram iodo total [62],

ambos em amostras de leite. Na maioria dos casos estudados foi encontrada uma melhora de exatidão, performance analítica e precisão.

Nesse sentido, a determinação direta de espécies metálicas por GF AAS utilizando um reagente alcalino é uma alternativa para a quantificação das espécies que estão abaixo do LOQ para a quantificação por ICP OES.

Os elementos escolhidos foram aqueles declarados nas embalagens das nutrições enterais, mas que não foram possíveis de serem determinados por ICP OES: Cr, Se e Mo, além do Al, que é uma espécie metálica frequente em alimentos. Esse elemento apresenta grande interesse, uma vez que está relacionado a doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose. O alumínio tem efeitos tóxicos acumulativos e não há relatos de necessidade biológica estabelecida em humanos [63, 64].

Nos estudos iniciais a amostra foi diluída a uma porcentagem de 50 % (m/m), conforme estudos sugeridos para a determinação por ICP OES [65]. A introdução da amostra nesse fator de diluição resultou na formação de grande quantidade de resíduo carbonáceo no forno de grafite, após a etapa de pirólise, gerando grande desvio entre as medidas. Após vários testes de diluição, o fator de diluição que não apresentou a formação de resíduo, foi de 4% (m/m). Nessas condições o único entre os elementos propostos que apresentou sinal analítico na análise da amostra foi o alumínio. Desta forma, foi feito um estudo detalhado para este elemento, visando sua quantificação nas amostras de alimentação enteral.

4.2.1.1 Estudo da concentração de CFA-C

Embora os estudos publicados na literatura utilizem a concentração de CFA-C 10% (m/m), foi feito um estudo para verificar o efeito da concentração de CFA-C na determinação de alumínio. Para isso, foi construída uma curva analítica de Al até 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ em diferentes concentrações de CFA-C, no intervalo de 2 a 10% (m/m). Os resultados obtidos estão mostrados no gráfico da **Figura 6**.

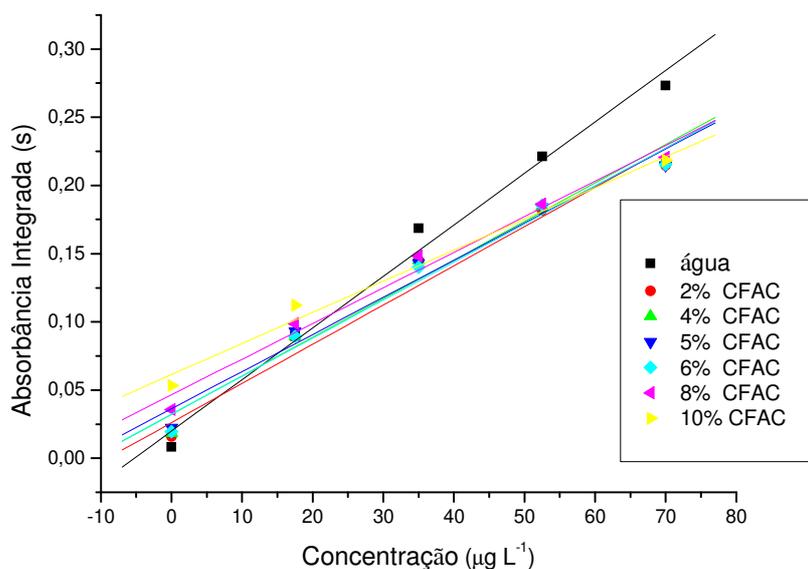


Figura 6: Curvas de calibração até 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al em diferentes concentrações de CFA-C utilizando o modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Observa-se pelos valores do coeficiente angular (Tabela 24) que um aumento na concentração de CFA-C leva a uma diminuição de aproximadamente 20% da inclinação da curva.

Tabela 24: Coeficientes angulares das curvas de calibração em diferentes concentrações de CFA-C.

Concentração CFA-C	Coefficiente angular ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0%	0,00378
2%	0,00287
4%	0,00283
5%	0,00272
6%	0,00279
8%	0,00261
10%	0,00228

Pelos resultados obtidos um valor de concentração mais baixo de CFA-C deveria ser utilizado para obter uma melhor detectabilidade, porém na prática a utilização da concentração mais baixa de CFA-C produziu resultados com maiores valores de RSD para as amostras e uma menor estabilidade da amostra em suspensão. Isto ocorre porque a utilização do CFA-C evita o acúmulo de gordura no capilar do auto-amostrador, melhorando a repetibilidade do sinal analítico. Desta forma, a utilização do CFA-C na concentração 10% (m/m) foi selecionada como a mais adequada e utilizada nos experimentos posteriores.

4.2.1.2 Influência do uso de CFA-C nas determinações de Al

A influência do uso do CFA-C nas determinações do Al foi avaliada por um estudo para verificar o comportamento da amostra frente a diferentes condições, tais como diluição em H₂O ou CFA-C e presença de modificador químico. Nesse estudo a amostra foi diluída em 4% m/m, tanto em CFA-C quanto em água e suas temperaturas de pirólise e de atomização foram variadas nas diferentes condições de diluição da amostra, na ausência e na presença do modificador químico Mg(NO₃)₂.

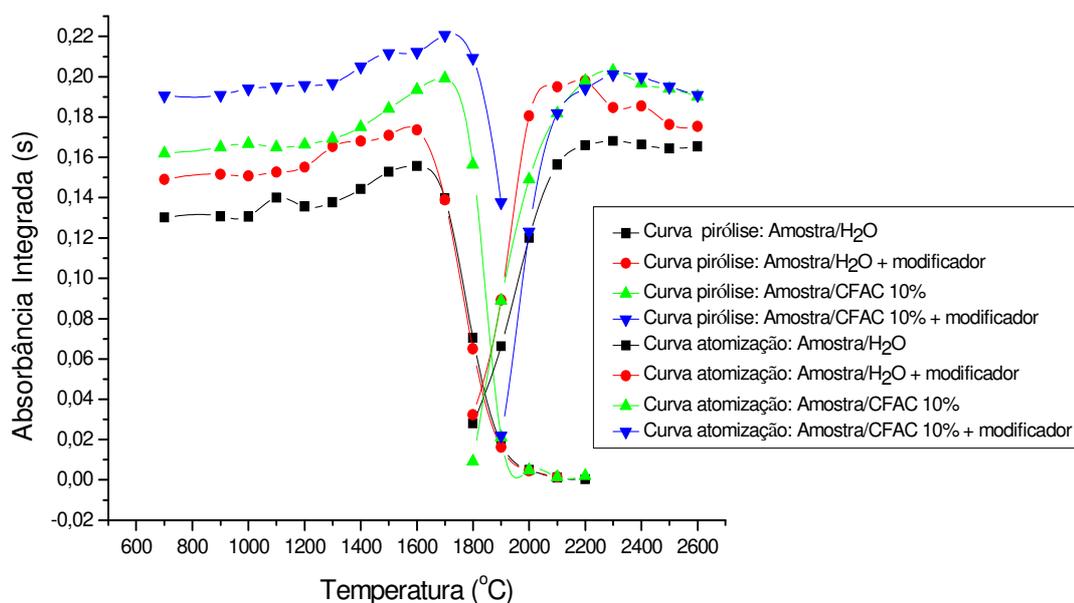


Figura 7: Curvas de pirólise e atomização do Al em diferentes diluições da amostra.

Na **Figura 7** pode ser visualizado que as amostras na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, o modificador químico mais recomendado para este tipo de elemento, apresentaram um sinal de absorbância mais alto tanto em meio aquoso quanto em CFA-C. A diluição das amostras em CFA-C causou uma maior estabilidade térmica do Al aumentando a temperatura de pirólise de 1600 °C para 1750 °C. As temperaturas de atomização tiveram comportamento semelhante às curvas de pirólise, porém sofreram menor interferência do meio. De forma geral, a utilização do CFA-C evita o acúmulo de gordura no capilar do amostrador, melhorando a repetibilidade do sinal analítico, aumenta a temperatura de pirólise da amostra e melhora a estabilidade da amostra em suspensão.

Portanto, a utilização do CFA-C, juntamente com o modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, aumentou o sinal analítico, permitiu uma maior estabilidade térmica e melhorou a precisão dos resultados.

4.2.1.3 Otimização multivariada das condições do GF AAS para determinação de Al utilizando CFA-C 10%.

Na técnica de GF AAS os parâmetros frequentemente otimizados são: uso de modificador químico, tempo de pirólise e temperatura de pirólise e de atomização. O estudo desses parâmetros geralmente é demorado, sendo necessária a construção das curvas de pirólise e de atomização para cada modificador investigado. Com a otimização multivariada é possível variar todos esses fatores com menos experimentos do que em uma otimização univariada. O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística simples que pode ser usada para verificar os efeitos das variáveis e suas interações, com poucos experimentos [66]. Essas interações influenciam diretamente a resposta, ou seja, a absorbância integrada.

O planejamento escolhido para a otimização foi um 2^4 com ponto central, resultando em 18 experimentos. Os níveis mais altos e mais baixos selecionados para o estudo estão mostrados na Tabela 25 , e foram selecionados para obter uma

determinação mais efetiva das condições ótimas para a quantificação do alumínio. Para a escolha dos parâmetros foram consideradas as temperaturas que levaram a um menor sinal de absorção de fundo, associado a uma maior absorbância integrada, além de se considerar também o perfil do pico obtido para cada condição estudada.

Tabela 25: Níveis escolhidos para o planejamento fatorial.

	(A) Temperatura Pirólise (°C)	(B) Tempo Pirólise (s)	(C) Temperatura Atomização (°C)	(D) Modificador
-	1600	15	2200	não
Ponto central	1700	20	2250	não/sim
+	1800	25	2300	sim

Os resultados obtidos foram tratados usando o software estatístico *Statgraphics Plus*. Os resultados obtidos para o design fatorial estão mostrados na Figura 8.

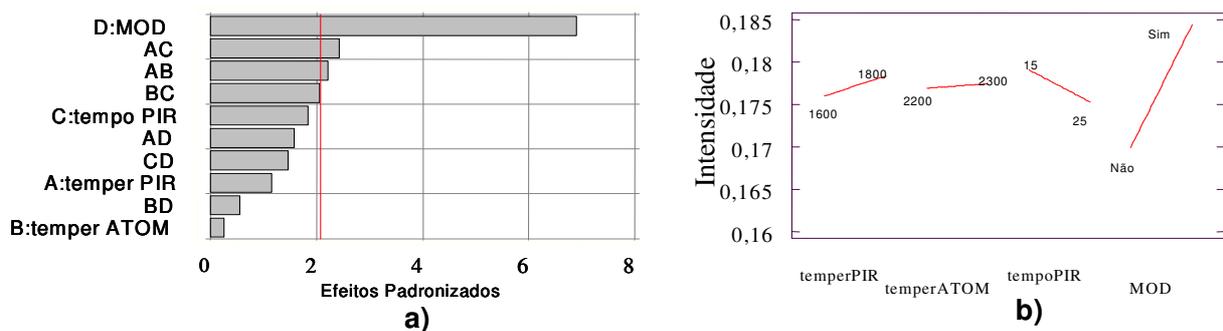


Figura 8: (a) Gráfico de Pareto para otimização das condições para determinação de Al em amostras de nutrição enteral por GF AAS. (b) Gráfico de efeitos principais na otimização das condições para determinação de Al em amostras de nutrição enteral por GF AAS.

O gráfico de Pareto (**Figura 8 (a)**) apresenta as variáveis que tem efeito significativo no nível de confiança de 95%. Observa-se que o uso de modificador químico e as interações AC (temperaturas de pirólise e de atomização) e AB (tempo de pirólise e uso de modificador) são estatisticamente significantes para a resposta analítica, no intervalo estudado.

Pelo gráfico de efeitos principais (**Figura 8 (b)**) observa-se que a temperatura de pirólise de 1800 °C é melhor que a temperatura de 1600 °C. Quanto à temperatura de atomização a diferença de ganho de sinal não foi significativo, ocorrendo ligeiro aumento da absorbância a 2300 °C. Já para a etapa de pirólise, um aumento no tempo ocasionou uma diminuição do sinal de absorbância, porém no tempo de 15 segundos o RSD das medidas era maior que 10%, portanto, o valor intermediário de 20 segundos foi escolhido. O fator que apresentou maior diferença foi o uso de modificador químico. Assim, as condições otimizadas que serão utilizadas no restante do trabalho serão: temperatura de pirólise a 1800 °C, temperatura de atomização a 2300 °C, tempo de pirólise de 20 segundos e uso do modificador químico $Mg(NO_3)_2$.

4.2.1.4 Figuras de mérito para determinação de Al por GF AAS usando CFA-C

Para a avaliação da exatidão do método foi feito um estudo de adição e recuperação de Al nas amostras, adicionando-se duas concentrações finais esperadas diferentes: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al. As amostras foram preparadas na diluição de 4% v/v em CFA-C 10%. Os resultados das recuperações obtidas estão descritos na **Tabela 26**, mostrando recuperações quantitativas para ambos os níveis de adição.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando 10 leituras do branco da curva analítica. O LOD foi calculado a partir da fórmula $3*SD$ e o LOQ $10*SD$ [67]. A massa característica encontrada para o método foi de 25 pg, enquanto o limite de detecção foi $1,81 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação $6,02 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 26: Média das recuperações obtidas para amostras de nutrição enteral diluídas em CFA-C 10%.

	Concentração final adicionada: 5 µg L⁻¹	Concentração final adicionada: 10 µg L⁻¹
Amostra	Recuperação (%)	Recuperação (%)
A	102 ± 8,0	96 ± 2,3
B	106 ± 4,3	102 ± 2,8

4.2.1.5 Determinação de Al nas amostras de nutrição enteral

Após os estudos de otimização das condições instrumentais e experimentais, amostras de nutrição enteral foram analisadas. Cada amostra, analisada em duplicata, foi diluída em CFA-C 10% na concentração de 4% v/v. Em seguida, as soluções foram sonicadas por 5 minutos. Após esse processo, as amostras foram submetidas à análise por GF AAS, nas condições otimizadas. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 27.

Os resultados encontrados nas amostras mostram que as concentrações independem do tipo de embalagem em que são estocadas para a comercialização. Exemplo disso são as amostras NES3 e NES4, que são acondicionadas em latas de alumínio, mas que possuem uma concentração de Al menor que as amostras SUPP3 e ABB5, que são acondicionadas em vidro e plástico, respectivamente. Já para um mesmo tipo de nutrição enteral (ABB1 e ABB5) a amostra acondicionada em lata (ABB 1) apresenta uma concentração ligeiramente maior que a amostra ABB5, acondicionada em plástico. Percebe-se, portanto, que a concentração de Al é mais dependente do fabricante das nutrições do que das próprias embalagens, indicando que essa contaminação pode ocorrer durante a fabricação ou é proveniente da matéria prima utilizada.

Tabela 27: Concentração de Al encontrado nas amostras de nutrição enteral analisadas.

Amostra	Tipo de Embalagem	Concentração média encontrada de Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NOV3	Tetra Pak[®]	2234 \pm 78
NOV4	Tetra Pak[®]	1017 \pm 46
NOV6	Tetra Pak[®]	1033 \pm 11
SUP3	Vidro	325 \pm 32
SUP2	Tetra Pak[®]	357 \pm 36
NUT1	Tetra Pak[®]	651 \pm 17
ABB1	Lata de Al	883 \pm 88
ABB5	Plástico	831 \pm 41
NES3	Lata de Al	154 \pm 13
NES4	Lata de Al	64 \pm 8

A toxicidade em relação ao alumínio é relativa a exposição excessiva, porém os aspectos toxicológicos de alumínio consumido oralmente são poucos conhecidos. O elemento é pouco absorvido nos intestinos e as pequenas quantidades absorvidas das dietas normais são excretadas pelos rins saudáveis, de modo que nenhum acúmulo ocorra. O JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) estabelece a ingestão semanal tolerável de 1mg/kg de alumínio [68]. Porém, no Brasil não existe legislação para o limite de alumínio nos alimentos [30].

Observando-se as concentrações obtidas nas amostras estudadas (Tabela 27), alguns tipos de nutrições enterais seriam consideradas inadequadas para o consumo.

4.3 Determinação de Pb e Cd por GF AAS em amostras de nutrição enteral

Os elementos Pb e Cd foram selecionados para um estudo mais aprofundado, utilizando a técnica de GF AAS, pois essas duas espécies são reguladas pelo órgão de fiscalização Anvisa, que estabelece uma concentração máxima permitida nos alimentos. Segundo a Anvisa a concentração máxima permitida para Cd é 1 mg L^{-1} e para Pb $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ [19].

Como a determinação por ICP OES não atingiu os limites estabelecidos pela Anvisa e a introdução direta da amostra na determinação por GF AAS não foi possível devido à formação de resíduo carbonáceo, um método foi desenvolvido para as amostras preparadas no forno de micro-ondas fechado. O mesmo programa de aquecimento utilizado para a digestão das amostras, para a determinação por ICP OES, foi utilizado antes da quantificação por GF AAS.

4.3.1 Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para Cd e Pb

O programa de aquecimento do forno de grafite foi otimizado de forma univariada, partindo das condições propostas pelo fabricante utilizando uma amostra de nutrição enteral digerida previamente no forno de micro-ondas fechado. Para a otimização de Cd as amostra foram enriquecidas com $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e para o Pb as amostras foram enriquecidas com $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ do analito. As temperaturas de pirólise e de atomização foram variadas na ausência e na presença dos modificadores químicos descritos anteriormente. A **Figura 9** e a **Figura 10** descrevem os perfis das temperaturas de pirólise e atomização encontradas para os elementos estudados.

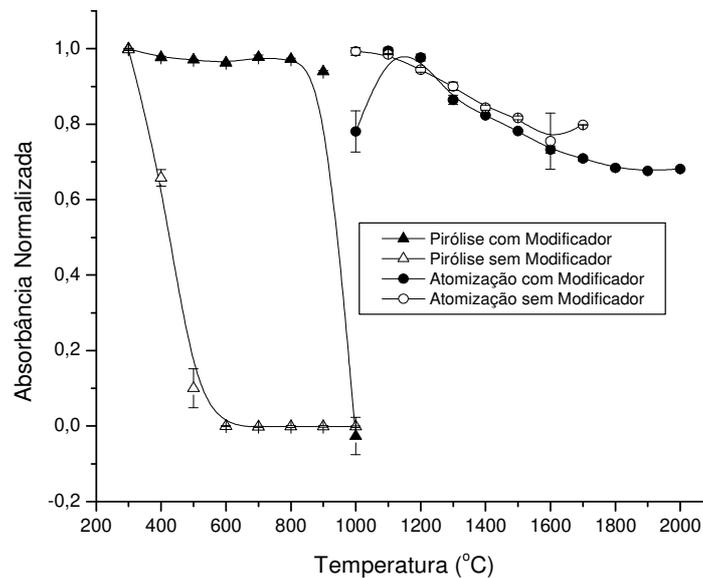


Figura 9: Perfil das temperaturas de pirólise e de atomização para Cd, utilizando o modificador químico: Pd/ $Mg(NO_3)_2$

A **Figura 9** mostra que a temperatura de pirólise para o Cd varia muito na ausência e na presença do modificador químico. Na presença de modificador químico a temperatura de pirólise é de 900 °C enquanto que na ausência de modificador químico o Cd é rapidamente perdido durante a pirólise, mesmo em temperaturas abaixo de 600 °C. Essa é uma característica de elementos menos estáveis a temperatura e por isso o uso de modificadores químicos, mesmo em amostras mineralizadas, é necessário. Nas curvas de atomização a temperatura ótima é semelhante em 1200 °C.

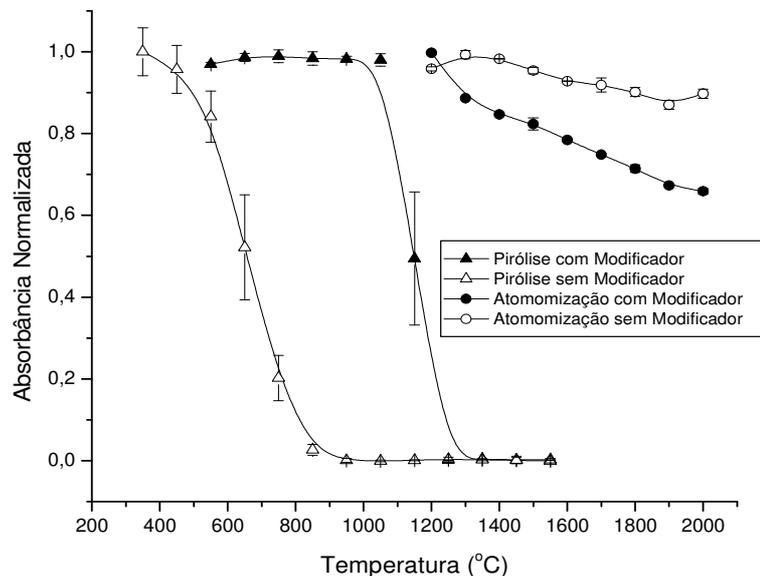


Figura 10: Perfil das temperaturas de pirólise e de atomização para Pb utilizando o modificador químico: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

A **Figura 10** mostra, para o chumbo, um perfil das temperaturas de pirólise e de atomização semelhante àquele para Cd. Observamos que a temperatura de pirólise é mais alta na presença do modificador químico, em 950 °C, enquanto que na ausência de modificador químico a diminuição do sinal analítico do Pb ocorre em temperaturas abaixo de 650 °C. A temperatura de atomização ótima encontrada foi de 1200 °C.

4.3.2 Perfil dos picos nas condições otimizadas

Os perfis dos picos na ausência e na presença de modificadores químicos foram obtidos usando as condições ótimas encontradas durante a etapa de otimização das condições experimentais. A Tabela 28 resume as condições estudadas para a determinação de cádmio e de chumbo em amostras de nutrição enteral, na presença e na ausência dos modificadores químicos.

Tabela 28: Condições otimizadas para Cd e Pb, utilizadas para obter os perfis dos picos, na ausência e na presença do modificador químico (Mg(NO₃)₂).

Elemento	Sem modificador		Com modificador	
	T pirólise °C	T atomização °C	T pirólise °C	T atomização °C
Cd	300	1200	900	1200
Pb	450	1200	950	1200

Na **Figura 11**, observamos o perfil do sinal analítico para uma amostra enriquecida com uma concentração final de 1 µg L⁻¹ de Cd. O sinal para o Cd, observado na presença do modificador químico, é mais bem definido, apesar de apresentar uma área menor que o sinal sem modificador químico, 0,0604 e 0,0835 s⁻¹, respectivamente. Esse perfil mostra a necessidade da utilização do modificador químico para a quantificação de Cd nas amostras de nutrição enteral mineralizadas.

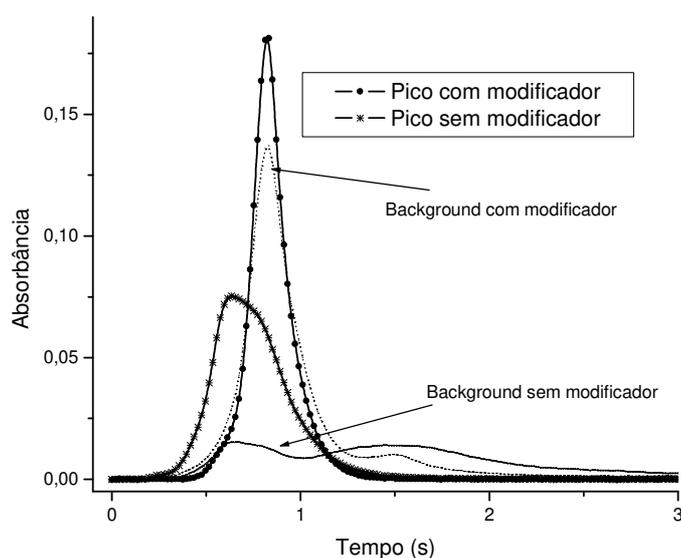


Figura 11: Perfis dos sinais para Cd, em amostra de nutrição enteral.

A **Figura 12** mostra que na ausência do modificador químico o perfil do sinal analítico para o Pb é prejudicado, enquanto que na presença do modificador o sinal se mostra mais definido. Os valores de absorbância são prejudicados pela ausência de

modificador, diminuindo de 0,0416 para 0,0353 s⁻¹. Conclui-se, então, sobre a necessidade de utilizar o modificador químico nas quantificações de Pb em amostras de nutrição enteral mineralizadas.

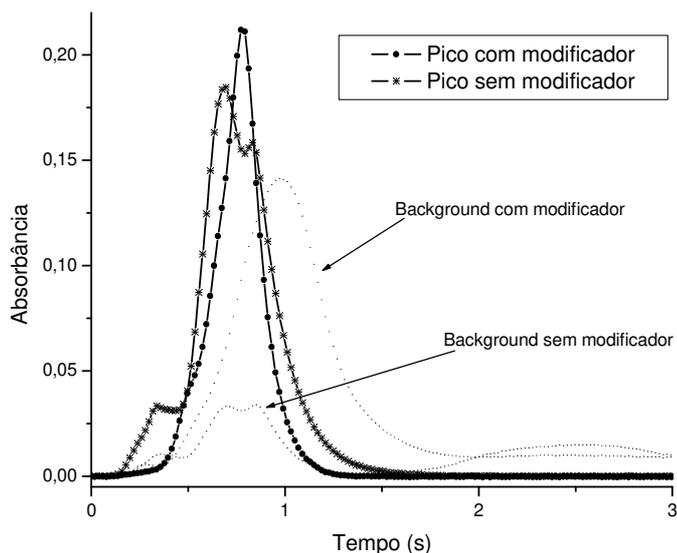


Figura 12: Perfil do pico para Pb, em amostra de nutrição enteral.

Como é esperado para amostras submetidas a um processo de digestão ou em meio aquoso as temperaturas de pirólise e de atomização não diferem significativamente dos valores sugeridos pelo fabricante e, portanto, não é necessária uma otimização multivariada para melhorar as condições do equipamento para as amostras deste tipo.

4.3.3 Influência da acidez

As amostras submetidas à digestão ácida em forno de microondas sempre estão em uma concentração de acidez acima da concentração habitual de trabalho. No caso das amostras mineralizadas, a acidez final encontra-se em torno de 8%, levando-se em conta apenas o volume de ácido adicionado nas amostras e o volume final da solução. Em geral, as curvas analíticas no forno de grafite são realizadas em um meio ácido de 0,2%. Por isso, é necessário avaliar se as curvas analíticas em meio ácido de diferente

concentração apresentam a mesma sensibilidade. Para isto foram construídas curvas comparativas em meio ácido 0,2% (v/v) e 10% (v/v) do analito desejado, para Pb e Cd., cuja as curvas estão mostradas nas **Figuras 13 e 14**, respectivamente.

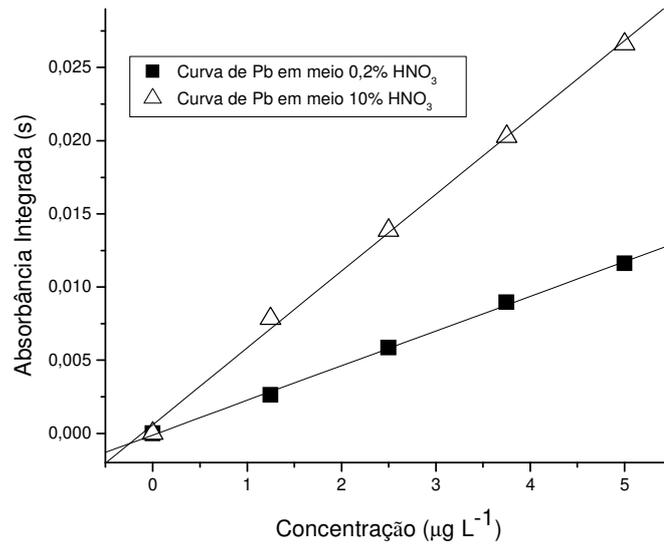


Figura 13: Comparação das curvas de Pb em diferentes concentrações finais de ácido nítrico.

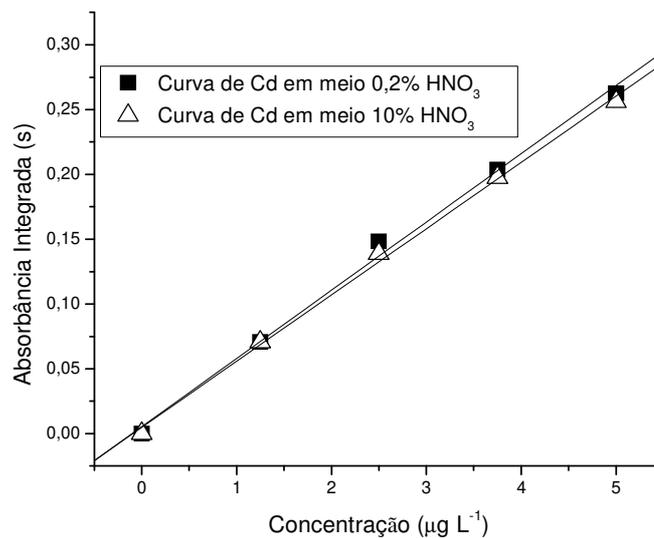


Figura 14: Comparação das curvas de Cd em diferentes concentrações de ácido nítrico.

As curvas obtidas mostram que o valor mais discrepante de detectabilidade entre as duas concentrações ácidas estudadas é observado para o Pb (Tabela 29). Isso indica que é necessária a utilização da curva na mesma porcentagem de acidez que as amostras para a análise de Pb.

Tabela 29: Valores de inclinação encontrados para as diferentes curvas analíticas.

	Inclinação	
	Cd (mg L ⁻¹)	Pb (mg L ⁻¹)
0,2 % HNO ₃	0,05262	0,00237
10% HNO ₃	0,05112	0,00525

4.3.4 Figuras de mérito

4.3.4.1 Exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada em um estudo de adição e recuperação, usando duas amostras de nutrição enteral que foram enriquecidas com dois níveis de concentrações diferentes. As adições foram feitas de acordo com as concentrações máximas permitidas pela legislação. Como o limite máximo tolerado para o Cd é de 1000 µg Kg⁻¹ [19] e o fator de diluição das amostras é de 25 vezes as adições foram realizadas para atingir uma concentração final de 20 µg L⁻¹ e 40 µg L⁻¹ e para o Pb, como o limite é 800 µg kg⁻¹ as adições foram realizadas para atingir a concentração final de 16 e 32 µg L⁻¹. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 30.

Tabela 30: Resultados obtidos para a exatidão do método para determinação de Cd e Pb por GF AAS.

	Cd	Pb
	Concentração final adicionada: 20 µg L⁻¹	Concentração final adicionada: 16 µg L⁻¹
Recuperação média (%)	95	92
	Concentração final adicionada: 40 µg L⁻¹	Concentração final adicionada: 32 µg L⁻¹
Recuperação média (%)	98	97

Os resultados do teste de adição e recuperação mostram que a exatidão do método é apropriada, situando-se entre 92 e 98% [57].

4.3.4.2 Cálculo do limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando 10 leituras do branco da curva analítica. O LOD foi calculado a partir da fórmula $3 \cdot SD$ e o LOQ $10 \cdot SD$ [67]. Os valores de LOD e LOQ estão descritos na Tabela 31.

Tabela 31: Valores de LOD, LOQ e LOQ do método, obtidos para Pb e Cd, na quantificação por GF AAS.

	LOD (µg L⁻¹)	LOQ (µg L⁻¹)	LOQ método (µg L⁻¹)
Pb	0,21	0,69	17,3
Cd	0,09	0,31	7,72

O limite de quantificação do método atinge os valores estabelecidos pela Anvisa para os elementos Cd e Pb, podendo assim ser determinados pelo método proposto.

4.3.5 Determinação de Pb e Cd em amostras de nutrição enteral usando GF AAS

Usando o método desenvolvido para a determinação de Pb e Cd nas amostras de nutrição enteral com a técnica de GF AAS, foram analisadas as amostras comerciais já previamente tratadas pelo procedimento descrito no item 3.3. As faixas de trabalho para a curva analítica foram definidas de forma a atingir os limites máximos tolerados e se estendendo até 50% acima da concentração permitida. Para as amostras de Pb, a faixa de trabalho variou de 8 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para as amostras de Cd a faixa variou de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Após as análises das amostras estudadas observou-se que todas as amostras apresentam concentração de Pb e Cd abaixo do LOQ do método. Portanto, essas amostras analisadas estariam aptas para o consumo, pois o LOQ do método atinge o limite máximo de contaminantes permitido nos alimentos [19].

4.4 Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* das espécies metálicas na nutrição enteral

O termo *biodisponibilidade* tem diversas definições, dependendo da área de pesquisa. Do ponto de vista nutricional, *biodisponibilidade* se refere à fração do nutriente ou composto bioativo ingerido, que está disponível para uso nas funções fisiológicas ou a ser estocado pelo organismo. A *bioacessibilidade* é definida como a fração de um composto que está livre de sua matriz no trato gastro intestinal e se torna disponível para a absorção intestinal, entrando na corrente sanguínea [69].

Os estudo *in vitro* são desenvolvidos para simular as condições fisiológicas e a sequencia de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal humano, considerando as três áreas do sistema digestivo humano: boca, estomago e

intestino. As principais características dos métodos *in vitro* são a temperatura, agitação, composição química ou enzimática da saliva, suco gástrico, duodenal e bile. Quando o processo físico que ocorre *in vivo* não são reproduzidos (peristaltismos, mistura, hidratação, mudanças nas condições com o tempo) o modelo *in vitro* é chamado de estático ou bioquímico [70, 71]. Os modelos dinâmicos imitam os processos físicos que ocorrem levando em conta novas variáveis, como por exemplo, as mudanças de viscosidade, redução do tamanho de partículas, difusão e partição de nutrientes [72,73].

Os trabalhos de biodisponibilidade e bioacessibilidade estão voltados para o estudo dos compostos orgânicos [74, 75] e das espécies metálicas [76,77].

O estudo em nutrições enterais visa em geral observar a biodisponibilidade dos nutrientes em relação às diferentes composições das nutrições enterais [55,78].

Utilizando o procedimento de digestão *in vitro* descrito no **item 3.4** foram estudadas algumas amostras para avaliar a bioacessibilidade. A fração bioacessível foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Fração bioacessível (\%)} = \frac{\text{concentração bioacessível}}{\text{concentração encontrada}} \times 100$$

As **Tabelas 32 e 33** apresentam os resultados obtidos para as frações disponíveis das amostras estudadas.

Tabela 32: Concentrações disponíveis encontradas (mg L^{-1}) (Conc) e fração bioacessível (%) para as amostras NUT3, NOV3, NOV4 e ABB1.

	NUT3		NOV3		NOV4		ABB1	
	Conc.	Fração	Conc.	Fração	Conc.	Fração	Conc.	Fração
Ca	548	210	2091	52	797	52	1126	56
Cr	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cu	1,33	95	<LOQ	<LOQ	1,32	75	2,2	75
Fe	8,03	123	18	67	10,6	68	18,7	72
K	634	327	1881	89	1372	82	1600	86
Mg	214	134	395	73	209	75	415	66
Mn	3,3	77	2,7	42	2,54	69	5,0	58
Mo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P	1246	142	1324	84	789	88	1193	88
Se	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Zn	9,65	75	18	29	12	49	24	47

Tabela 33 Concentrações disponíveis encontradas (mg L^{-1}) (Conc) e fração bioacessível (%) para as amostras ABB2, SUP1 e SUP3

	ABB2		SUP1		SUP3	
	Conc.	Fração	Conc.	Fração	Conc.	Fração
Ca	1419	48	723	47	607	44
Cr	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cu	2,5	68	1,18	113	0,918	88
Fe	19,8	60	15,3	53	9,46	73
K	1094	74	1336	84	880	96
Mg	259	65	214	74	106	82
Mn	5,3	47	3,44	38	1,57	62
Mo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P	757	75	665	74	464	88
Se	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Zn	25,2	45	11,1	9	9,85	47

Para os elementos P e Mg as frações disponíveis encontradas, cujos valores excedem 100%, coincidem com as concentrações mais altas encontradas para essas espécies nos estudos com as amostras mineralizadas e também são influenciadas pelo branco do método de digestão, que é altamente concentrado nessas espécies. Em geral, as frações disponíveis tem valores bem dispersos, de acordo com cada tipo de amostra, isso devido aos diferentes constituintes de cada nutrição enteral. Essa alta dispersão também se deve ao fato de que nesse estudo se obteve uma precisão mais baixa, variando entre 5 e 10%. Essa baixa precisão ocorre, pois os estudos de bioacessibilidade *in vitro* envolvem a utilização de enzimas digestivas que são mais suscetíveis a erros.

Alguns valores de absorção dos elementos metálicos, que podem ser encontrados na literatura, estão descritos na Tabela 34.

Tabela 34: Absorção dos elementos metálicos descritas na literatura [30].

	Absorção
Cu	30%
Fe	5-30%
Mg	30 – 50%
Mn	2 – 5%
P	55 – 70%
Zn	20 -30%
Ca	20 – 35%
K	85%

Os valores da literatura (**Tabela 34**) não são coerentes com os valores encontrados nas amostras de nutrição enteral, entretanto, esses valores declarados foram obtidos por diferentes métodos de estudo e, especialmente, para outros tipos de amostras. A biodisponibilidade de um elemento é afetada por ligações desse elemento com proteínas, lipídeos, etc., o que pode ser um fator diferencial neste tipo de amostras. Outro fator a ser observado é que nas nutrições enterais existe um equilíbrio de concentração entre todos os elementos, fazendo com que esse tipo de alimentação

se aproxime de um alimento ideal fornecendo todos os nutrientes necessários ao ser humano.

5. Conclusões

Utilizando a técnica de ICP OES, após a otimização das condições robustas do equipamento, foi possível obter recuperações quantitativas dos elementos investigados, nas concentrações estudadas. Com os limites de quantificação obtidos é possível a determinação de Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn nas amostras de nutrição enteral.

As espécies contaminantes Pb, Cd, Hg e Se não puderam ser quantificadas pelo método, pois não atingiram o LOQ necessário.

A análise de amostras de nutrição enteral por GFAAS utilizando CFA-C só foi possível com uma diluição da amostra de 25 vezes, possibilitando apenas a determinação de Al. Em fatores de diluição menores que 25 vezes ocorreu a formação de grande quantidade de resíduo carbonáceo no forno de grafite, que não era eliminado com a temperatura de limpeza do programa de aquecimento.

A análise de diferentes amostras de nutrição enteral, provenientes de diferentes fabricantes, mostrou que a quantidade de alumínio independe da forma de estocagem, sugerindo que a presença do elemento está relacionada ao processo de fabricação ou à matéria-prima empregada.

O método desenvolvido para a análise das amostras tratadas por radiação micro-ondas permite a quantificação de Cd e Pb por GF AAS. Os estudos de exatidão, nos testes de adição e recuperação dos analitos, mostraram recuperação quantitativa dos mesmos.

O estudo de bioacessibilidade realizado pelo método *in-vitro* mostrou que as espécies metálicas nesse tipo de alimento tem uma absorção tem uma alta absorção de acordo com as características desses tipos de alimentos.

6. Tratamento dos resíduos gerados

As soluções de amostras enriquecidas e os resíduos das soluções-padrão foram estocados em galões de polipropileno para que o tratamento e o descarte fossem feitos de uma única vez, ao término deste trabalho.

O procedimento utilizado é adotado em nosso laboratório (GEAtom) para tratar resíduos aquosos que contêm vários elementos metálicos e consiste em separá-los da fase aquosa, por precipitação controlada. Os resíduos foram neutralizados com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e o pH foi mantido entre 7 – 8, até ocorrer à precipitação completa das espécies que formam hidróxidos nesta faixa de pH (Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn). Os sais precipitados foram separados da fase aquosa por filtração comum, empregando-se papel de filtro qualitativo.

A solução resultante foi acondicionada em pH 7, aproximadamente, com o auxílio de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ e a ela se adicionou uma solução de Na₂S (78 g L⁻¹). Nesta etapa, foram precipitados arsênio e selênio, na forma de sulfetos e que, por filtração, também foram retirados da fase aquosa. Por fim, os resíduos sólidos obtidos foram mantidos nos respectivos papéis de filtro e enviados para o depósito de resíduos sólidos do Instituto de Química da UNICAMP. A solução residual, contendo Na₂S foi tratada com solução de NaOCl (5,25 % m/m) para eliminar o sulfeto na forma de H₂S, que é volátil.

7. Referências

- [1] Gopalan, S. and Khanna, S., “Enteral nutrition delivery technique”, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**, 2003, 313 – 317.
- [2] Marchini, J. S., Okano, N., Cupo, P., Passos, N. M. R. R. S, Sakamoto, L. M. and Basile-Filho, A., “Nutrição parenteral total – princípios gerais, formulários de prescrição e monitorização”, *Medicina, Ribeirão Preto*, **31**, 1998, 62-72.
- [3] Gauderer, M. W., Ponsky, J. L. and Izant, R.J. Jr., “Gastrostomy without laparotomy: a percutaneous endoscopic technique”, *J. Pediatr. Surg.*,**15**, 1980, 872-875.
- [4] Daveluy, W., Guimber, D., Mention, K., Lescut, D., Michaud, L., Turck, D. and Gottrand, F., “Home enteral nutrition in children: an 11-year experience with 416 patients”, *Clin. Nutr.*, **24**, 2005, 48 – 54.
- [5] Crosby, J. and Dueerksen, D., “A retrospective survey of tube-related complications in patients receiving long-term home enteral nutrition”, *Digest. Dis. Sci.*, **50** , 2005, 1712 – 1717.
- [6] Portaria da ANVISA nº 337, de 14 de abril de 1999.
- [7] Documento pdf, acessado em 24/10/2011
http://npo.weebly.com/uploads/5/4/9/7/5497855/enteral_formula_gastro_newsletter.pdf
- [8] http://pt.wikipedia.org/wiki/Nutri%C3%A7%C3%A3o_enteral, acessado em 25/10/2011.
- [9] Dietitian’s Handbook of Enteral and Parenteral Nutrition, Annalynn Skipper, Second Edition, An Aspen Publication, 1998.
- ¹⁰ www.hc.unicamp.br/servicos/emtn/Manual_paciente.pdf, acessado em 25/10/2011.
- [11] Braga, J. M., Hunt, A., Pope, J. and Molaison, E., “Implementation of Dietitian Recommendations for Enteral Nutrition Results in Improved Outcomes”, *J. Am. Diet. Assoc.*, **106 (2)**, 2006, 281 – 284.
- [12] Finck, C., “ Enteral versus parenteral nutrition in the critically ill”, *Nutrition*, **16 (5)**, 2000, 393 – 394.
- [13] Borlase, B.C., Bell, S.J., Blackburn, G. L., and Forse, R. A., Enteral Nutrition, Chapman and Hall series in clinical nutrition, New York, 1994.
- [14] Leung, F. Y., “Trace-elements in parenteral micronutrition”, *Clin. Biochem.*, **28 (6)**, 1995, 561-566.

-
- [15] Bunker, V. W. and Clayton, E. B., "Trace element content of commercial enteral feeds", *Lancet*, **20**, 1983, 426 – 428.
- [16] Portaria da ANVISA n^o 33, de 13 de janeiro de 1998.
- [17] Seiler, H. G. and Sigel, H. Handbook on toxicity of inorganic compounds. Ed. Marcel Dekker, New York, 1988.
- [18] Simão, A. M., Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico. Ed. Nobel, 2^a ed. São Paulo, 1989.
- [19] Decreto da ANVISA no 55.871 de 26 de março de 1965.
- [20] Newberne, P. M., "Trace Substances and Health", Pt. 1, Marcel Dekker, Inc., New York, 1976.
- [21] Hodgson, E., "A textbook of modern toxicology", John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey., 2004.
- [22] Leung, F. Y., "Trace-elements in parenteral micronutrition", *Clin. Biochem.*, **28 (6)**, 1995, 561-566.
- [23] Nelson, J.L. and Wesley Alexander, J., "Multi-trace-element supplementation in enteral formulas for burned guinea-pigs", *Nutrition*, **7 (4)**, 1991, 275 – 279.
- [24] Papageorgiou, T., Zacharoulis, D., Xenos, D., and Androulakis, G., "Determination of trace elements (Cu, Zn, Mn, Pb) and magnesium by atomic absorption in patients receiving total parenteral nutrition", *Nutrition*, **18 (32)**, 2002, 32 –34.
- [25] Almeida, A. A., Jun, X. and Lima, J. L F. C., "High-performance liquid chromatographic determination of trace amounts of transition metals in parenteral solutions", *Analyst*, **123**, 1998, 1283 – 1287.
- [26] Bohrer, D., Nascimento, P. C., Becker, E. Carvalho, L. M. and Dessuy, M., "Arsenic species in solutions for parenteral nutrition", *J. Parenter. Enter. Nutr.*, **29 (1)**, 2005, 1-7.
- [27] Wuilloud, G. M., Wuilloud, J. C. A., Wuilloud, R. G., Silva, M. F., Olsina, R. A. and Martinez, L. D., "Cloud point extraction on vanadium in parenteral solutions using a nonionic surfactant (PONPE 5.0) and determination by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry", *Talanta*, **58**, 2002, 619 – 627.
- [28] Sombra, L. L., Luconi, M. O., Fernandez, L. P., Olsina, R. A., Silva. M. F. and Martinez L. D., "Assessment of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration - flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry", *Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 2003, 1451 – 1458.

-
- [29] Weaver, C. M, Martin, B. R., Ebner, J. S. and Krueger, C. A., "Oxalic acid decreases calcium absorption in rats", *J. Nutr.*, **117**,1903-1906, 1987.
- [30] Cozzolino, S. M. F. , Biodisponibilidade de nutrientes, 2^a edição, Ed. Manolo, São Paulo, 2007.
- [31] Arredondo, M., Martinez, R., Nunez, M. T., Ruz, M. and Olivares, M., "Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc", *Biol. Res.*, **39**, 2006, 95-102.
- [32] L'vov, B.V., "The analytical use of atomic absorption spectra", *Spectrochim. Acta, Part B*, **17**, 1961, 761-770.
- [33] Ewing, G. W., "Analytical Instrumentation Handbook". Marcel Dekker Inc., New York, 1990.
- [34] Massmann, H., " Comparison of atomic absorption and atomic fluorescence in graphite cells" , *Spectrochim. Acta, Part B*, **23**, 1968, 215-226.
- [35] Hodges, D.J., "Observations on direct determination of lead in complex matrices by carbon furnace atomic-absorption spectrophotometry", *Analyst*, **102**, 1977, 66-69.
- [36] L'vov, B.V., "Graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 924A-931A.
- [37] Ediger, R.D., "Atomic Absorption Analysis with the Graphite Furnace using Matrix Modification", *Atom. Absorpt. Newslett.*, **14**, 1975, 127-130.
- [38] Schlemmer, G. and Welz, B., "Palladium and magnesium nitrates a more universal modifier for graphite-furnace atomic-absorption spectrometry", *Spectrochim.Acta*, **41B**, 1986, 1157-1165.
- [39] Carnrick, G.; Schlemmer, G. and Slavin, W., "Matrix modifiers – their role and history for furnace AAS", *Am. Lab.*, **23**, 1991, 120-131.
- [40] Shuttler, I. L., Feuerstein, M. and Schlemmer, G., "Long-term stability of a mixed palladium–iridium trapping reagent for *in situ* hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer", *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **7**, 1992, 1299-1301.
- [41] Bulska, E. and Jedral, W., "Application of palladium-plating and rhodium-plating of the graphite-furnace in electrothermal atomic absorption spectrometry", *J. Anal. Atom. Spectrom.* **10**, 1995, 49-53.
- [42] Liu,P., Wei ,L., Matsumoto, K. and Fuwa,K., "Enhancement Effect of Palladium Addition in the Determination of Selenium in Organic-Matrix Solutions by Electrically Heated Carbon Furnace Atomic Absorption Spectrometry", *Anal. Sci.*,**1**,1985, 257-261.

-
- [43] Liu, Y. Gong, A. L. and Xu, T. L., "Evaluation of dithiocarbamates and beta-diketones as chelating agents in supercritical fluid extraction of Cd, Pb, and Hg from solid samples", *Talanta*, **43**, 1996, 985 – 989.
- [44] Tserovsky, E., Arpadjan, S. and Karadjova, I., "Chemical modification of volatile elements in organic-solvents and extracts by dithiocarbamate and complexes of noble metals in electrothermal atomic absorption spectroscopy", *Spectrochim. Acta Part B*, **47**, 1992, 959 – 970.
- [45] Tsalev, D. L., Slaveykova, V. I., "Comparative-study of ruthenium, rhodium and palladium as chemical modifiers in graphite-furnace atomic-absorption spectrometry", *Spectrosc. Lett.*, **25**, 1992, 221 – 238.
- [46] Thomaidis, N. S., Piperaki, E. A. and Siskos, P. A., "Comparison of 3 digestion methods for the determination of the aqua regia soluble content of lead, cadmium and chromium in sewage sludges by ETAAS", *Mikrochim. Acta*, **119**, 1995, 233 – 241.
- [47] Silva, J. B. B., Bertilia, M., Giacomelli, O., de Souza, I. G and Curtius, A. J., "Iridium and rhodium as permanent chemical modifiers for the determination of Ag, As, Bi, Cd, and Sb by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Microchem. J.*, **60**, 1988, 249-257.
- [48] Thomaidis, N. S., Piperaki, E. A, Polydorou, C. K, Efstathiou, C. E., "Determination of chromium by electrothermal atomic absorption spectrometry with various chemical modifiers", *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **11**, 1996, 31–36.
- [49] Bermejo-Barrera, P., Moredo-Pineiro, J., Bermejo-Barrera, A., "Comparative study on the use of Ir, W and Zr-coated graphite tubes for the determination of chromium in slurries of human scalp hair by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **360**, 1998, 712-716.
- [50] Piperaki, E. A., Thomaidis, N. S., Demis, I., "Platinum group metals as chemical modifiers for the determination of molybdenum by electrothermal atomic absorption spectrometry", *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **14**, 1999, 1901-1906
- [51] Lelis, K. L. A., Magalhães, C. G., Rocha, C. A., da Silva, J.B.B., "Direct determination of Cr and Cu in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using ruthenium as permanent modifier (R1)", *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 2002, 1301-1305.
- [52] Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. Principles of Instrumental Analysis. 5th ed., Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia, 1998.

-
- [53] Boss, C. B. and Fremdem, K. J. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, 2nd edition., Perkin-Elmer Corp., USA, 1999.
- [54] Giné, M. F. Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente, série didática, vol. 3, CENA/USP, Piracicaba, 1998.
- [55] Corneau, L., Lavigne, C., Zee, J. A. and Desroisiers, T., "Effect of calcium and zinc concentrations and calcium source on in vitro calcium and zinc solubility in a fiber-fortified enteral formula", *Nutr. Res.*, **16**, 1996, 1659 -1699.
- [56] Mermet, J. M. "Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics", *Anal. Chim. Acta*, **250**, 1991, 85-94.
- [57] http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf, AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Acessado em 10/10/2011
- [58] Silva, J. C. J., Baccan, N., Nóbrega, J. A. "Evaluation of the analytical performance of an inductively coupled plasma optical emission spectrometry with dual view configuration", *Microchem. J.*, **77**, 2004, 185-190.
- [59] Brenner, I. B. and Zander, A. T. "Axially and radially viewed inductively coupled plasmas – a critical review". *Spectrochim. Acta Part B*, **55**, 2000, 1195-1240.
- [60] Kamogawa, M. Y., Nogueira, A. R. A., Costa, L. M., Garcia, E. E. and Nóbrega, J. A., "A new strategy for preparation of hair slurries using cryogenic grinding and water-soluble tertiary-amines medium", *Spectrochim. Acta, Part B*, **56**, 2001, 1973-1980.
- [61] Aleixo, P. C. and Nóbrega, J. A., "Direct determination of iron and selenium in bovine milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Food Chem.*, **83**, 2003, 457-462.
- [62] Vanhoe, H., Vanallemeersch, F. Van, Versieck, J. and Dams, R., "Effect of solvent type on the determination of total iodine in milk powder and human serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry", *Analyst*, **118**, 1993, 1015-1019.
- [63] Baydar, T., Aydin, A., Duru, S., Isimer, A. and Sahin, G., "Aluminium in enteral nutrition formulas and parenteral solutions", *J. Toxicol.: Clin. Toxicol.*, **35**, 1997, 277-301.
- [64] Amorim, F. R., Bof, C., Franco, M. B., Silva, J.B.B. and Nascentes, C. C., "Comparative study of conventional and multivariate methods for aluminum determination in soft drinks by graphite furnace atomic spectrometry", *Microchem. J.*, **82**, 2006, 168 – 173.

[65] Silva, J. C. J., “Determinação Direta de Constituintes Inorgânicos em Leite por ICP OES: Comparação Crítica do Desempenho Analítico em Configuração de Tocha Axial e Radial, Usando uma Mistura de Aminas Terciárias (CFA-C) como Solvente., Tese de Doutorado- Instituto de Química – Unicamp – 2004.

[66] Neto, B. B.; Scarminio, I. S. and Bruns, R. E., Como Fazer Experimentos–Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 2ª ed., Editora da Unicamp, Campinas (SP), 2003.

[67] “Nomenclature, Symbols, Units and their Usage in Spectrochemical Analysis - II. Data Interpretation”, *Pure & Appl. Chem.*, **45**,.1976, 99-103

[68] Joint FAO/WHO food standard programme codex committee on contaminants in foods, committee on contaminants in foods, Fifth Session, The Hague, The Netherlands, 2011,21 – 25.

[69] Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I. and Pérez-Gálvez, A., “*In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency”, *Nutr. Res.* **29**, 2006, 751-60.

[70] Miller, D. D., Schricker, B. R, Rasmussen, R. R. and Van Campen, D. , “An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals”, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 1981, 2284-2256.

[71] Luten, J., Crews, H., Flynn, A., Van Dael, P., Kastenmayer, P. Hurrell, R., Deelstra, H., Shen, L., Fairweather-Tait, S. , Hickson, K., Farré, R., Schlemmer, U. and Frøhlich, U., “Interlaboratory trial on the determination of the *in vitro* iron dialysability from food”, *J. Sci. Food Agric.*, **72**, 1996, 415-424.

[72] Minekus, M. L. M. and Havenaa, R. “Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model”, *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 1997, 99–106.

[73] Shiowatana, J., Kitthikhun, W., Sottimai,U., Promchan,J. and Kunajiraporn, K., “Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for *in vitro* estimation of mineral bioavailability of food”, *Talanta*, **68**, 2006, 549-557.

[74] Sandersona, P., McNultya, H., Mastroiacovoa, P., McDowella, I. F. W., Melse-Boonstra, A., Finglasa, P. M. and Illa, J. F. G., “Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report” , *Brit. J. Nutr.*, **90**,.2003, 473-479 .

[75] Garber, A. K., Binkley, N. C, Krueger, D. C. and Suttie, J. W. "Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects" , *J. Nutr.*, **129**, 1999, 1201-1203.

[76] Fairweather-Tait, S. J., Collings, R. and Hurst, R., "Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements", *Am. J. Clin. Nutr.*, **91**, 2010, 1484S-1491S.

[77] Harrington, M., Hotz, C., Zeder, C, Polvo, G. O., Villalpando, S, Zimmermann, M. B., Walczyk, T., Rivera, J. A. and Hurrell, R. F., "A comparison of the bioavailability of ferrous fumarate and ferrous sulfate in non-anemic Mexican women and children consuming a sweetened maize and milk drink", *Eur. J. Clin. Nutr.*, **65**, 2011, 20–25.

[78] Heymsfield, S.B., Roongpisuthipong, C., Evert, M., Casper, K., Heller, P. and Akrabawi, S. S., "Fiber supplementation of enteral formulas: effects on the bioavailability of major nutrients and gastrointestinal tolerance", *J. Parenter. Enteral Nutr.*, **12**, 1988, 265-273.