

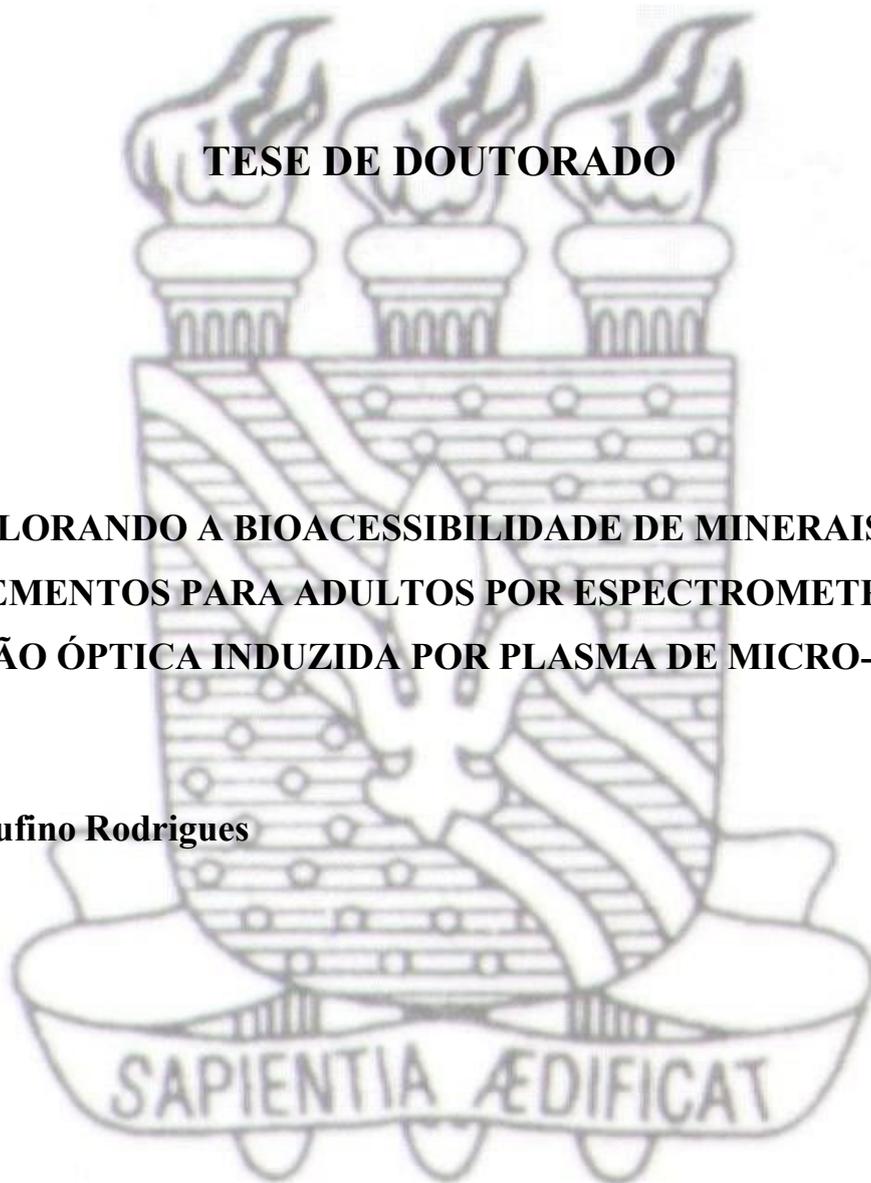


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## TESE DE DOUTORADO

EXPLORANDO A BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM  
SUPLEMENTOS PARA ADULTOS POR ESPECTROMETRIA DE  
EMIÇÃO ÓPTICA INDUZIDA POR PLASMA DE MICRO-ONDAS

Andreia Rufino Rodrigues



JOÃO PESSOA – PB – BRASIL

Junho 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## TESE DE DOUTORADO

EXPLORANDO A BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM  
SUPLEMENTOS PARA ADULTOS POR ESPECTROMETRIA DE  
EMIÇÃO ÓPTICA INDUZIDA POR PLASMA DE MICRO-ONDAS

**Andreia Rufino Rodrigues \***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Amália Geiza Gama Pessoa**

**\* Bolsista da Capes**

**JOÃO PESSOA – PB – BRASIL**

**Junho 2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

R696e Rodrigues, Andreia Rufino.

Explorando a bioacessibilidade de minerais em suplementos para adultos por espectrometria de emissão óptica induzida por plasma de micro-ondas / Andreia Rufino Rodrigues. - João Pessoa, 2024.

100 f. : il.

Orientação: Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima.

Coorientação: Amália Geiza Gama Pessoa.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. Teor total. 3. Bioacessibilidade. 4. Suplementação adulta. 5. Cálcio. 6. Ferro. 7. Magnésio. 8. Zinco. I. Lima, Ricardo Alexandre Cavalcanti de. II. Pessoa, Amália Geiza Gama. III. Título.

UFPB/BC

CDU 543(043)

# Explorando a bioacessibilidade de minerais em suplementos para adultos por espectrometria de emissão óptica induzida por plasma de micro-ondas.

Tese de Doutorado apresentada pela aluna Andreia Rufino Rodrigues e aprovada pela banca examinadora em 28 de junho de 2024.

Documento assinado digitalmente  
 **RICARDO ALEXANDRE CAVALCANTI DE LIMA**  
Data: 03/07/2024 18:44:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima  
DQ/UFPB  
Orientador/Presidente

Documento assinado digitalmente  
 **AMALIA GEIZA GAMA PESSOA**  
Data: 09/07/2024 07:21:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Amália Geiza Gama Pessoa  
CBIOTEC/UFPB  
Co-Orientadora

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIANE BRITO OLIVEIRA**  
Data: 04/07/2024 11:04:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luciane Brito Oliveira  
IF BAIANO/Catu-BA  
Examinadora

Documento assinado digitalmente  
 **FRANCISCO ANTONIO DA SILVA CUNHA**  
Data: 03/07/2024 18:58:25-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Antonio da Silva Cunha  
UFBA/Salvador-BA  
Examinador

Documento assinado digitalmente  
 **LILIANA DE FATIMA BEZERRA LIRA DE PONTES**  
Data: 05/07/2024 17:03:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes  
DQ/UFPB  
Examinadora

Documento assinado digitalmente  
 **KATIA MESSIAS BICHINHO**  
Data: 08/07/2024 18:57:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho  
DQ/UFPB  
Examinadora

# DEDICATÓRIA

---

*Com amor, dedico esta obra ao meu amado pai (em memória), cujo legado de enfrentar as dificuldades com bom ânimo e coragem continua a inspirar-me diariamente. Sua partida me ensinou que o amor transcende os limites da vida terrena, perdurando para além da morte*

*Ao meu amado Ruan Di Lucca, luz da minha vida, ao meu esposo, a minha mãe e a todos que se dedicaram a este trabalho.*

*Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante*

*O Pequeno Príncipe, Antoine de Saint-Exupéry*

# AGRADECIMENTOS

---

Ao Deus da vida, por me capacitar e auxiliar todos os meus passos nesse caminho, que foi cheio de obstáculos e que o Senhor me capacitou para administrar e conseguir ultrapassar todos eles.

Ao meu filho Ruan, por existir e iluminar meus dias com seu sorriso radiante, por ser a razão pela qual enfrento cada desafio com determinação e amor inabalável. Você é minha fonte de inspiração constante, meu maior presente nesta jornada da vida. Suas risadas são melodias que embalam meu coração, sua presença é o abrigo seguro em meio às tormentas. Agradeço por ser a luz que guia meus passos, por ser a essência que preenche meu ser com alegria e esperança. Você é o meu maior tesouro, e por você, eu enfrento cada batalha com coragem e gratidão. Que nosso vínculo seja eterno, pois você é o motivo mais nobre e precioso da minha existência.

Ao meu amado esposo Arley Filgueiras por ser tudo que precisasse que fosse, por me apoiar e ajudar todos os dias em todas as etapas deste doutorado.

Aos meus pais, Dona Graça e Dedé de Raimundo Julião, expresso minha mais profunda gratidão. Por cada ensinamento que moldou o meu caráter e guiou os meus passos.

A minha querida irmã Andreza Rufino que me ajudou muito nesse tempo todo, cuidando da minha criança e fazendo minha ausência ser despercebida por ele.

A minha sogra Vânia que sempre esteve presente e por toda ajuda prestada em todas as etapas.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Alexandre por me apoiar, por me aceitar e por me estimular em todos os passos, por tirar as dúvidas, por me orientar e por todo apoio prestado em todas as etapas.

A minha coorientadora Amália por também sanar todas as dúvidas e questionamentos, por buscar sempre o melhor, por se dedicar a este trabalho e por todo apoio prestado em todas as etapas.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à banca examinadora. Agradeço profundamente pela disponibilidade e pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho. O enriquecedor feedback e as críticas construtivas de cada um de vocês foram fundamentais para o aprimoramento deste estudo.

A amiga Flaviana por toda ajuda prestada sempre que a procurei em busca de auxílio.

Aos amigos laqueanos Lucas, Andréa Coelho, Flaviano pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Kelly, Ruth, Rossana, Suelly, Luciano e Dani por tornarem essa jornada mais fácil.

Ao Dr. Manoel Barbosa Dantas e Dr. Anderson Simões por acreditarem e verem meu potencial, quando eu mesma não via. Pelas palavras de incentivo desde a graduação que me fizeram acreditar que eu conseguiria enfrentar esse desafio.

Agradeço a todos os meus colegas laqueanos pela convivência de todos os dias. A todos meus colegas que dividiram conhecimento comigo durante todas as aulas que foram realizadas.

A todos os professores do PPGQ, por todo conhecimento transmitido. Cada ensinamento recebido foi um pilar fundamental na construção do meu percurso acadêmico e profissional.

À UFPB, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade de ingresso nesta instituição renomada. É um privilégio fazer parte da comunidade acadêmica, onde pude crescer e expandir meus horizontes acadêmicos e pessoais.

Ao PPGQ, pela oportunidade de integração ao programa.

À CAPES, sou imensamente grata pela concessão de bolsa de pesquisa, que viabilizou a realização deste estudo. Sua iniciativa de investir no desenvolvimento científico e na formação de pesquisadores é essencial para o avanço do conhecimento e o progresso da sociedade.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento. Seja com apoio moral, assistência técnica ou incentivo financeiro, cada contribuição foi fundamental para alcançar este objetivo.

Muito obrigada!

# SUMÁRIO

---

INTRODUÇÃO.....	18
Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
1.1 Suplementação alimentar.....	21
1.2 Minerais .....	22
1.2.1. Cálcio.....	23
1.2.2 Magnésio .....	24
1.2.3 Ferro .....	25
1.2.4 Zinco.....	27
1.3 Avaliação nutricional dos alimentos.....	28
1.4 Digestão humana e absorção dos nutrientes .....	29
1.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais .....	31
1.5.1 Procedimentos <i>in vitro</i> para a avaliação da bioacessibilidade .....	33
1.6. Técnicas analíticas na determinação de elementos.....	44
1.6.1 Espectrometria de absorção atômica por chama.....	45
1.6.2 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Microondas .....	45
Capítulo 2: OBJETIVOS .....	50
2.1. OBJETIVO GERAL .....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
Capítulo 3: EXPERIMENTAL.....	52
3.1. Reagentes e Soluções.....	52
3.2 Materiais e equipamentos .....	53
3.3 Amostras.....	55
3.3.1 Pré-tratamento para o preparo das amostras .....	56
3.3.2 Otimização do procedimento de preparo de amostra utilizando uma chapa de aquecimento.....	57
3.4 Preparo de amostra para quantificação da concentração total de Ca, Fe, Mg e Zn ..	57
3.5 Otimização do MIP OES .....	58
3.6 Procedimento Analítico para determinação do teor total de Fe, Ca, Mg e Zn.....	59
3.7 Avaliação da Bioacessibilidade .....	59
3.7.1 Procedimento de extração do teor bioacessível das amostras utilizando método <i>in vitro</i> SBET.....	59
3.7.2 Procedimento de extração do teor bioacessível das amostras utilizando método <i>in vitro</i> PBET .....	62

3.8 Parâmetros de Desempenho.....	64
Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	67
4.1 Avaliação do procedimento de preparo de amostra para determinação do teor total de cálcio e ferro .....	67
4.2 Otimização do MIP OES .....	69
4.3. Validação da metodologia empregada.....	70
4.3.1 Curvas Analíticas.....	70
4.3.2 Exatidão .....	74
4.3.3 Precisão.....	76
4.3.4 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) .....	77
4.3.5 Teste de adição e recuperação .....	78
4.4 Quantificação dos teores totais dos analitos por MIP OES .....	79
4.5 Determinação da bioacessibilidade dos analitos.....	82
4.5.1 Determinação da bioacessibilidade usando o SBET.....	82
4.5.2 Determinação da bioacessibilidade usando o PBET.....	85
4.6 Comparação dos métodos SBET e PBET.....	87
4.7 Contribuição do consumo de CLF e FNEO para a recomendação dose diária.....	88
CONCLUSÕES .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** – Analysis of variance (análise de variância)

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CRM**- Material de referência certificado

**CLF**- Composto lácteo fortificado

**ET-AAS**- Electrothermal atomic absorption spectrometry (Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica)

**FAAS**- Flame atomic absorption spectrometry (Espectrometria de absorção atômica chama)

**FNEO**- Formula de Nutrição enteral e oral

**GF-AAS** – Graphite furnace atomic absorption spectrometry (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)

**HPLC** – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta Eficiência)

**ICP-MS** – Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)

**ICP OES** – Inductively coupled plasma optical emission emission spectroscopy (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)

**IDR** - Ingestão diária recomendada

**MIP OES** – Espectrometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas

**MP-AES** - do inglês *Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometer*

**IUPAC** - International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

**LOD** – Limit of detection (limite de detecção)

**LOQ** – Limit of quantitation (limite de quantificação)

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**NIST** - National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)

**SBET** - *Simple Bioaccessibility Extraction Test* (Teste simples de extração da bioacessibilidade)

**PBET**- *Physiological Based Extraction Test* (Teste de extração com base fisiológica)

**PTFE**- Politetrafluoretileno

**PVC**-Policloroeteno

**UBM** - *Unified Bioaccessibility Method* (Método Unificado de Bioacessibilidade)

**WHO** - Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization)

# LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1** - Estrutura química do ferro heme

**Figura 2** - Processo de bioacessibilidade e biodisponibilidade

**Figura 3** - Representação esquemática do procedimento otimizado para determinação *in vitro* da bioacessibilidade do Fe na carne de frango.

**Figura 4** - Diagrama esquemático do funcionamento do MP AES

**Figura 5** - Equipamento MPAES usado para quantificar os elementos estudados.

**Figura 6** - Aspectos finais da etapa digestão do material de referência em diferentes condições de estudo.

**Figura 7** - Diagrama esquemático do procedimento SBET aplicado

**Figura 8** - Incubadora *shaker* usada para simulação do SBET

**Figura 9** - Diagrama esquemático do procedimento PBET aplicado

**Figura 10** - Aspectos finais da etapa digestão do material de referência em diferentes condições de estudo

**Figura 11** - Curvas analíticas para quantificação dos analitos obtidos através do MIP OES

**Figura 12** - Gráfico das análises de resíduo deixadas pelos modelos obtidos através do MIP OES

# LISTA DE TABELAS

---

**Tabela 1** - Ingestão diária recomendada pela Anvisa dos principais minerais para adultos

**Tabela 2** - Diferentes procedimentos de extração *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade em alimentos descritos na Literatura

**Tabela 3** - Condições operacionais empregadas nas análises de suplementação adulta por MIP OES.

**Tabela 4** - Amostras estudadas

**Tabela 5** - Experimentos de digestão da amostra avaliados

**Tabela 6** – Recuperação do CRM nas condições de preparo de amostra avaliados.

**Tabela 7** - Comprimentos de ondas e condições operacionais otimizadas empregadas nas análises de suplementação adulta.

**Tabela 8** - Teste ANOVA para as curvas de Ca, Fe, Mg e Zn

**Tabela 9** - Comparação do teor de Ca, Fe, Mg e Zn em  $\text{mg Kg}^{-1}$  determinados por MIP OES, para o material de referência NIST 1547 ( $n = 3$ ).

**Tabela 10** - Avaliação da exatidão para o procedimento SBET

**Tabela 11** - Teste de repetitividade na amostra 1 para determinações por MIP OES ( $n=10$ )

**Tabela 12** - Valores de LOQ e LOD para procedimento realizado para determinação dos analitos por MIP OES.

**Tabela 13** - Recuperações de Ca, Fe, Mg e Zn (em porcentagem, %) adicionadas a amostra de suplementos previamente a digestão ácida (média  $\pm$  desvio padrão;  $n = 3$ ).

**Tabela 14** - Resultados determinados nas amostras analisadas por MIP OES (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ) e valor descrito no rótulo dos alimentos

**Tabela 15** - Teor bioacessível (%) quantificado nas amostras analisadas por meio do SBET

**Tabela 16** - Teor bioacessível (%) quantificado nas amostras analisadas por meio do PBET

**Tabela 17** - Contribuição dos elementos ao IDR nas amostras considerando o teor total

**Tabela 18** - Contribuição dos elementos ao IDR nas amostras considerando bioacessível.

## RESUMO

---

Ao longo da vida, o ser humano passa por diferentes fases que vão da infância ao envelhecimento. Infelizmente, na velhice, o corpo humano começa a enfrentar algumas limitações na absorção de nutrientes importantes para a manutenção da qualidade de vida. Por esse motivo, existem diversas fórmulas e suplementos disponíveis no mercado que visam suprir essas deficiências minerais para o público idoso. Estudar os teores totais de minerais essenciais é importante, porém com esses valores não se pode ter informações realmente adequadas sobre seu valor nutritivo. A bioacessibilidade e a biodisponibilidade são conceitos-chave que nos garante informações mais precisas sobre esses valores. Neste trabalho, é quantificado cálcio, ferro, magnésio e zinco em amostras de suplementação adulta, baseados em compostos lácteos fortificados (CLF) e fórmulas modificadas de nutrição enteral e oral (FNEO) para adultos. As amostras utilizadas neste trabalho foram digeridas com ácido nítrico e peróxido de oxigênio para quantificar os teores totais de Ca, Fe, Mg e Zn. A eficiência do procedimento de decomposição ácida foi avaliada por meio de um teste de exatidão, utilizando a amostra certificada NIST 1547, que apresentou percentuais de recuperação de 97% para Ca, 95% para Fe, 101% para Mg e 90% para Zn. Para avaliar a bioacessibilidade foram realizados dois procedimentos de extração utilizando o método *in vitro* SBET (*Simple Bioaccessibility Extraction Test*) e o método *in vitro* PBET (*Physiological Based Extraction Test*). As faixas de bioacessibilidade, em %, para Ca foram de 14 a 62%, para Fe de 23 a 65%, para Mg de 21 a 46% e de 33 a 64 % para Zn resultados obtidos com o método SBET e de 17 a 38% para Ca, 27 a 41 para Fe, 15 a 35% para Mg e de 25 a 47 % para Zn quando o PBET foi aplicado às amostras. Observa-se que o PBET apresentou uma maior porcentagem de extração em relação aos elementos traço, enquanto o SBET extraiu predominantemente magnésio e cálcio. A partir dos resultados, foi possível concluir que a avaliação da bioacessibilidade se torna importante para avaliar o teor nutritivo de suplementação adulta, visto que os teores rotulados nem sempre estão acessíveis ao organismo. Portanto, considerar as condições gástricas simuladas fornece valores reais de absorção dos minerais pelo corpo humano.

Palavras-chave: Teor total. Bioacessibilidade. Suplementação adulta. Cálcio. Ferro. Magnésio. Zinco.

## ABSTRACT

---

Throughout life, humans go through different stages ranging from childhood to aging; unfortunately, in old age, the human body begins to face some limitations in the absorption of important nutrients for maintaining quality of life. For this reason, there are various formulas and supplements available on the market aimed at addressing these mineral deficiencies in the elderly population. Studying the total levels of essential minerals is important, but these values alone cannot provide truly adequate information about their nutritional value. Bioaccessibility and bioavailability are key concepts that provide us with more precise information about these values. In this study, calcium, iron, magnesium, and zinc were quantified in adult supplementation samples, based on fortified dairy compounds (CLF) and modified formulas for enteral and oral nutrition (FNEO) for adults. The samples used in this study were digested with nitric acid and hydrogen peroxide to quantify the total levels of Ca, Fe, Mg, and Zn. The efficiency of the acid decomposition procedure was evaluated through an accuracy test using the certified NIST 1547 sample, which showed recovery percentages of 97% for Ca, 95% for Fe, 101% for Mg, and 90% for Zn. To evaluate bioaccessibility, two extraction procedures were performed using the *in vitro* SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test) method and the *in vitro* PBET (Physiological Based Extraction Test) method. The bioaccessibility ranges, in %, for Ca were from 14 to 62%, for Fe from 23 to 65%, for Mg from 21 to 46%, and from 33 to 64% for Zn, results obtained with the SBET method, and from 17 to 38% for Ca, 27 to 41 for Fe, 15 to 35% for Mg, and from 25 to 47% for Zn when the PBET method was applied to the samples. It is observed that PBET showed a higher percentage of extraction in relation to trace elements, while SBET predominantly extracted magnesium and calcium. From the results, it was possible to conclude that the evaluation of bioaccessibility becomes important for assessing the nutritional content of adult supplementation, since labeled levels are not always accessible to the body; therefore, considering simulated gastric conditions provides real values of mineral absorption by the human body.

Keywords: Total level. Bioaccessibility. Adult supplementation. Calcium. Iron. Magnesium. Zinc.

# INTRODUÇÃO

---

A nutrição adequada desempenha um papel fundamental na promoção da saúde e na prevenção de doenças. A falta de uma dieta equilibrada pode levar a deficiências nutricionais, doenças crônicas e outras condições prejudiciais à saúde, como destacado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003). Para atender às necessidades aumentadas de nutrientes, especialmente em casos de deficiências na ingestão diária ou em condições de saúde específicas, são utilizados suplementos nutricionais que contêm altos níveis de vitaminas e minerais (IACONE et al., 2016). Além disso, para pacientes que não podem consumir alimentos oralmente, as fórmulas de nutrição enteral e oral (FNEO) e compostos lácteos fortificados (CLF) oferecem alternativas que evitam técnicas mais invasivas, como a nutrição parenteral (ITURBIDE-CASAS et al., 2019).

A determinação do valor nutricional dos alimentos vai além da análise dos teores totais de nutrientes, requerendo também a compreensão da biodisponibilidade e bioacessibilidade destes elementos, que são essenciais para uma avaliação precisa do impacto dos alimentos na saúde humana (COZZOLINO, 1997; 2009; FAIRWEATHER-TAIT e de SESMAISONS, 2018). A bioacessibilidade de nutrientes é definida como a fração do nutriente que é liberada no trato gastrointestinal, mas que não é necessariamente biodisponível. A determinação do teor bioacessível geralmente é avaliada através de procedimentos *in vitro* que simulam a digestão gástrica que ocorre no estômago (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; FIORAVANTI e MORGANO 2021).

Os métodos de extração *in vitro* simulam as condições gastrointestinais (temperatura, agitação, pH, tensão superficial, enzimas, etc.), e envolvem três áreas distintas do sistema digestivo humano: boca, estômago e intestino. No lugar da saliva e dos sucos gástricos e duodenal naturais, são usadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos, principalmente a ação enzimática que ocorre na boca, no estômago e no intestino, e condições de temperatura e pH. Após esta simulação, a solução resultante é destinada à quantificação do nutriente de interesse, permitindo avaliar a sua bioacessibilidade (AGUDELO et al., 2017). Já, a biodisponibilidade é a fração de um nutriente que é absorvida e pode atender às demandas

fisiológicas dos tecidos-alvo. Este estudo aborda a absorção dos nutrientes pelas células epiteliais intestinais, crucial para a entrega desses nutrientes aos tecidos-alvo e sua utilização fisiológica (COZZOLINO, 2005).

A determinação da biodisponibilidade e bioacessibilidade são procedimentos trabalhosos e, muitas vezes, podem ser dificultados por processos complexos que compreendem a digestão. Experimentos precisos *in vivo* no homem, ou em animais, podem proporcionar uma melhor informação sobre a biodisponibilidade de compostos ingeridos (VERSANTVOORT *et al.*, 2005). Contudo, a técnica *in vitro* é eleita sobre estudos *in vivo*, pois reduz a necessidade de animais e simplifica os procedimentos executados nos testes *in vivo*, sendo mais reprodutível, permitindo que o procedimento possa ser padronizado. Atualmente, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade tornaram-se conceitos chave para se avaliar a eficiência nutricional dos alimentos (FIORAVANTI e MORGANO, 2021).

Apesar da importância dos minerais na dieta, eles não são sempre bioacessíveis, e fatores extrínsecos e intrínsecos devem ser considerados no processo de absorção (GONÇALVES, et al., 2020). A avaliação adequada do teor nutritivo de suplementações adultas se torna importante, visto que o público a quem se destina precisa alcançar a ingestão suficiente de minerais necessários a um bom desempenho de seu organismo. O principal objetivo deste estudo é avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de Ca, Fe, Mg e Zn usando os testes *in vitro* SBET e PBET em amostras de suplementação adulta por espectrometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Essa análise detalhada visa fornecer insights valiosos para a formulação e consumo de suplementos que otimizem a absorção desses minerais essenciais, promovendo assim a saúde e o bem-estar do público-alvo.

# Capítulo 1

---

## Revisão da Literatura

# REVISÃO DE LITERATURA

---

## 1.1 Suplementação alimentar

O envelhecimento humano acarreta uma série de alterações anatômicas e funcionais que impactam a saúde e a nutrição dos idosos. A alimentação desempenha um papel crucial na manutenção da saúde ao longo da vida, especialmente na velhice, afetando diretamente a qualidade de vida. Considerando as mudanças nas funções orgânicas enfrentadas pelo organismo nesse período, os suplementos alimentares específicos se tornam aliados importantes para melhorar a qualidade de vida (SILVER, 2009), garantindo a adequada ingestão de macro e micronutrientes. A diversidade de sabores disponíveis facilita o consumo, proporcionando alternativas que se adaptam tanto a pratos salgados quanto doces, prevenindo carências nutricionais e complicações decorrentes do envelhecimento (OLIVEIRA et al., 2016; LOPES et al., 2015; CORREIA et al., 2017; FERREIRA et al., 2002).

Em cada fase da vida o corpo humano requer quantidades específicas de nutrientes para seu desenvolvimento e manutenção. Para orientar essas necessidades, existe o Índice de Ingestão Recomendada (IDR), que considera a faixa etária, visto que crianças e adultos têm demandas nutricionais distintas. Nos idosos, as condições de saúde e o uso de medicamentos podem impactar a absorção de nutrientes, muitas vezes reduzindo sua biodisponibilidade (COZZOLINO, 2007)

Segundo a Anvisa, os minerais indicados para a ingestão diária para adultos estão expostos na **Tabela 1**. Pode ser observado que o cálcio é o mineral recomendado em maior quantidade devido a este ser responsável pela construção e manutenção de toda a estrutura óssea, além de ser bastante essencial para a contração muscular e transmissão dos impulsos nervosos (AZEVEDO, 2018).

**Tabela 1** - Ingestão diária recomendada pela Anvisa dos principais minerais para adultos

<b>Nutriente</b>	<b>Valor recomendado</b>
Cálcio	1000 mg
Ferro	14 mg
Magnésio	260 mg
Zinco	7 mg
Fósforo	700 mg
Selênio	34 µg
Manganês	2,3 mg

Fonte: Anvisa, 2005

A adoção desses valores visa garantir que os indivíduos ingiram uma quantidade significativa dos nutrientes necessários a uma vida saudável. Estes índices ajudam a evitar a ingestão inadequada de nutrientes e reduzir os riscos de problemas de saúde garantindo a manutenção adequada do organismo.

Na Resolução 269 da ANVISA (2005), há uma única referência à biodisponibilidade, especificamente para o ferro. Esta resolução indica uma ingestão diária recomendada de 14 mg para adultos, dos quais apenas 10% devem ser biodisponíveis. No entanto, não é possível verificar se essa recomendação está sendo seguida, uma vez que os rótulos dos alimentos não fornecem essa informação sobre o teor de biodisponibilidade.

## **1.2 Minerais**

Os alimentos que ingerimos diariamente são compostos de várias substâncias químicas, entre elas algumas que são necessárias para o bom funcionamento do organismo, os chamados nutrientes. Há nutrientes necessários em grandes quantidades, como os carboidratos, as proteínas e os lipídios, e nutrientes necessários em quantidades menores, como as vitaminas e os minerais. Os minerais podem ser classificados como macrominerais e microminerais. Os macrominerais são aqueles que o organismo humano

necessita em maiores quantidades para ter um bom funcionamento, nesse grupo estão o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), e os microminerais, embora sejam requeridos em pequenas quantidades, são tão importantes quanto os macrominerais e fazem parte desse grupo o ferro ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e o zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Esses minerais desempenham funções diversas e específicas no organismo humano, compondo proteínas e enzimas, atuando na manutenção dos mecanismos de defesa (sistema imunológico) prevenindo doenças como anemia e osteoporose e formando tecidos (SILVA, et. al, 2015; GHARIBZAHEDI & JAFARI 2017). A seguir são detalhadas as principais características e funções dos minerais investigados nesse trabalho.

### **1.2.1. Cálcio**

O cálcio é um macromineral bastante importante na manutenção do corpo humano que desempenha diferentes funções no organismo. Ele está presente principalmente na estrutura óssea, participa dos processos de coagulação sanguínea, comunicação intracelular e contração da musculatura, interfere na liberação dos neurotransmissores nas ligações sinápticas e participa como cofator de reações enzimáticas (ETCHEVERRY, GRUSAK, FLEIGE, 2012; QUINTAES & DIEZ-GARCIA, 2015). Se torna ainda mais importante sua ingestão adequada nos primeiros anos de vida, na gravidez ele tem seu papel aumentado já que ele é indispensável nessa fase, participando da formação de toda a estrutura óssea do feto.

As principais fontes desse mineral são o leite e seus derivados, alguns tipos de peixe como a sardinha e o salmão, folhas verdes como a couve, folhas de mostarda e brócolis, além de algumas sementes e legumes (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011). Sua bioacessibilidade pode variar dependendo de fatores como o tipo de alimento, seu processamento e a presença de outros nutrientes, devido à sua interação complexa com os componentes alimentares. Por exemplo, o cálcio encontrado em vegetais de folhas verdes pode ter sua absorção prejudicada devido à presença de compostos como oxalatos, que reduzem sua disponibilidade para absorção no intestino. Por outro lado, certos nutrientes, como a vitamina D, tem como características aumentar a absorção de cálcio no organismo (LICHTENSTEIN et al., 2013).

Sabendo de sua importância na manutenção da saúde, especialmente da estrutura óssea, e estando relatado na literatura que sua absorção é dificultada diretamente da dieta devido à precipitação de sais de cálcio insolúveis que são formados em um ambiente

básico como intestino, o estudo de sua acessibilidade no organismo se torna de grande importância (JIN, FU, & MA, 2011). Existem interesses no estudo de suplementação de cálcio em alimentos que possam ser absorvidos, de forma eficaz, já que sua carência pode acarretar diversos problemas, tais como: falta de memória, câimbras, fraqueza dos ossos etc. (PENG, 2016). A ingestão adequada de cálcio nas faixas de maior necessidade previne doenças como: osteoporose, hipertensão arterial, obesidade e câncer de cólon (PEREIRA et al., 2009).

### **1.2.2 Magnésio**

O magnésio está envolvido em uma ampla variedade de reações biológicas fundamentais. O íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) é essencial como co-fator em uma ampla gama de enzimas, desempenhando um papel vital no metabolismo de nutrientes e na síntese de diversas moléculas fundamentais. Suas funções abrangem desde a síntese de ácidos graxos e proteínas até a fosforilação da glicose e suas derivações na via glicolítica, além das atividades da transcetolase. Além disso, o magnésio desempenha um papel significativo na regulação da transmissão neuromuscular, operando em coordenação e antagonismo com os efeitos do cálcio, dependendo do sistema em questão. Em situações de contração muscular normal, o cálcio age como um agente estimulante, enquanto o magnésio atua como um agente relaxante. Uma ingestão elevada de magnésio está correlacionada com o aumento da densidade óssea (PASTERNAK et al. 2010).

O magnésio é encontrado em diversos alimentos, e uma dieta regular geralmente oferece as quantidades necessárias desse elemento. Sementes, nozes, leguminosas e cereais integrais moídos, juntamente com vegetais de folhas verde-escuras, são excelentes fontes de magnésio, já que esse mineral desempenha um papel crucial na composição da clorofila (COELHO et al., 2011). Existem fatores que dificultam a absorção do magnésio, como a presença na dieta de alimentos ricos em fitatos, oxalatos, fosfatos e fibras alimentares. Por outro lado, alguns elementos, como os carboidratos, especialmente a lactose, podem facilitar essa absorção. A ingestão proteica abaixo de 30 g/dia pode reduzir a absorção de magnésio. Além disso, certos fatores dietéticos, como o alto teor de sódio, cálcio, cafeína e álcool, também podem aumentar a excreção renal desse mineral (MARTIN; GONZALEZ; SLATOPOLSKY, 2009; NAITHANI; BHARADWAJI; DARBARI, 2014).

Baixos níveis de magnésio foram associados a uma série de doenças crônicas,

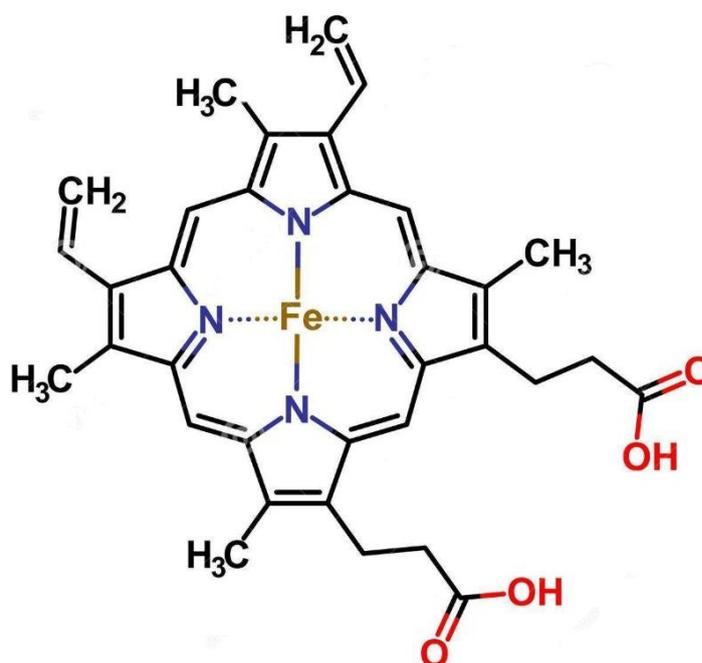
como doença de Alzheimer, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doença cardiovascular (por exemplo, acidente vascular cerebral), enxaqueca e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (GRÖBER et al., 2015).

Apesar de evidências científicas mostrarem que o magnésio tem papel fundamental em diversas reações metabólicas, o complexo metabolismo desse mineral não está completamente elucidado, bem como suas interações com outros nutrientes ou substâncias da dieta. Associado a isso, é evidente a existência de inadequação no consumo de magnésio, o que parece contribuir para a manifestação de sua deficiência na população (SEVERO et al., 2015).

### 1.2.3 Ferro

O ferro é considerado um elemento essencial para a manutenção da vida humana, ele participa de diversos processos no organismo, por exemplo, atuando no transporte de oxigênio, síntese da hemoglobina e ainda está relacionado a processos enzimáticos (OKADA, 2003). É possível classificar este mineral em ferro heme e ferro não-heme. A forma heme (**Figura 1**) é obtida a partir da quebra do ferro das moléculas de hemoglobina, que está na sua forma ferrosa e se liga ao oxigênio efetuando o seu transporte para todos os tecidos corporais, e mioglobina provenientes de laticínios, ovos e carnes vermelhas, sendo melhor absorvido que o ferro não-heme ( $\text{Fe}^{3+}$ ), geralmente proveniente dos alimentos de origem vegetal como grãos e vegetais (GROTTO, 2010).

**Figura 1:** Estrutura química do ferro heme



Fonte: Grotto, 2010

Por atuar em diversos processos e desenvolver funções importantes no organismo humano, sua deficiência acaba por gerar desordens e disfunções, à exemplo a anemia que é considerado o maior problema de saúde pública relacionado à deficiência de nutrientes (WHO, 2006; ETCHEVERRY, GRUSAK, FLEIGE, 2012). A anemia ferropriva atinge cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo e é causada pelo desequilíbrio na quantidade biodisponível de ferro e sua necessidade orgânica. No Brasil, a anemia ferropriva foi apontada como a segunda maior deficiência causadora de doença na infância (ALMEIDA et al., 2004; SPINELLI et al., 2005). Essa doença costuma acometer os diferentes tipos de indivíduos em todas as faixas etárias, como crianças e idosos. Em crianças, estado grave de anemia pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo e, em gestantes, as consequências podem ser evidenciadas no feto, que nasce com baixo peso. Há um acordo entre o Governo Federal e os produtores para a adição de ferro nas farinhas de milho e de trigo, que também são fortificadas com ácido fólico (vitamina B9) para tentar diminuir sua carência na alimentação da população (ANVISA, 2017).

O ferro biodisponível depende da composição e forma como os alimentos são consumidos e da combinação destes na alimentação. O ferro heme presente na carne bovina, peixes, aves e vísceras apresenta uma alta biodisponibilidade, sendo absorvido pelo intestino em maior porcentagem (10 a 30%) do que o ferro não-heme. O ferro não

heme tem biodisponibilidade variável, porém sempre baixa. A biodisponibilidade desse tipo de ferro pode ser potencializada pelo consumo simultâneo de carnes, vísceras, alimentos ricos em ácidos orgânicos como o ascórbico, a vitamina A e carotenos (SANTOS et al., 2004). O ácido ascórbico, por exemplo, quando é consumido na mesma refeição com o ferro não-heme, potencializa sua absorção pois mantém o ferro no estado ferroso e forma o quelato ferro-ascorbato, que é mais solúvel, por isso pronto para ser absorvido pelo organismo (GARCIA-CASAL et al., 1998; FANTINI et al., 2008).

Apesar da anemia ser um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, a média de ferro total presente na dieta de diversas regiões encontra-se acima das recomendações diárias necessárias para suprir o uso metabólico normal desse micronutriente, mostrando que a anemia é consequência da baixa biodisponibilidade de ferro nos alimentos, principalmente o não-heme (BREITHAUPT; YAHIA; VILAZQUEZ, 2007; GUNNARSSON; THORSODOTTIR; PALSSON, 2007; FANTINI ET AL., 2008). Evidenciando que estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade são importantes parâmetros para ter valores reais do seu conteúdo nutricional.

#### **1.2.4 Zinco**

O zinco é um importante micronutriente antioxidante, ou seja, atua contra os radicais livres com a função de bloquear o efeito danoso dos mesmos (MAFRA e COZZOLINO, 2004). Participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como a função imune, crescimento e desenvolvimento. É componente de várias metaloenzimas que influenciam o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. O zinco está abundantemente distribuído em todo o corpo humano, sendo o segundo micromineral mais abundante do organismo. Há evidências de que a suplementação com Zn reduz o impacto de muitas doenças, pois promove melhora do sistema imune (MAFRA e COZZOLINO, 2004).

Na alimentação humana, a forma mais disponível de zinco,  $Zn^{2+}$ , é encontrada na carne de animais, em particular nas carnes vermelhas e aves. Outras fontes são: peixes, ostras e outros mariscos, fígado, cereais de grãos integrais, nozes e produtos de soja. Geralmente a ingestão de zinco está relacionado com a ingestão de proteínas. A principal causa da deficiência de zinco é o emprego de uma dieta rica em cereais não refinados

(integrais) e pães não fermentados, que contêm altos níveis de fibras e fitatos, os quais formam um complexo de coordenação com o zinco (íons  $Zn^{+2}$ ) no intestino e impedem sua absorção.

A carência de Zn no organismo acarreta problemas nutricionais ao organismo, englobando muitas anormalidades ao metabolismo, a exemplo o retardo no crescimento, hipogonadismo, alteração da resposta imune, dificuldade de cicatrização, aumento do risco de aborto, diarreia, anorexia, perda de peso, alopecia, e a prematuridade na gestação (ANDRADE & MARREIRO, 2011).

De forma genérica a legislação Brasileira estabelece como limite de ingestão de Zn, para todos os alimentos como sendo 50,00 mg/Kg (BRASIL, 1965), face uma recomendação diária de 7mg/kg por dia (ANVISA, 2005).

### **1.3 Avaliação nutricional dos alimentos**

Falar em nutrição atualmente é um tema bastante presente no dia a dia, a procura de uma alimentação mais equilibrada tem sido fonte de diferentes debates, a discussão e o enfoque de uma dieta equilibrada é tema muito presente na mídia e preocupação constante de instituições governamentais ligadas à saúde, no Brasil e no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Na literatura encontram-se diversos estudos que preconizam uma dieta balanceada (DA SILVA e SANTOS, 2021) visto que muitas doenças podem ser evitadas pela alimentação saudável, que forneça a ingestão diária dos nutrientes necessários à manutenção de uma vida saudável. Em casos mais graves de deficiência de nutrientes, ocorre a desnutrição, que causa sérios prejuízos ao desenvolvimento do corpo humano, especialmente em crianças, e pode levar à morte. No Brasil o órgão que regulamenta a quantidade de nutrientes que devem ser ingeridos diariamente é a Anvisa.

A ingestão diária recomendada (IDR) para os minerais é um conjunto de recomendações para a maioria dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população saudável (BRASIL, 2005). A IDR leva em conta três grupos principais: adultos, crianças e lactentes e gestantes. Essa regulamentação por parte do governo é bastante importante, já que os minerais atuam em diversas funções biológicas no organismo humano. E

também há minerais que podem representar riscos à saúde humana, pois apresentam toxicidade que podem levar a doenças como câncer, e em casos mais graves à morte, como é o caso da ingestão de cádmio e chumbo, que são considerados tóxicos e ambos são considerados carcinogênicos (HERNANDEZ et al., 2004).

Com o avanço das pesquisas que envolvem alimentos, sabe-se hoje que a concentração total de um nutriente no alimento não fornece informações adequadas para avaliar o seu valor nutricional, pois quando o alimento é ingerido no organismo humano ocorrem reações que começam na boca e se estendem por todo trato gastrointestinal. Neste percurso, ocorrem mudanças de pH e o contato com várias enzimas e soluções salinas, que podem ou não extrair do alimento parte dos nutrientes constituintes da amostra, sendo que apenas parte desse teor é realmente absorvido pelo organismo podendo atuar nas demandas fisiológicas em tecidos alvos ou para serem estocados no organismo para uso futuro (COZZOLINO, 1997; FERNANDEZ, 2009; FAIRWEATHER-TAIT e de SESMAISONS, 2018). Portanto, para uma avaliação eficaz do valor nutritivo dos alimentos, é crucial não apenas considerar a concentração total do nutriente, mas também quantificar os teores bioacessíveis e biodisponíveis.

#### **1.4 Digestão humana e absorção dos nutrientes**

A digestão humana é um processo complexo que consiste basicamente em retirar dos alimentos, que são ingeridos, os nutrientes que podem ser usados pelo organismo para atuarem em demandas fisiológicas. É bom ressaltar que nem todo o conteúdo do nutriente que é ingerido ser absorvido pelo organismo, isso vai depender de diferentes fatores tais como: idade, quantidade ingerida, dieta equilibrada (COZZOLINO, 2008), entre outros.

O processo de absorção pelo organismo humano inicia-se logo na boca, simultaneamente ao processo de digestão, no qual o tamanho dos alimentos é reduzido no processo mecânico da mastigação. Na mastigação ocorre a degradação inicial do alimento na presença de saliva, em pH 6,5. O alimento mastigado é transportado pelo esôfago até o estômago por meio de contrações peristálticas. Ao chegar no estômago ocorre a digestão de proteínas. O processo de absorção de nutrientes pelo organismo acontece no intestino delgado logo após a digestão, onde os alimentos, através de

processos mecânicos e químicos, são decompostos em moléculas mais simples e de menor tamanho, assim tornando possível atravessarem as paredes do tubo digestivo (meio externo) para o meio interno (sangue e linfa), sendo conduzidos até às células, onde são utilizados no decurso do metabolismo celular (GROFF, 2012).

O processo de absorção dos nutrientes é variável, pois cada nutriente possui um sistema de absorção dentro do organismo humano, para os nutrientes esse processo ocorre de diferentes maneiras a depender do mineral analisado. O cálcio, por exemplo, pode ser absorvido por dois tipos de processos: um paracelular (passivo) e um que envolve energia e uma proteína chamada calbidina D9k (ativo). No processo passivo não há consumo de energia, a absorção ocorre entre células epiteliais do intestino devido a elevadas concentrações de cálcio no lúmen. Esse processo ocorre no intestino delgado e jejuno. No processo ativo que envolve energia, a calbidina D9k se liga ao cálcio fazendo com que o cálcio seja absorvido pela borda estriada da célula e também para que ele possa ser levado do citoplasma para a membrana da célula. Esse processo ocorre no duodeno e jejuno proximal e é estimulado pelo calcitriol ou vitamina D. O cálcio também pode ser absorvido no intestino delgado após a fermentação de fibras fermentáveis, como a pectina, realizada pelas bactérias no cólon (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011). A presença de substâncias como vitamina D, açúcares e proteínas tende a facilitar essa absorção, enquanto fibras, fitato, oxalato e cátions bivalentes têm o efeito oposto, diminuindo-a (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011).

O ferro, por sua vez, pode estar na forma heme ou não-heme, como já discutido na seção 1.2.3. Essas duas formas deste micromineral possuem um sistema de absorção diferente, já que o ferro não-heme tende a ser menos acessível do que o ferro heme. O ferro não-heme para ser absorvido precisa ser liberado dos alimentos por meio de hidrólise enzimática e fatores como acidez e a presença de açúcares favorecem a absorção intestinal (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011). O ferro heme é absorvido de forma rápida pela borda estriada das células mucosas, mediado pela proteína transportadora de heme 1 (HCP1). Essa absorção ocorre principalmente no intestino delgado, com destaque para o duodeno. Após entrar na célula, o ferro heme pode ser convertido em íon ferroso inorgânico e protoporfirina (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011). Após ser liberado da matriz alimentar, o ferro não-heme permanece solúvel em meio ácido na forma de  $Fe^{3+}$  no estômago, mas pode ser reduzido ao estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) que é solúvel em pH alcalino. Ainda não há um entendimento completo sobre o processo de absorção do íon

férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). No entanto, é observado que sua absorção pode ser facilitada em ambientes ácidos, bem como na presença de açúcares, ácidos e mucina, juntamente com a proteína integrina. O íon ferroso pode ligar-se aos transportadores presentes na borda estriada e nas células da mucosa intestinal, possibilitando sua absorção (GROPPER, SMITH, GROFF, 2011).

O magnésio é predominantemente absorvido no intestino delgado, com maior eficácia no íleo e no cólon, por meio de mecanismos de transporte tanto ativo quanto passivo. A difusão passiva é a principal via de absorção, especialmente em situações de alta ingestão de magnésio na dieta, enquanto o transporte ativo ocorre por intermédio de proteínas transportadoras específicas (GROPPER et al., 2013; SARIS et al., 2000).

Similarmente, o zinco é absorvido principalmente no intestino delgado, onde o processo de absorção é influenciado por diversos fatores, como a presença de fitatos, fibras e outros minerais na dieta. A absorção de zinco ocorre principalmente por transporte ativo mediado por proteínas transportadoras específicas, com maior eficácia no duodeno e no jejuno (GROPPER et al., 2013; KREBS, 2000).

A presença de certos nutrientes e componentes nos alimentos pode influenciar a absorção de minerais durante os processos digestivos. Por exemplo, enquanto a vitamina D tem sido associada ao aumento da absorção de magnésio, o ferro e o cálcio podem reduzir a absorção de zinco. Além disso, alguns componentes alimentares podem atuar como fatores antinutricionais, interferindo na disponibilidade dos minerais. O fitato é um dos principais compostos que ocasionam redução da absorção de minerais, pois quando na forma de sal, sua molécula possui seis grupos fosfatos reativos, que podem formar complexos com muitos cátions divalentes como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas, carboidratos e lipídios diminuindo sua absorção (GREINER e KONIETZNY, 2006; KUMAR et al., 2010).

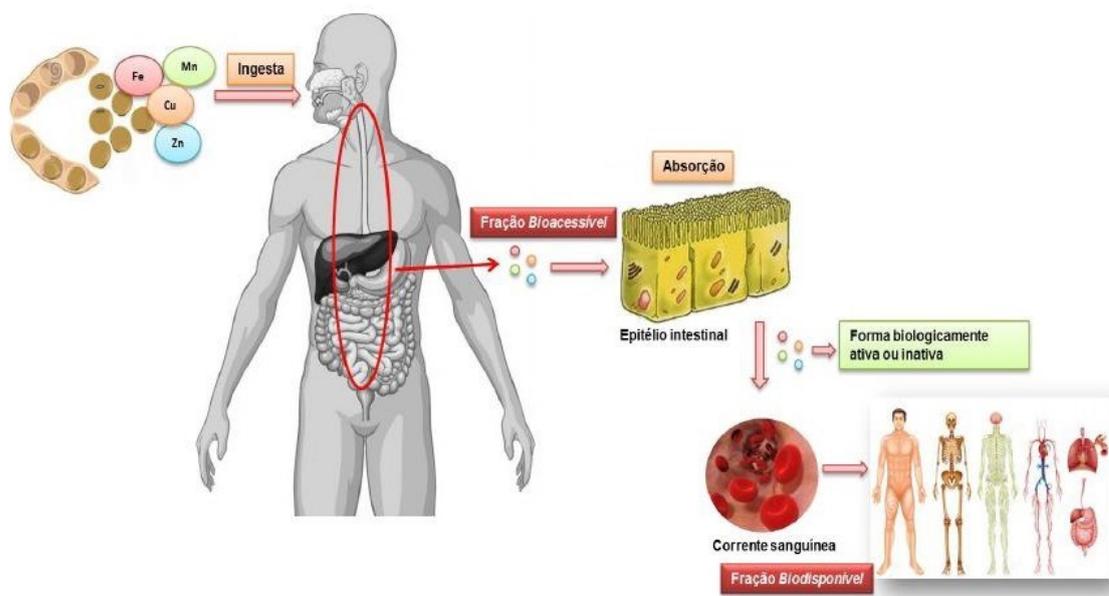
## **1.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais**

Na literatura são reportados diferentes trabalhos que objetivam avaliar o teor nutricional de matrizes alimentícias, nesses estudos o foco é a avaliação do teor proteico, vitaminas e a quantidade de minerais presente nos alimentos, porém muitos desses trabalhos apenas a determinação da concentração total desses nutrientes é levada em consideração. Desse modo, não sendo capaz de fornecer sozinho informações adequadas

na avaliação de seu valor nutricional. Sendo assim, as definições de bioacessibilidade e biodisponibilidade são necessárias, que de modo geral corresponde às frações dos nutrientes que são realmente absorvidos pelo organismo, nesse processo estão incluídas a absorção e transporte de nutrientes para o organismo. A biodisponibilidade é comumente medida por testes *in vivo* (BENITO & MILLER, 1998; PERALES et al., 2006; GUERRA et al., 2012; CARDOSO et al., 2015, CALLOU e SILVA , 2016), estes testes fornecem uma compreensão detalhada do comportamento do composto em um ambiente biológico, possibilitando uma análise precisa de sua eficácia e segurança. No entanto, apesar de sua importância, os testes *in vivo* podem apresentar limitações, incluindo questões éticas, custos elevados e complexidade técnica. Como alternativa aos testes *in vivo*, técnicas *in vitro* têm sido desenvolvidas e aprimoradas para avaliar a biodisponibilidade de substâncias. Estas técnicas utilizam modelos celulares ou sistemas biológicos simplificados para simular a interação entre o composto e o organismo.

A **Figura 2** ajuda a compreender os conceitos de bioacessibilidade e biodisponibilidade: Quando um alimento entra no organismo, inicia-se um processo complexo. Após a digestão, os nutrientes presentes no alimento são liberados e disponíveis para serem absorvidos pelo corpo. Esse processo de liberação dos nutrientes é chamado de bioacessibilidade. Porém, nem todos os nutrientes liberados durante a digestão são completamente absorvidos, alguns podem ser excretados pelo corpo sem serem utilizados, enquanto outros podem ser armazenados para uso futuro. A quantidade de nutrientes que realmente entra na corrente sanguínea e estão disponíveis para serem utilizados pelo corpo é chamada de biodisponibilidade.

**Figura 2:** Processo de bioacessibilidade e biodisponibilidade



Fonte: Agudelo et al., 2016

É importante salientar as diferenças entre esses conceitos para não ocorrer equívocos na propagação desses termos, já que é possível evidenciar na literatura alguns exemplos de que esses conceitos são usados inadequadamente (GIORI, 2010).

### 1.5.1 Procedimentos *in vitro* para a avaliação da bioacessibilidade

Nos procedimentos *in vitro*, a digestão no trato gastrointestinal no organismo humano é simulada usando de aproximações das condições fisiológicas, ou seja, simulando a composição química dos fluidos digestivos, pH e períodos de tempo de residência típicos para cada etapa do processo de digestão. Na literatura, diferentes métodos são descritos para a quantificação dos teores bioacessíveis, desde testes simples que necessitam de poucos reagentes, como o método SBET (*Simple Bioaccessibility Extraction Test*) que simula somente as condições da fase gástrica e que utiliza apenas solução de ácido clorídrico e glicina, em pH igual a 1,5. Esse método leva em consideração a temperatura corporal e o tempo de digestão. Por avaliar apenas a fase gástrica, os resultados obtidos quando se utiliza esse método podem ser superestimados (BOSSO e ENZWEILER, 2008).

Outro método é o PBET (do inglês, *Physiological Based Extraction Test*) que é utilizado para a quantificação do teor bioacessível de minerais. Esse teste simula as condições gástricas e intestinais dos humanos, e proporciona parâmetros mais representativos do trato gastrointestinal, tais como: pH, temperatura, composição química e tempo de residência, semelhantes aos processos de digestão humana no estômago e no intestino. Esse método é realizado em duas etapas: a primeira, a fase gástrica composta por uma solução de pepsina, malato, citrato, ácido acético e ácido láctico em pH 2,5, a segunda etapa (fase intestinal), composta por uma solução de sais biliares e pancreatina em pH 7,0. A amostra é incubada a uma temperatura constante de 37°C para simular a temperatura corporal (TOKALIOGLU et al., 2014; AGUDELO, 2015).

Outro método bastante utilizado para avaliação da Bioacessibilidade é o UBM (do inglês, *Unified Bioaccessibility Method*). Esse método consiste em simular os processos químicos que acontecem na boca, no estômago e no intestino, em condições de jejum, usando soluções sintéticas, levando em conta os tempos de trânsito fisiológicos, a uma temperatura de 37°C (TOKALIOGLU et al., 2014). Inicialmente usado com o propósito de validar um método para a determinação da bioacessibilidade de componentes contaminantes em solos, para avaliar os riscos à saúde humana, posteriormente o método foi aplicado em amostras de alimentos.

Outro modelo *in vitro* que tem sido bastante empregado na análise de bioacessibilidade é o protocolo proposto por Minekus et al., 2014 (ao longo do texto esse método é denominado simplesmente como Minekus) que propuseram um método padrão para a digestão *in vitro* baseando-se em diversos protocolos existentes (MINEKUS et al., 2014). Esse método tem sido usado por diversos pesquisadores com o objetivo de comparar os resultados com maior confiabilidade. Neste método, os autores priorizaram reduzir os fluidos salivar, gástrico e intestinal além de utilizar concentrações padronizadas das enzimas presentes na boca, estômago e intestino. Esse procedimento tem sido bastante empregado nas análises de bioacessibilidade, porém o método ainda não é utilizado como o descrito pois muitos trabalhos relatam adaptações no procedimento, saindo do objetivo que é a padronização de um método para evitar diferenças significativas nos valores obtidos quando realizados por diferentes analistas. Assim, independentemente do método escolhido, os testes de bioacessibilidade e de biodisponibilidade devem considerar e

reproduzir o mais fiel possível as condições do trato gastrointestinal encontradas *in vivo*. (MOREDA et al., 2013).

Outros métodos têm sido aplicados para avaliar os teores bioacessíveis, esses são métodos otimizados que buscam melhorar as condições para a realização desses testes, buscando retratar fielmente os processos que ocorrem no organismo. Várias são as técnicas empregadas para a quantificação dos teores bioacessíveis e biodisponíveis, sabendo que para realizar a análise de bioacessibilidade e biodisponibilidade é preciso ter também o teor total de minerais o qual é relacionado com o teor quantificado na fração bioacessível.

Diversos trabalhos realizaram a quantificação das frações bioacessíveis, em alimentos, utilizando diferentes técnicas tais como: a espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) (SOUZA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019), espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) (SILVA et al., 2015; WANG et al., 2019), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) (SCHMITE et al., 2019), espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) (SILVA, 2016; CAMPOS et al., 2017).

Nano e Santos (2015), utilizaram os métodos SBET e PBET para avaliar os teores bioacessíveis de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn em amostras de feijão e ervilha, os autores usaram o procedimento digestivo que envolve a simulação das condições de digestão gástrica, e a que envolve a simulação da digestão intestinal. Para simular o SBET os autores usaram uma solução de glicina  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  em meio ácido (HCl, pH = 1,5) para isso, 0,25 g de amostra foram incubados com a solução preparada; a temperatura foi ajustada para  $37^\circ \text{C}$  e uma velocidade de rotação para 100 rpm durante 1 h. Posteriormente a mistura foi filtrada a vácuo em membranas de filtro de acetato de celulose com porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$  e reservadas para quantificação posterior. E na simulação do PBET os autores simularam as condições da digestão gástrica, seguida da simulação da digestão intestinal. Para tal, a amostra foi incubada a  $37^\circ \text{C}$  por 1 h com pepsina em pH 2,5 ajustado com HCl, depois o pH da solução foi ajustado para 7,0 com pancreatina e extrato biliar. A mistura foi incubada a  $37^\circ \text{C}$  sob agitação orbital a 100

rpm por 1 h. O pH da mistura foi ajustado para 7,0 com solução de NaHCO<sub>3</sub>. À fase intestinal, foram adicionados 15 mg de pancreatina e 52,5 mg de sais biliares, e esta mistura foi incubada por 4 h nas mesmas condições da fase gástrica. O objetivo do trabalho era fornecer informações nutricionais sobre os grãos avaliados, comparar a bioacessibilidade das amostras *in natura* e cozidas e também equipar os dois métodos de extração *in vitro* usados. Os resultados indicaram que os processos térmicos investigados podem influenciar a bioacessibilidade dos macrominerais (Ca, Mg, K e P) e microminerais (Cu, Fe e Zn), ou seja, o processamento térmico pode resultar em aumento ou diminuição da bioacessibilidade de minerais.

Os autores investigaram a influência do cozimento das amostras usadas no trabalho, mostrando que o cozimento pode alterar o teor de minerais disponibilizados pelos fabricantes nas embalagens/rótulos dos produtos. Durante o cozimento pode haver o desprendimento de algumas frações de nutrientes, ficando retidas na água em que são cozidas, e sem ter o teor total informado na embalagem o alimento torna-se menos nutritivo do que realmente seria se esse procedimento fosse levado em consideração no momento de inserção desse teor no produto, já que as amostras analisadas são consumidas cozidas.

Ao se comparar os resultados encontrados com o método SBET e PBET foi possível confirmar que menores quantidades de minerais são extraídas ao usar o PBET quando comparado ao método que simula apenas as condições gástricas. Levando a concluir que de fato, em alguns casos, a superestimações de bioacessibilidade podem ocorrer quando se utiliza apenas o método SBET.

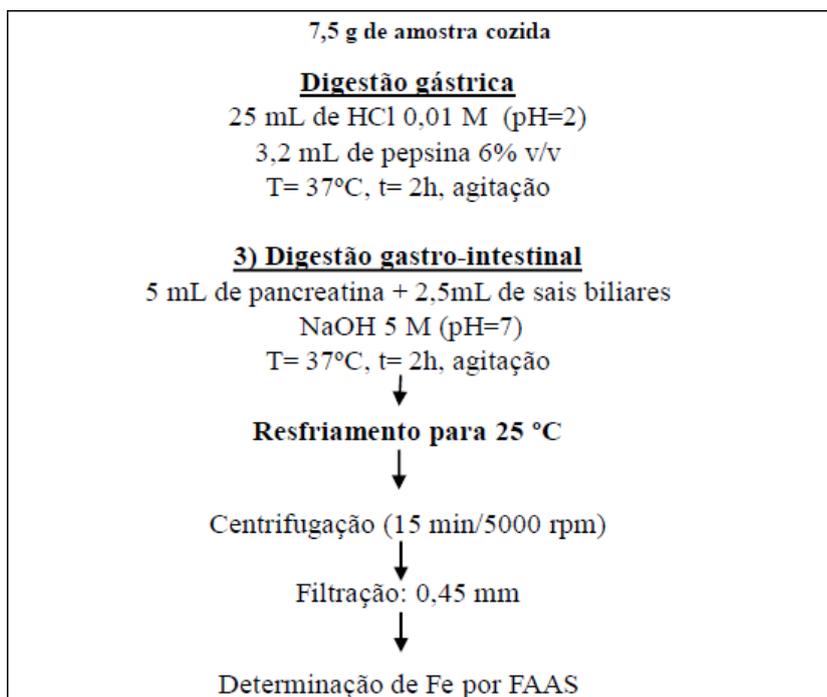
Siqueira e colaboradores (2012) compararam dois processos analíticos *in vitro* que visam estimar a bioacessibilidade de elementos traço essenciais e potencialmente tóxicos em amostra de leguminosas de diferentes espécies (*Vigna unguiculata* L. Walp, *Cajanus cajan* L., *Lablab purpureus* L. Sweet). Os autores realizaram a comparação entre os dois métodos que são propostos na literatura, como esperado o PBET forneceu dados inferiores ao SBET. O procedimento realizado é cheio de etapas e é imprescindível que o analista reproduza fielmente cada etapa. Uma maneira de facilitar esse procedimento é a automatização desses testes já que a mesma proporciona o mínimo de intervenção do analista permitindo também obter perfis de bioacessibilidade de modo mais eficiente e em tempos curtos gerando mais confiabilidade nesses procedimentos. Os resultados

demonstraram que os percentuais de bioacessibilidade de Cu, Fe e Zn diferem-se significativamente, quando se compara os resultados obtidos nos métodos empregados, sendo inferiores os percentuais obtidos no método PBET.

Lorente e colaboradores (2016) avaliaram a bioacessibilidade de arsênio em três tipos de cogumelos e separaram em três porções submetidas a tratamentos térmicos diferentes, sendo cru, grelhada e fervida. Para a determinação do arsênio foi feita a digestão ácida assistida por microondas. Já para a fração bioacessível, foi usado o método PBET. O teor de arsênio foi determinado por ICP MS. Materiais de referência certificado foram analisados para avaliar os métodos e a bioacessibilidade de cogumelos crus, cozidos e grelhados. Foi observada elevada bioacessibilidade em cogumelos crus, cozidos e grelhados, variando de 74% a 89% e de 80% a 100% para extratos gástricos e gastrointestinais, respectivamente, sugerindo a necessidade de considerar o risco potencial para a saúde do consumo dos cogumelos analisados.

O estudo conduzido por Campos e colaboradores (2017) aprimorou um método de análise *in vitro* destinado à determinação da fração bioacessível de ferro em duas variedades de carne de frango: peito e fígado. A **Figura 3** apresenta de forma esquemática o procedimento adotado durante o experimento. Para a avaliação quantitativa do ferro presente nas amostras, utilizou-se a técnica de espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), possibilitando a análise tanto dos níveis totais quanto dos teores bioacessíveis de ferro.

**Figura 3:** Representação esquemática do procedimento otimizado para determinação *in vitro* da bioaccessibilidade de Fe na carne de frango.



**Fonte:** Traduzido de Campos et al., 2017.

Com relação ao teor total de Fe, as frações bioaccessíveis encontradas nessas amostras foram em torno de 23% e 56% para o peito e o fígado de galinha, respectivamente. A amostra de fígado de frango apresentou os maiores teores totais ( $400 \pm 10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e de Fe bioaccessível ( $223 \pm 18 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e se destacou como uma boa fonte desse micromineral. Os autores do método otimizado avaliaram diferentes parâmetros para conseguir os melhores resultados e concluíram que a relação entre a massa da amostra e a quantidade de pepsina afeta os teores bioaccessíveis de ferro em carne de frango, já que algumas características da digestão *in vitro* como: tempo de incubação, uso de enzimas específicas bem como fluidos digestivos podem ser ajustadas de acordo com as características da amostra a ser analisada (HUR et al., 2011). O método otimizado descrito contribui com os estudos de bioaccessibilidade pois resulta em uma economia da enzima usada para obter uma extração satisfatória do analito, contribuindo com o aperfeiçoamento desses métodos.

Sousa e colaboradores (2018) realizaram o método SBET para determinação do teor bioaccessível de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn em amostras de sementes de linhaça

e gergelim, as amostras foram submetidas ao teste utilizando-se uma solução de glicina e ácido clorídrico, para controle do pH da solução. As amostras foram incubadas em estufas a 37°C por uma hora logo após a mistura foi filtrada para posterior quantificação por ICP OES.

Da Silva e colaboradores (2018) avaliaram a bioacessibilidade de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de purês de frutas, cereais instantâneos e fórmulas para lactentes. A análise foi realizada por ICP OES e o método de *digestão in vitro* proposto por Minekus foi usado para a análise da fração bioacessível. De acordo com a IDR sugerido pelo Instituto de Medicina (2011), às fórmulas infantis apresentaram as maiores contribuições e os purês de frutas as mais baixas contribuições, quando a quantidade da amostra ingerida em uma única refeição foi considerada. Os autores concluíram que a bioacessibilidade desses elementos variam muito de acordo com a composição das amostras, indicando a importância desse tipo de estudo para avaliar a quantidade dos minerais que são realmente bioacessíveis ao organismo humano obtendo informações mais precisas. Este trabalho decorre sobre a importância dos estudos acerca da bioacessibilidade em alimentos consumidos principalmente por crianças, objetivando a identificação quantitativa nutricional bioacessível ao organismo humano de forma mais precisa, evitando deficiências nutricionais que possam acarretar em patologias em consequência destas.

Sanches e colaboradores (2018) realizaram a análise de bioacessibilidade de Ca, P, Na, K, Mg e Zn em amostras de leite e bebidas à base de soja, usando o modelo *in vitro* de digestão Minekus com algumas adaptações, realizaram também outro teste de extração do teor bioacessível, o proposto por Laparra et al., 2003, nesse modelo de extração os ensaios consistem na exposição inicial da amostra alimentícia a uma suspensão de pepsina em meio ácido, com posterior adição de pancreatina e de sais de bile, em valores de pH entre 6-8, para a simulação da digestão intestinal. Em seguida, separa-se a porção solúvel da amostra no trato gastrointestinal, a qual é analisada para a quantificação do composto de interesse (LAPARRA et al., 2003). Os autores utilizaram os dois processos de digestão para avaliar qual dos dois seria mais apropriado para as análises das frações bioacessíveis nas amostras estudadas. A quantificação dos analitos se deu por ICP OES. A bioacessibilidade de Na, K e P chega a 120% no método de extração Minekus, portanto não foi possível realizar sua quantificação de forma confiável, devido à alta concentração de sais utilizados nesse método, interferindo nas leituras por ICP OES. Dessa forma, os

autores optaram por usar o procedimento Laparra, o que se mostrou mais coerente na interpretação dos resultados em relação ao modelo Minekus. Nos ensaios de bioacessibilidade do leite bovino pelo método Laparra todos os analitos apresentaram bioacessibilidade maior que 50%. Não foram encontradas grandes variações nos resultados das amostras ao comparar as marcas e tipos analisados, exceto para o Zn, que apresentou diferenças entre as marcas nas bebidas à base de soja, nas frações bioacessíveis, ocorrendo menor bioacessibilidade de Zn em relação às amostras de leite. Os autores realizaram a extração do teor bioacessível em amostras de leites, sendo possível observar que em matrizes que contenham uma alta concentração de sais, o protocolo Minekus pode não ser a melhor alternativa.

Oliveira e colaboradores (2019) realizaram um teste SBET para avaliar os teores bioacessíveis de As, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn, em amostras de mel. Para isso, foram pesadas aproximadamente 500 mg da amostra em erlenmeyers de 125 mL, e foi adicionado 25,00 mL de solução de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de glicina/HCl em pH 1,5. As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital a 100 rpm por 60 minutos. Uma alíquota de 5,00 mL foi retirada da solução sobrenadante e submetida a digestão ácida, para quantificação por ICP OES. Os autores utilizaram análise de dados multivariada, análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), para avaliar o agrupamento ou similaridade das amostras de mel. Os resultados obtidos dos teores bioacessíveis dos minerais estudados foram menores que os relatados na literatura, menos para As, B, Ba, Cd, Cu, Mn, P, Se, Sr e Zn os quais não foram quantificados, pois estavam abaixo do limite de quantificação (LOQ) do método analítico proposto. A análise multivariada de dados, empregando PCA e HCA, possibilitou a identificação de grupos entre as amostras, onde as amostras oriundas da zona urbana tendem a apresentar maiores concentrações de B, Ba e Cu devido à provável contribuição antropogênica quando comparado as amostras produzidas na zona rural. O ensaio de extração do teor bioacessível deste trabalho foi realizado apenas com simulação das condições gástricas, podendo resultar em valores superestimados, uma vez que o processo de absorção dos minerais é efetivado no intestino. A simulação gastrointestinal é de suma importância para evitar a ocorrência da superestimação quantitativa dos teores bioacessíveis, tratando-se do SBET, um teste simplificado e o mais simples para esse tipo de análise.

Wang e colaboradores (2019) utilizam dois dos principais testes empregados para

avaliar a bioacessibilidade. O teste baseado na extração fisiológica (PBET) e o teste unificado (UBM) foram usados para avaliar os teores de Cr em vegetais com a finalidade de avaliar os possíveis riscos à saúde pela ingestão de vegetais contaminados. As frações bioacessíveis foram quantificadas por ICP-MS, quanto aos métodos utilizados foram encontradas diferenças significativas nas bioacessibilidades de Cr, já que os resultados obtidos pelo UBM foram superiores aos do método PBET. Como os autores utilizaram dois procedimentos de digestão *in vitro* os dois métodos se mostraram adequados para quantificar as frações bioacessíveis e foi possível observar que a quantidade de compostos orgânicos, como o citrato na solução gastrointestinal do método PBET poderiam interferir na fração de Cr bioacessível (KUMARI & PLATEL, 2017). Os autores realizaram além do teste de bioacessibilidade, uma análise de especiação química, e posteriormente o teste de bioacessibilidade, de grande importância, já que a espécie química tóxica é o Cr(VI), e o Cr(III) é um micronutriente bastante importante no organismo humano, podendo ocorrer uma superestimação dos riscos à saúde por ser considerada puramente a bioacessibilidade do Cr total, como encontrada na literatura.

Uribe-Wandurraga e colaboradores (2020) avaliaram a bioacessibilidade de P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Se em biscoitos, enriquecido com microalgas comestíveis afim de aumentar a quantidade de minerais, usando o procedimento *in vitro* proposto por Minekus para a simulação dos processos digestivos, e a quantificação dos minerais foi realizada por ICP OES. Quando a concentração de microalgas na formulação aumentou, maiores quantidades de P, Se, Na e Mg foram encontradas nos biscoitos. O enriquecimento dos biscoitos com microalgas, proporcionou maior acessibilidade de P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Se para absorção no corpo, em comparação com os biscoitos de controle. Os autores inovaram na análise de bioacessibilidade realizando antes do procedimento de digestão *in vitro* o enriquecimento da amostra, sendo possível avaliar o efeito da microalga na absorção dos minerais, mostrando-se uma proposta eficiente, sendo uma boa ferramenta para fornecer a quantidade adequada de minerais para o organismo.

Iaquinta e colaboradores (2021) estudaram a bioacessibilidade de Cu e Zn em cortes bovinos (costela e contrafilé), através do desenvolvimento de um ensaio *in vitro*. As amostras foram cozidas em dois graus de cozedura (médio e bem passado) como habitualmente consumidos localmente. As condições gastrointestinais simuladas foram

otimizadas e a veracidade do método foi avaliada através da realização de balanços de massa. As determinações analíticas foram realizadas por espectrometria de absorção atômica. Não foram encontradas diferenças significativas entre os cortes estudados nem entre os graus de cozimento avaliados (IAQUINTA et al., 2021).

Recentemente Teixeira e colaboradores (2022) avaliaram o efeito do processamento do leite de cabra e vaca na bioacessibilidade de cálcio, magnésio e zinco usando métodos que fazem a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. De modo geral, o leite de cabra e seus derivados apresentaram maior bioacessibilidade de Ca e Mg do que o leite de vaca e seus derivados. O processamento do leite afetou a bioacessibilidade dos minerais indicando a importância da estrutura, composição e equilíbrio dos minerais dos alimentos na digestão *in vitro* e na previsão da bioacessibilidade (TEIXEIRA, 2022).

Na **Tabela 2** são mostrados mais trabalhos publicados que envolvem a determinação de diferentes minerais em amostras de alimento visando a quantificação dos teores bioacessíveis. Evidenciado assim um crescente aumento nos estudos de bioacessibilidade dada a importância de se considerar também esses teores para entender melhor o comportamento dos nutrientes no organismo.

**Tabela 2:** Diferentes procedimentos de extração *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade em alimentos descritos na Literatura

<b>Amostra</b>	<b>Analito</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
Feijão e mandioca	Fe e Zn	HCl, pepsina, NaOH, e pancreatina	ICP OES	BRIGIDER et al., 2021
Extrato de soja, leite bovino, caprino e ovino	Zn, Ca e P	Pepsina, HCl, sais de bile e pancreatina	ICP OES	BOSSU et al., 2020
Linhaça e Gergelim	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn	HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NaOH, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> e glicina	ICP OES	SOUZA, 2018
Chá de erva mate	Cd, Cu, Pb e Al	Pepsina, HCl, pancreatina, sais biliares e NaHCO <sub>3</sub> .	GFAAS e FAAS	SCHMITE et al., 2019
Castanha de caju	Fe e Zn	NaCl, pepsina, HCl, pancreatina, sais biliares, NaHCO <sub>3</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaOH.	FAAS	XAVIER et al., 2019
Suco integral de caju e fibra de caju	Cu, Fe e Zn	Pepsina, HCl e sais pancreatina-bile e NaHCO <sub>3</sub> .	ICP OES	LIMA et al., 2014
Suplemento de cálcio com adição de matriz láctea.	Ca	CaCl <sub>2</sub> , HCl, pepsina, NaOH, sais de bile e pancreatina	AAS	2017
Leite	Zn	Pepsina, HCl, sais de bile e pancreatina	FAAS	BOSSU et al., 2008
Farinha de aveia e arroz e farinha de trigo.	Fe, Zn, Cu e Mn	HCl, NaHCO <sub>3</sub> e NH <sub>4</sub> Cl, KCl, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> , Ureia, NaCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pepsina, pancreatina.	ICP-MS	DA SILVA et al., 2013
Infusões de café em pó	Ca, Mg, Mn e Fe	Pepsina, HCl, pancreatina sais de bile, NaHCO <sub>3</sub>	FAAS	STELMACH et al., 2014

Esses estudos refletem um aumento significativo no interesse pela avaliação da bioacessibilidade de minerais essenciais em alimentos, visando fornecer informações mais precisas sobre os efeitos da ingestão desses elementos no organismo humano. Esse avanço é fundamental para promover uma compreensão mais clara da relação entre a dieta e a saúde humana, contribuindo para orientar práticas alimentares mais seguras e saudáveis.

## **1.6. Técnicas analíticas na determinação de elementos**

A análise de minerais em alimentos desempenha um papel fundamental na garantia da qualidade e segurança alimentar, bem como na avaliação do valor nutricional dos produtos consumidos pela população. Para realizar uma análise precisa dos minerais presentes nos alimentos, uma variedade de técnicas analíticas avançadas é empregada. Essas técnicas são projetadas para detectar e quantificar a presença de minerais em concentrações que podem variar desde traços até concentrações mais elevadas, dependendo da composição do alimento em questão.

Entre as principais técnicas utilizadas para a análise de minerais em alimentos, destacam-se a espectroscopia de absorção atômica (AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP-OES), a espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS), a espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) e a espectrometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).

Cada uma dessas técnicas possui suas próprias vantagens e limitações, sendo selecionadas de acordo com a natureza dos minerais a serem analisados, a sensibilidade requerida, a matriz do alimento e a disponibilidade de equipamentos laboratoriais. Além disso, avanços recentes na instrumentação analítica têm permitido uma maior precisão e sensibilidade na detecção de minerais em alimentos, contribuindo para uma avaliação mais abrangente e confiável da composição mineral dos produtos alimentícios.

### **1.6.1 Espectrometria de absorção atômica por chama**

A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) é uma técnica simples, robusta e seletiva, capaz de diferenciar entre os diferentes elementos químicos numa amostra. Sua seletividade, no entanto, depende da fonte de atomização que nesta técnica

requer lâmpadas de cátodo oco do analito de interesse. É considerada a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de  $\text{mgL}^{-1}$  (KRUG, NÓBREGA e OLIVEIRA, 2004). O processo de quantificação na FAAS é realizado de maneira simples e rápida, a amostra líquida é aspirada por um tubo capilar pelo nebulizador do equipamento o qual transforma a amostra líquida em um aerossol, o aerossol formado se mistura com o gás comburente antes de alcançar o queimador.

O gás em alta velocidade divide o líquido em gotas de vários tamanhos. As gotas se dispersam sendo selecionadas com o auxílio de um spoiler em que as maiores são impedidas de atingir o queimador, sendo eliminadas por meio de um dreno. As gotículas que atingem a chama evaporam e, o sólido que resta se vaporiza, liberando átomos no estado gasoso.

A concentração desses átomos é determinada por absorção da radiação, diretamente relacionada com a quantidade de átomos presentes, conforme descrito pela lei de Lambert-Beer (SKOOG, 2004).

## **1.6.2 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Microondas**

A espectrometria de emissão atômica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES, do inglês *Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry*) é uma técnica bastante similar com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) mas o funcionamento das duas são distintos. São duas técnicas analíticas usadas para análise de elementos em diversos tipos de amostras.

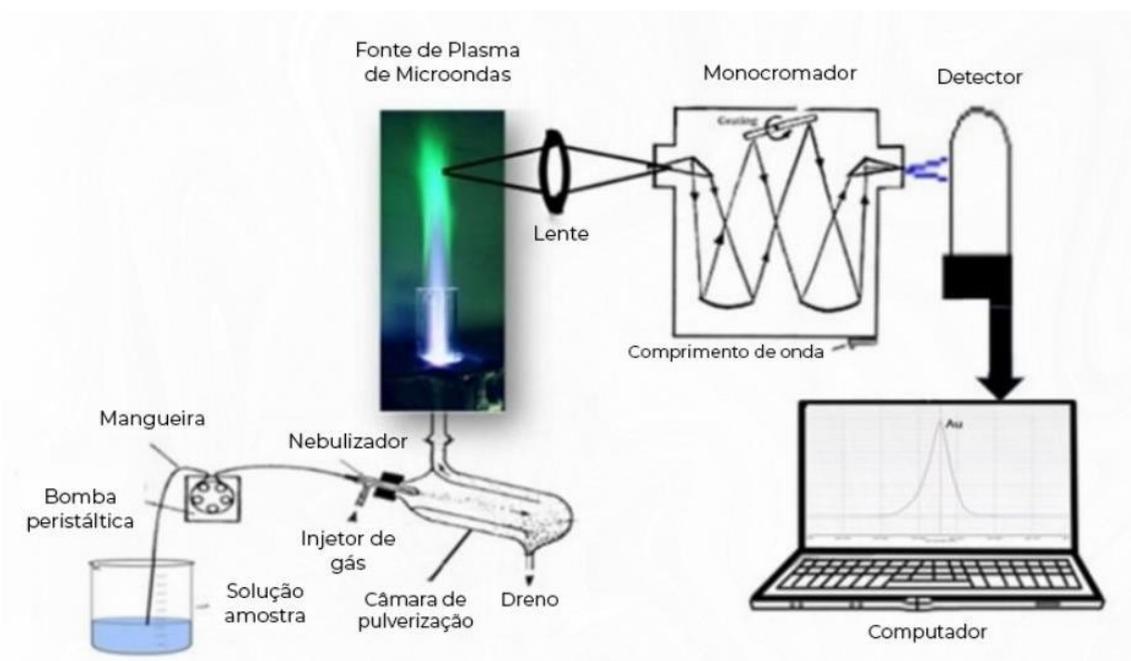
O MIP OES usa gás  $\text{N}_2$  extraído do ar tornando uma alternativa economicamente mais interessante que até mesmo a um FAAS. Isso se deve ao fato de que o espectrômetro de emissão atômica de plasma de micro-ondas (MP-AES do inglês *Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometer*) utiliza gás nitrogênio extraído do ar, enquanto os sistemas de FAAS utilizam acetileno e óxido nítrico, que são inflamáveis e oxidantes, além do ar comprimido. Além disso, o MP-AES apresenta sensibilidade suficiente para determinação em rotina de elementos como boro e fósforo, os quais não são facilmente detectados por FAAS. Outro benefício é a facilidade em sua utilização já que o sistema

de introdução de amostras é facilmente operacionalizado.

A formação do plasma em um MP-AES ocorre dentro da cavidade Hammer, um guia de ondas onde as microondas passam e geram um campo eletromagnético que excita o gás do plasma, o nitrogênio. Para iniciar a excitação, é usado argônio e uma centelha, e o nitrogênio é adicionado em seguida para formar o plasma.

A amostra é introduzida no equipamento MP-AES de maneira semelhante à ICP OES. Uma solução que contém os analitos é aspirada por uma bomba peristáltica através de mangueiras de diferentes tamanhos e levada a um nebulizador. Este transforma a solução em um aerossol usando gás N<sub>2</sub>. Uma câmara de nebulização homogeneiza as partículas do aerossol, condensando as maiores e permitindo que o plasma receba um aerossol mais fino. No plasma de nitrogênio, ocorrem processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização para todos os elementos químicos, sendo as duas últimas etapas dependentes das características físico-químicas do elemento. O potencial de ionização afeta a população de íons gerados no plasma: quanto maior o potencial de ionização, menor será a população de íons (ROCHA et al., 2020). Na **Figura 4** pode ser observado o seu funcionamento.

**Figura 4:** Diagrama esquemático do funcionamento do MP AES



Fonte: Adaptado Balaram V. 2020

O MIP OES utiliza nitrogênio como gás de plasma, o que proporciona uma vantagem significativa em termos de custo em comparação com o ICP-OES. Além disso, em relação às técnicas de absorção atômica que empregam combustíveis inflamáveis, o MIP OES também se destaca por sua segurança e eliminação de riscos. É uma técnica moderna que é muito utilizada nas determinações de diversos elementos em diferentes matrizes. Por apresentar alta sensibilidade tem sido muito relatada na literatura para determinações de teores bioacessíveis de minerais em diferentes amostras de alimentos (RAMIRO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019 URIBE-WANDURRAGA et al., 2020).

A técnica MIP OES foi aplicada com sucesso em diversas áreas (BALARAM et al., 2014) e provou ser robusta o suficiente para lidar com diferentes tipos de amostras matrizes. No geral, o desempenho analítico do MIP OES foi encontrado ser superior ao do AAS e comparável ao do ICP-OES (BALARAM, 2020). Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos que usam a técnica para determinação da bioacessibilidade de minerais em alimentos. Jacobs e colaboradores (2021) determinaram os teores bioacessíveis de Ba, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn simulando as condições gastrointestinais por MIP OES em cascas de uva e concluíram que a quantidade liberados elementos essenciais durante a digestão não é suficiente para absorção pelo organismo para a necessidade diária desses analitos enquanto que para os elementos não essenciais, Ba e Pb, mostraram-se bioacessíveis, principalmente o Pb que apresentou valores acima do recomendado pela legislação vigente (JACOBS et al. 2021).

Souza e colaboradores (2019) analisaram os teores totais e bioacessíveis de diversos minerais como Fe, Ca, Al, Mg, Zn, Cu, Mn e Sr em amostras de cereais infantil de três marcas e sabores (aveia, milho e arroz). Para a fração bioacessível foi utilizado o método de digestão *in vitro* proposto por Minekus, simulando o processo digestivo humano. A quantificação foi feita por MIP OES. Entretanto, a bioacessibilidade de Ca, Mg e K não puderam ser avaliadas devido a quantidade presente nos reagentes utilizados. O Mn mostrou um alto teor bioacessível, porém abaixo da IDR, estabelecida em 21g do produto. Para os demais elementos, a porcentagem bioacessível foi baixa, refletindo uma IDR também baixa. Observou-se que as diferenças nas concentrações bioacessíveis está relacionada ao tipo de cereal, devido ao tipo de matéria-prima, e que não são capazes de suprir todos os valores recomendados de elementos essenciais, precisando assim da ingestão de outros alimentos (SOUZA et al., 2019).

# Capítulo 2

---

## **OBJETIVOS**

---

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho visa desenvolver uma metodologia para avaliar a bioacessibilidade de cálcio, ferro, magnésio e zinco em suplementos para adultos a fim de simular o processo de digestão humana usando os protocolos SBET e PBET por meio da espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Otimizar e validar o procedimento de preparo de amostra de suplementação adulta;
2. Otimizar as condições ideais para determinação dos analitos por MIP OES;
3. Determinar os teores totais de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras de suplementação;
4. Avaliar a bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras usando o procedimento *in vitro* SBET;
5. Avaliar a bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras usando o procedimento *in vitro* PBET;
6. Comparar os resultados da bioacessibilidade usando o SBET e o PBET;
7. Avaliar a contribuição de cada amostra estudada com base no IDR;
8. Comparar a contribuição ao IDR levando em consideração o teor total e o teor bioacessível.

# Capítulo 3

---

## **Experimental**

---

---

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes e Soluções

As soluções e amostras foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água recém deionizada com um sistema Milli-QPlus® (Millipore, Bedford, MA, EUA), garantindo uma resistividade específica superior a  $18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ . Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos abaixo:

- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Merck, Darmstadt, Alemanha) 65% m m<sup>-1</sup>.

Foi preparada uma solução de ácido nítrico  $7,0\text{ mol L}^{-1}$  pela diluição da solução concentrada.

- Ácido clorídrico (HCl) (Alphatec, São Paulo, Brasil) P.A. 37% m v<sup>-1</sup>.

Foi preparada uma solução de ácido clorídrico  $6,0\text{ mol L}^{-1}$  pela diluição partindo da solução concentrada.

- Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) 30% m m<sup>-1</sup>.
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Microquímica, São Paulo, Brasil) 98%.
- Glicina ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ) (Sigma-Aldrich, EUA).

Uma solução de glicina  $0,4\text{ mol L}^{-1}$  em meio ácido (HCl, pH = 1,5) foi preparada para a realização do teste de digestão gástrica.

- Sais biliares, pepsina e pancreatina foram usados para a simulação da fase gastrointestinal.

A solução gástrica foi preparada com 1,25 g de pepsina, 500 mg de malato, 500 mg de citrato, 500 uL de ácido acético e 420 uL de ácido láctico diluídos em 1,0 L de água deionizada, e o pH foi ajustado para 2,5 com solução de ácido clorídrico.

- Solução estoque de ferro.

Foi preparada uma solução estoque de  $100,0\text{ mg L}^{-1}$  de Fe, fazendo a diluição apropriada de uma solução padrão certificada de  $1000\text{ mg L}^{-1}$  (Fluka Analytica, Suíça).

- Solução estoque de zinco

Foi preparada uma solução estoque de  $100,0\text{ mg L}^{-1}$  de Zn, fazendo a diluição apropriada de uma solução padrão certificada de  $1000\text{ mg L}^{-1}$  (Fluka Analytica, Suíça).

- Solução estoque de magnésio.

Uma solução estoque de magnésio de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Mg}^{2+}$  foi preparada através da diluição de 10,6 g de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) em balão volumétrico de 1L.

- Solução estoque de cálcio (Ecibra, São Paulo, Brasil).

Foi preparada uma solução estoque de  $1000 \text{ mg}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  dissolvendo 2,5 g de  $\text{CaCO}_3$  (seco em estufa por 2 horas a  $100^\circ\text{C}$ ) numa quantidade suficiente de  $\text{HCl}$  a 1:10 ( $\text{v v}^{-1}$ ) para obter a sua dissolução e em seguida avolumado em balão volumétrico de 1 L com água deionizada. Essa solução foi conservada em frascos de polietileno.

- Uma solução multielementar (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr e Zn) de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e K  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (SpecSol, Jacaré, SP) foi usada para otimização mensal do MIP OES (alinhamento da tocha).

A descontaminação de vidrarias, tubos plásticos e materiais em geral foi feita por meio da lavagem de todos os materiais com detergente, logo após foram colocadas em banho ácido contendo  $\text{HNO}_3$  10% ( $\text{v v}^{-1}$ ), por no mínimo 12 h. Em seguida, os materiais foram lavados com água deionizada e enxaguados por no mínimo três vezes.

### 3.2 Materiais e equipamentos

- Balança analítica da marca Shimadzu modelo AY220 foi utilizada para pesagem das amostras e reagentes com uma precisão de 0,001 g.
- Chapa de aquecimento modelo Rh Basic 1, IKA foi empregada para testes do preparo amostras.
- Chapa de aquecimento Marconi modelo MA038 foi utilizada para decomposição das amostras.
- Estufa digital, modelo SX-300 DTME, Sterilifer, foi usada para secagem de alguns reagentes.
- PHmetro, modelo 713, Metrohm, foi usado para a verificação do pH das soluções gástricas e intestinais.

- Espectrômetro de absorção atômica por chama (FAAS) modelo 908AA (GBC Avanta) foi utilizado para a determinação de cálcio e ferro.
- Lâmpadas de catodo oco de Ca e Fe foram utilizadas como fonte de radiação para determinação dos analitos nas amostras.
- Incubadora *Shaker* modelo SL-222, Solab, com controlador de temperatura digital, capacidade para 25 erlenmeyer de 250 mL e com sistema de agitação controlada foi empregada na simulação dos testes *in vitro* SBET e PBET.
- Espectrômetro de emissão atômica de plasma por microondas (MP OES) modelo 4200 (Agilent Technologies) equipado com um gerador de N<sub>2</sub> modelo 4107 (Agilent Technologies). Este instrumento opera com uma potência fixa de 1 kW e uma frequência de micro-ondas de 2450 MHz. O sistema de introdução de amostras foi composto por um nebulizador do tipo One-Neb e câmara de nebulização do tipo concêntrica (Agilent Technologies). Na **Figura 5** pode ser observado o equipamento usado.

**Figura 5:** Equipamento MP OES usado para quantificar os elementos estudados.



Na **Tabela 3**, estão apresentados os parâmetros instrumentais, bem como as condições operacionais utilizadas em todas as análises dos compostos lácteos e fórmula de nutrição oral e enteral.

**Tabela 3** - Condições operacionais empregadas nas análises de suplementação adultas por MP OES.

<b>Parâmetro Instrumental</b>	<b>Condição Operacional</b>
Frequência de micro-ondas (MHz)	2450
Potência de micro-ondas (kW)	1,0
Nebulizador	One-Neb
Câmara de nebulização	Concêntrico
Tempo de integração (s)	3
Velocidade da bomba peristáltica (rpm)	15
Número de réplicas	3
Correção de fundo	Auto

### 3.3 Amostras

O grupo de amostras consistiu em seis amostras de suplementação adulta, das quais três estavam na forma de pó (composto lácteo fortificado - CLF) e três na forma líquida (fórmula de nutrição enteral e oral - FNEO). As amostras 1, 2 e 3 dos CLF também eram adequadas para uso em alimentos, podendo ser misturadas em líquidos como leite, sucos, sopas ou caldos para enriquecer o valor nutricional dessas preparações e administradas por via oral. As amostras 1, 2 e 3 de FNEO podiam ser usadas tanto por via oral quanto enteral, conforme descrito na embalagem. O NIST 1547 da Sigma-Aldrich (China) foi utilizado como Material de Referência Certificado (CRM) a fim de avaliar a exatidão do procedimento.

As amostras analisadas foram adquiridas em farmácias da cidade de João Pessoa-PB e estão apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4 - Amostras estudadas para determinação da bioacessibilidade**

	<b>Amostras</b>	<b>Descrição</b>
<b>CLF</b>	Amostra 1	Composto lácteo com adição de nutrientes (sem sabor)
	Amostra 2	Composto lácteo com adição de nutrientes (baunilha) Marca A
	Amostra 3	Composto lácteo com adição de nutrientes (baunilha) Marca B
<b>FNEO</b>	Amostra 1	Fórmula para nutrição enteral e oral (baunilha) Marca A
	Amostra 2	Fórmula para nutrição enteral e oral (baunilha) Marca B
	Amostra 3	Fórmula para nutrição enteral e oral (baunilha) Marca C
<b>CRM</b>		NIST 1547

### **3.3.1 Pré-tratamento para o preparo das amostras**

O procedimento para o preparo de amostras consistiu em promover a digestão ácida das amostras, executado da seguinte maneira: Os CLFs foram diluídos com água deionizada conforme descrito na embalagem do fabricante de cada amostra. Para as amostras de FNEOs, apenas foi necessário medir o volume de 2 mL, visto que estas são líquidas. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para tubos falcons e posterior digestão ácida.

### 3.3.2 Otimização do procedimento de preparo de amostra utilizando uma chapa de aquecimento

A amostra 1 e o CRM foram utilizadas para o desenvolvimento do procedimento e posterior otimização dos procedimentos de digestão em chapa de aquecimento. Foram utilizados o ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e a quantidade de amostra para avaliar o procedimento com as melhores condições de preparo de amostras. Na **Tabela 5** estão descritas as condições avaliadas. Quanto ao CRM, a massa foi mantida em 250 mg, e o volume do ácido foi avaliado.

**Tabela 5** – Condições avaliadas dos experimentos de digestão da amostra

Condição	Volume de amostra	Concentração HNO <sub>3</sub>	Volume de HNO <sub>3</sub>	Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1	4mL	7 mol L <sup>-1</sup>	4mL	2mL
2	1mL	7 mol L <sup>-1</sup>	2 mL	2mL
3	2mL	7 mol L <sup>-1</sup>	4 mL	2 mL

Em cada condição estudada, uma etapa de pré-digestão da amostra foi realizada, ou seja, o ácido foi adicionado e deixado em contato com as amostras por no mínimo 2 horas, seguida da adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a mistura foi submetida a digestão em chapa de aquecimento.

### 3.4 Preparo de amostra para quantificação da concentração total de Ca, Fe, Mg e Zn.

Para a determinação da concentração total dos analitos estudados foram medidas 2 mL para as amostras líquidas e 2 mL da amostra em pó, após preparada como o fabricante da marca analisada instrui, e foi adicionado uma solução de HNO<sub>3</sub>, 7 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% m m<sup>-1</sup> e mantida em placa de aquecimento a uma temperatura de 120 °C, até que a solução resultante torna-se límpida, conforme pode ser visualizado na **Figura 6**. A Figura 6a mostra as amostras no início da digestão e a 6b o aspecto final das amostras. Após a digestão, os digeridos foram deixados na capela até resfriamento à temperatura

ambiente, em seguida foram transferidos para um frasco volumétrico de 15 mL e o volume foi ajustado com água deionizada. Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra. Em seguida a quantificação foi realizada empregando a técnica MIP OES.

**Figura 6.:** Aspecto visual das amostras no início da digestão ácida (a) e ao final (b).



### 3.5 Otimização do MIP OES

Por padrão, o equipamento indica vários comprimentos de onda para um mesmo elemento a ser determinado. Dessa forma, uma etapa de otimização para cada elemento foi necessária, para isso foram realizadas várias curvas analíticas em diferentes comprimentos de onda. A taxa de fluxo do gás de nebulização e a posição de observação do plasma foram automaticamente otimizados pelo instrumento MP Expert Software (Agilent Technologies).

O plasma é visto na posição radial e o parâmetro da posição de observação do plasma foi otimizado em uma faixa da posição -120 a 120, com o centro da tocha equivalente à posição 0. A taxa de fluxo do gás de nebulização foi otimizada em uma faixa que variou de 0,2 a 1,0 L min<sup>-1</sup>. Essa otimização, foi realizada através de uma aspiração contínua de uma solução multielementar na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> de Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr e Zn e de 50 mg L<sup>-1</sup> de K. Os comprimentos de onda de emissão atômica foram selecionados com base na sensibilidade a cada analito.

### **3.6 Procedimento Analítico para determinação do teor total de Fe, Ca, Mg e Zn.**

Após o procedimento de digestão das amostras descrito na seção 3.4, foram realizadas as determinações dos analitos.

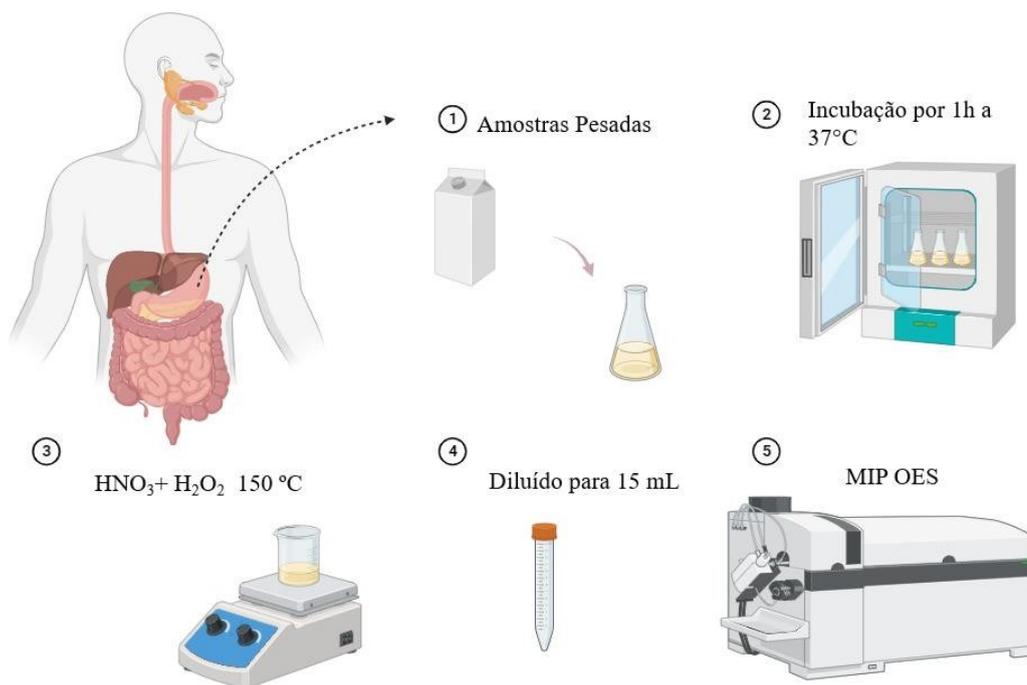
Para a obtenção da curva analítica de Fe e Zn, as soluções padrão foram obtidas a partir de diluições apropriadas das soluções estoque ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), e preparadas nas seguintes concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Para a obtenção das curvas analítica de Ca e Mg foram preparadas sete soluções padrão através da diluição apropriada da solução estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0;  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .

### **3.7 Avaliação da Bioaccessibilidade**

#### **3.7.1 Procedimento de extração do teor bioacessível das amostras utilizando método *in vitro* SBET**

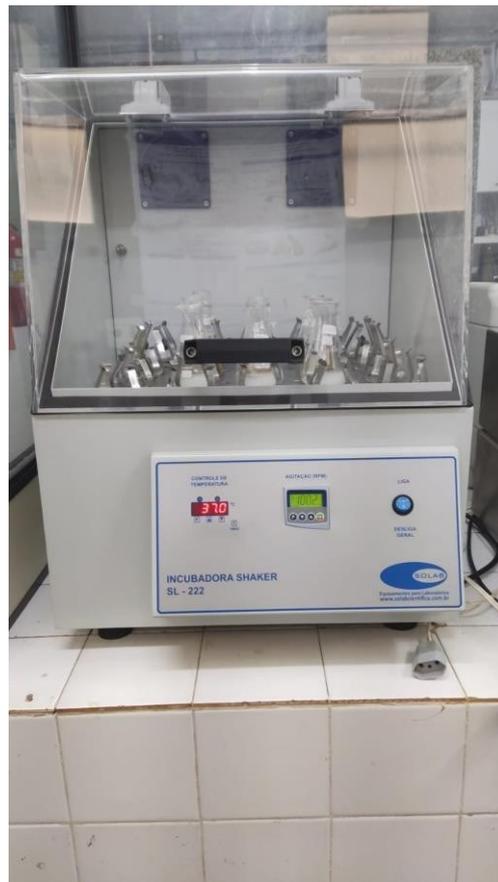
A determinação da bioaccessibilidade de ferro, cálcio, magnésio e zinco nas amostras foi conduzida por meio de extrações, utilizando o teste *in vitro* SBET. Para isso, adaptamos o método original proposto por Oliveira e colaboradores (2016). O procedimento realizado está esquematizado na **Figura 7**.

**Figura 7:** Diagrama esquemático do procedimento SBET aplicado



Para os CLFs foram pesados 500 mg e para as FNEOs foram medidas 5 mL com o auxílio de pipeta volumétrica e transferidas para erlenmeyer de 125ml, adicionados 25 mL da solução  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de glicina/HCl em pH 1,5. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma incubadora *shaker* sob aquecimento de  $37^\circ \text{C}$  e agitação orbital de 100 rpm. Na **Figura 8**, pode ser observada as amostras sob incubação, durante o processo de simulação SBET. Após uma hora, foi retirado 5 mL do sobrenadante e esse volume foi digerido da mesma forma descrita na seção 3.4 com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  para posterior quantificação dos teores bioacessíveis dos analitos por MIP OES.

**Figura 8:** Incubadora *shaker* usada para simulação do SBET e PBET nas amostras.



Os resultados obtidos pelos testes de extração *in vitro* foram comparados com os teores totais para a determinação da bioacessibilidade (%), usando a Eq. (1):

$$BF(\%) = \left(\frac{BE}{TE}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

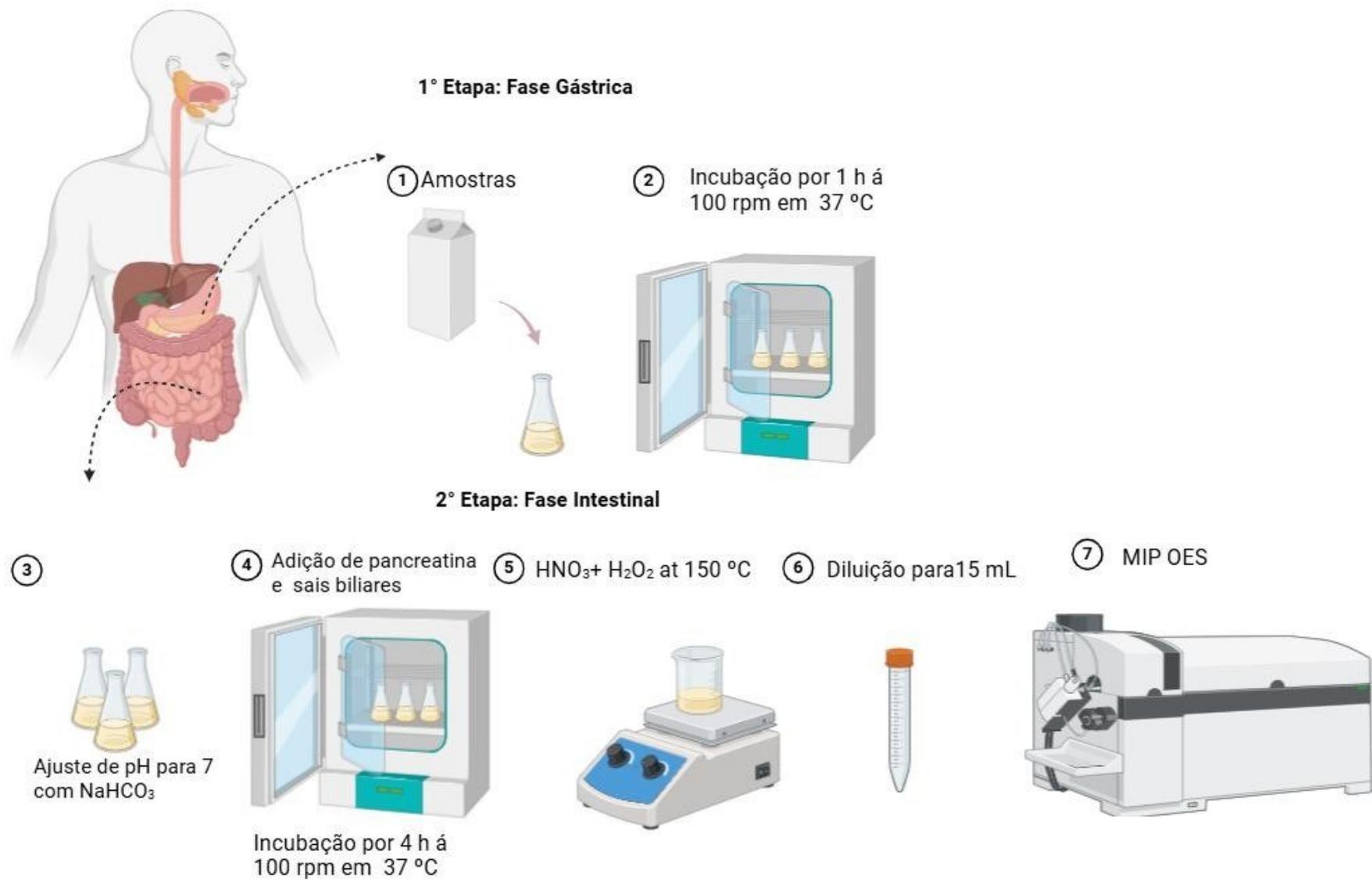
Onde BE é a fração do elemento bioacessível, dada pela concentração do elemento encontrado nos extratos gástricos, e TE corresponde a concentração do teor total dos elementos encontrados nas amostras (SOUZA et al., 2018).

### **3.7.2 Procedimento de extração do teor bioacessível das amostras utilizando método *in vitro* PBET**

Para assegurar a obtenção de dados mais realistas sobre a bioacessibilidade dos analitos, também foi empregado o método PBET, que consiste na simulação em duas etapas da digestão gastrointestinal. Este é baseado no análogo para o trato gastrointestinal humano desenvolvido por Ruby et al. (1999). Na primeira etapa, foi realizada a simulação da digestão gástrica das suplementações. Para isso, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 h com pepsina em pH 2,5, simulando a digestão gástrica. O pH da mistura foi ajustado para 7,0 com solução de NaHCO<sub>3</sub> para simular a condição do intestino humano. Na segunda etapa, foram adicionados 15 mg de pancreatina e 52,5 mg de sais biliares, e esta mistura foi incubada por 4 h nas mesmas condições da fase gástrica, finalizando a simulação da digestão intestinal. O procedimento detalhado está esquematizado na **Figura 9**.

Para as amostras de CLF foram pesados 0,300 g, e para as FNEO foram medidos 5 ml das amostras. O pH de trabalho representa condições gástricas médias ou um estado nutricional intermediário entre os estados de jejum e alimentação (GUANGBO et al., 2023). Ao fim da digestão, foi dado um banho de gelo visando interromper a atividade enzimática e, assim, paralisar a digestão. O conteúdo digerido foi centrifugado, separando-se a fração sobrenadante (solução alimentar bioacessível) do sólido (possível fração excretada pelo organismo). O sobrenadante foi tratado da mesma maneira que está descrita na seção 3.4 e analisado por MIP OES, todas as amostras foram analisadas em triplicata. O objetivo principal dessa simulação era obter dados sobre a disponibilidade dos elementos químicos presentes nas amostras submetidas ao processo de digestão considerando o compartimento gástrico e o intestinal.

**Figura 9:** Diagrama esquemático do procedimento PBET aplicado nas amostras



### 3.8 Parâmetros de Desempenho

Validar uma metodologia é fundamental para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos obtidos. A validação é um processo que envolve a avaliação sistemática de uma metodologia analítica para garantir que ela atenda a requisitos específicos de desempenho, como exatidão, precisão, LOD e LOQ. Após a otimização do preparo das amostras, encarregou-se de validar o procedimento afim de assegurar a obtenção de resultados confiáveis. Os parâmetros de desempenho avaliados neste estudo foram: precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e teste de adição e recuperação.

A validação foi realizada conforme recomendações feitas pelos guias de validação do INMETRO e da AOAC (AOAC, 2002; INMETRO, 2007). A linearidade é a capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação (R) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

O LOD é definido como a concentração mínima de uma substância identificada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003). O limite de detecção foi determinado medindo-se 10 vezes o branco, e o desvio padrão obtido foi multiplicado por 3 e o valor obtido foi dividido pela inclinação da curva analítica.

O LOQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão (INMETRO, 2007). Neste estudo, os limites de quantificação do método foram calculados usando o valor do desvio padrão de 10 medidas da concentração correspondente ao branco e multiplicado por 10 e o valor obtido foi dividido pelo valor da inclinação da curva analítica. (INMETRO, 2007; EURACHEM, 2003). O LOQ é um critério de validação que marca a capacidade de um processo de medição química para quantificar adequadamente um analito.

A exatidão do método foi avaliada utilizando um material de referência certificado (CRM). A exatidão do método analítico refere-se ao grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência aceito, podendo ser demonstrado através da comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado (BARROS, 2004). Neste trabalho, foi usado o material de referência certificado de folhas de

pessegueiro (NIST 1547) obtidos do *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Teste de adição e recuperação foi realizado também com o objetivo de avaliar a eficiência da decomposição ácida em chapa de aquecimento, pois baixos rendimentos do analito podem representar algum tipo de perda nesta etapa do método. Outro motivo para essa avaliação foi investigar possíveis efeitos de matriz, de forma que caso existissem esses efeitos, as intensidades dos sinais de emissão dos analitos seriam afetadas, levando a rendimentos fora da faixa de 80 a 120%, considerado adequado segundo a *AOAC International Official Methods* (AOAC International, 2012). O estudo da recuperação consiste na fortificação da amostra antes da etapa de digestão ácida, ou seja, na adição de concentrações diferentes do analito e posterior determinação.

Para avaliar a exatidão do teste de bioacessibilidade, como não há materiais de referências para essa extração, foi feito o balanço de massa com base no conteúdo total do elemento e na soma dos elementos bioacessíveis e frações residuais para cada nutriente alvo individual (AGUDELO et al., 2017) nesse teste foi usado o NIST 1547. O CRM foi preparado da mesma forma que a descrita na seção 3.7.1 e as frações solúveis e os resíduos foram decompostos com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O procedimento foi avaliado também em termos de precisão, onde a precisão é a concordância entre os valores experimentais obtidos para repetidas análises de uma mesma amostra (INMETRO, 2007). O estudo da precisão foi realizado em termos de repetitividade, através de dez ensaios do procedimento proposto para digestão das amostras de suplementação adulta.

Para as determinações foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ) e os testes  $F$  para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados da ANOVA (ANDRADE, 2012). O teste de significância da regressão consiste na razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo ( $\text{MQreg}/\text{MQr}$ ). Este valor deve ser consideravelmente superior ao ponto crítico da distribuição  $F$ , para um nível de confiança de 95%, considerando os mesmos graus de liberdade. O teste de falta de ajuste, por sua vez, é definido como a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro ( $\text{MQfaj}/\text{MQep}$ ). Nesse caso, o valor deve ser significativamente inferior ao ponto crítico da distribuição  $F$ , para um nível de confiança de 95%, considerando os mesmos graus de liberdade.

# Capítulo 4

---

## **Resultados e Discussão**

---

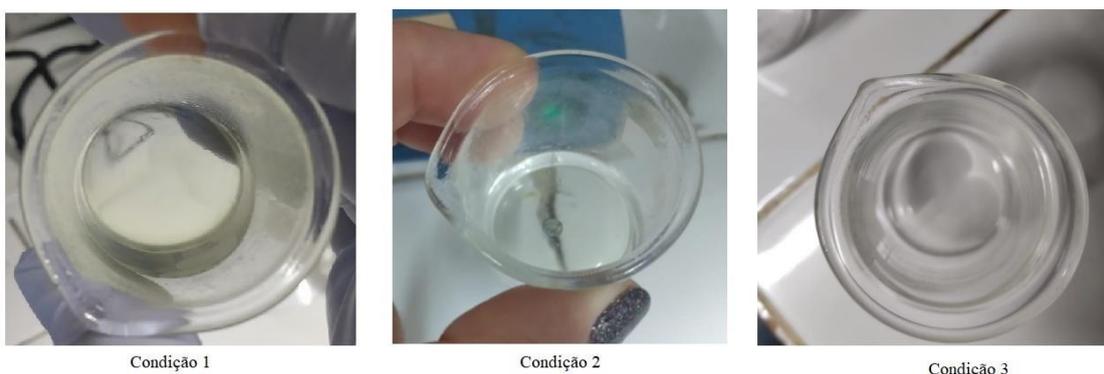
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Avaliação do procedimento de preparo de amostra para determinação do teor total de cálcio e ferro

Para a avaliação da eficiência da etapa de preparo de amostra foi levado em consideração a recuperação dos analitos determinados no Material de Referência Certificado NIST 1547.

Após a decomposição foi realizado uma inspeção visual ao final do procedimento de preparo de amostras nas condições 1, 2 e 3, estudadas na seção 3.3.2, e foi verificado a presença de gotas de gordura sobrenadante a solução dos digeridos, apesar da solução ser bem límpida como pode ser visto na **Figura 10**. Nesse caso, houve a filtração em filtro qualitativo com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, e os digeridos foram transferidos para frascos de tubo Falcon e avolumados para 15 mL. Posteriormente, os digeridos foram analisados por FAAS. Apenas na condição 3 pode-se comprovar a inexistência de material gorduroso ao final da digestão. Deve ser ressaltado que as condições 1 e 2 foram realizadas em uma chapa de aquecimento diferente da utilizada na condição 3, o que pode ter influenciado a etapa de preparo de amostra.

**Figura 10:** Aspectos finais da etapa digestão do material de referência em diferentes condições de estudo.



Após o procedimento de digestão em todas as condições avaliadas conforme descrito na seção 3.3.2, as amostras foram quantificadas por FAAS e as concentrações de recuperação do CRM podem ser observados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Recuperação do CRM nas condições de preparo de amostra avaliados.

<b>Condição avaliada</b>	<b>Ferro (mg kg<sup>-1</sup>) (Amostra 1)</b>	<b>Cálcio (mg kg<sup>-1</sup>) (Amostra 1)</b>	<b>Recuperação do CRM (%)</b>
<b>Condição 1</b>	75	5635	65-Ca 90- Fe
<b>Condição 2</b>	100	5916	91,5 -Ca 87- Fe
<b>Condição 3</b>	134,8	6600	105 -Ca 97- Fe

Todos os procedimentos avaliados tiveram uma boa recuperação para ferro na amostra de CRM utilizada. Contudo, houve uma maior variação para os teores de recuperação de cálcio. O experimento de número 3 foi o que obteve uma maior recuperação dos analitos estudados empregando as seguintes condições: 2 mL das amostras foram digeridas utilizando 4 mL de HNO<sub>3</sub> (7 mol L<sup>-1</sup>) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m m<sup>-1</sup>).

A maior eficiência na condição 3 pode ser atribuída a utilização do menor volume da amostra, o que indica que a quantidade de ácido adicionado é adequada para a digestão, permitindo a total decomposição da gordura restante nas outras condições. Assim, a condição 3 foi a adotada para a determinação dos analitos de interesse.

As condições em que as amostras apresentaram gordura na solução final foram descartadas para a avaliação do teor total desses analitos. De acordo com a literatura, a existência de gordura ao fim da digestão comprova que houve uma digestão parcial da amostra indicando que alguma parte dos analitos podem estar ligados a esse material que não foi totalmente decomposto na digestão, afetando a sua determinação (KRUG, 2010).

## **4.2 Otimização do MIP OES**

Após o estudo descrito na seção 3.5 conclui-se que as melhores condições:

comprimentos de onda de cada elemento e as condições de taxa de gás de nebulização e posição de observação do plasma, foram as que estão expostas na **Tabela 7**.

**Tabela 7** - Comprimentos de ondas e condições operacionais otimizadas empregadas nas análises de suplementação adulta.

<b>Elemento</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Posição de observação do plasma</b>	<b>Taxa de fluxo do gás de nebulização (L min<sup>-1</sup>)</b>
Ca	393,366	0	0,75
Mg	277,983	-10	0,75
Fe	259,940	-10	0,50
Zn	481,05	20	0,55

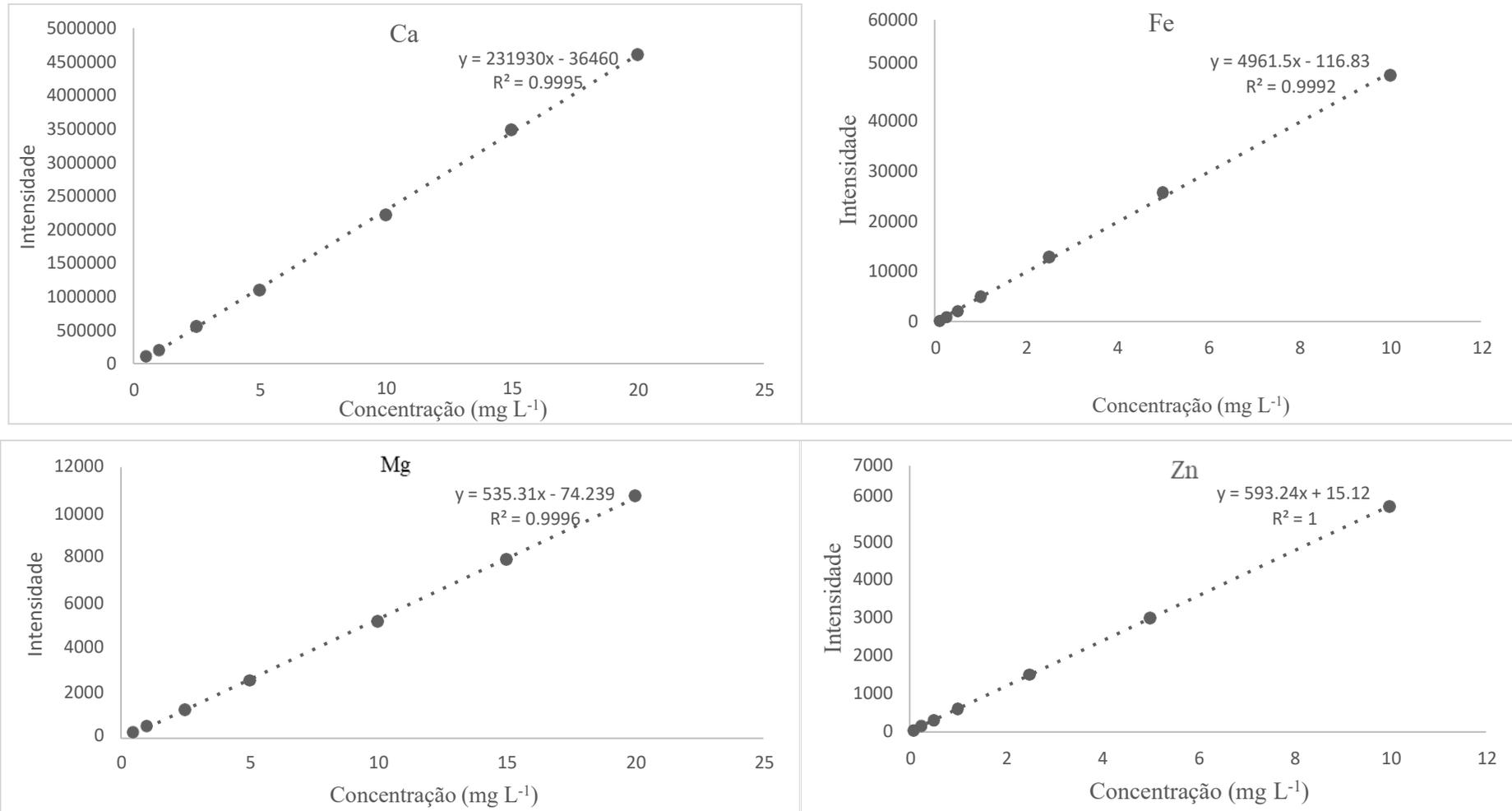
O fabricante do equipamento recomenda que as soluções a serem aspiradas não excedam o limite de 4% do TDS (Teor de Sólido Dissolvido) para evitar o entupimento da tocha causado pelo excesso de deposição de sal. Por isso é importante adotar um fator de diluição adequado para as amostras analisadas, ressaltando que a diluição das amostras digeridas contribui para o controle dos efeitos da matriz e do TDS. Considerando esses fatores e as concentrações estimadas de analitos nas amostras, o fator de diluição e os comprimentos de onda de emissão foram cuidadosamente escolhidos. Para os microelementos (Fe e Zn) o fator de diluição foi de 1,5, e para os macros elementos (Ca e Mg) 25.

### 4.3. Validação da metodologia empregada

#### 4.3.1 Curvas Analíticas

A calibração é uma etapa fundamental em procedimentos analíticos, exigindo geralmente o uso de soluções padrão de referência. Elas servem para construir uma curva de calibração, relacionando a resposta do equipamento com as concentrações conhecidas do analito. É preferível que essa curva seja linear em uma faixa de concentrações do analito. Após o procedimento de digestão das amostras conforme descrito na seção 3.4, os teores dos analitos Fe, Ca, Mg e Zn foram determinados. As curvas analíticas obtidas estão ilustradas na **Figura 11**. As concentrações preparadas para as curvas analíticas de Fe e Zn foram: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Para Ca e Mg, as soluções preparadas foram: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20 mg L<sup>-1</sup> (**Figura 11**).

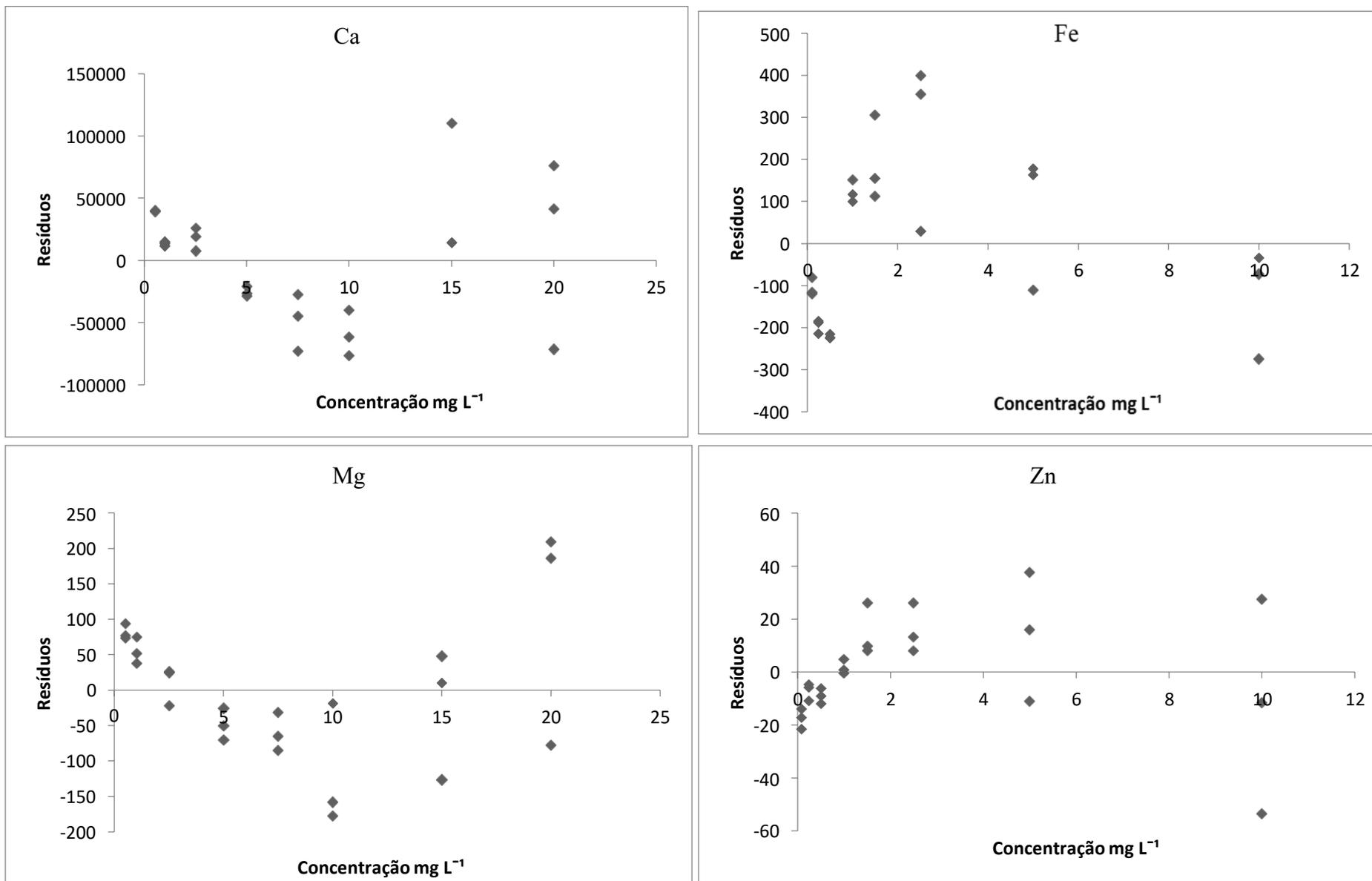
**Figura 11:** Curvas analíticas para quantificação dos analitos obtidos através do MIP OES



O uso das curvas analíticas para a determinação dos analitos estudados é justificado pelos altos coeficientes de determinação  $R^2$ , superiores a 0,9992 para todos os analitos, o que indica uma excelente correlação entre os valores previstos pela curva e os valores reais. A alta correlação representada pelo coeficiente de determinação é um indicador crucial da confiabilidade do método de análise. Isso significa que a equação da curva é altamente capaz de prever com precisão a concentração dos analitos com base nos sinais medidos. Portanto, a robustez das curvas analíticas, valida a eficácia do método analítico empregado, conferindo uma base sólida para a determinação precisa dos analitos em questão e reforçando a confiança na qualidade dos resultados analíticos obtidos.

Também foi realizada a análise de resíduos para as curvas analíticas obtidas, que estão expostos na **Figura 12**. Com base nos gráficos é possível constatar que não há padrões identificáveis nos resíduos provenientes dos modelos de calibração da curva analítica. Isso indica que os erros estão distribuídos de forma aleatória em torno de zero, sugerindo que os erros provenientes do modelo são meramente aleatórios (ANDRADE, 2012). Essa constatação confere confiabilidade as curvas analíticas obtidas. Essa inferência, que inicialmente se baseia em uma análise visual, é respaldada pelos resultados da ANOVA que são apresentados na Tabela 8.

**Figura 12:** Gráfico das análises de resíduo deixadas pelos modelos obtidos através do MIP OES



**Tabela 8** - Teste ANOVA para as curvas de Ca, Fe, Mg e Zn

<b>Analito</b>	<b>Fonte de variação</b>	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>F de significação</b>
<b>Ca</b>	Regressão	1	5,5E+13	5,5E+13	22884,23	1,08E-34
	Resíduo	22	5,29E+10	2,41E+09		
	Total	23	5,51E+13			
<b>Fe</b>	Regressão	1	5,94E+09	5,94E+09	26288,66	2,35E-35
	Resíduo	22	4972765	226034,8		
	Total	23	5,95E+09			
<b>Mg</b>	Regressão	1	2,93E+08	2,93E+08	30441,37	4,69E-36
	Resíduo	22	211872,4	9630,564		
	Total	23	2,93E+08			
<b>Zn</b>	Regressão	1	84906476	84906476	214285	2,24E-45
	Resíduo	22	8717,094	396,2315		
	Total	23	84915193			

Nos casos estudados o teste de significância da regressão evidenciou que a proporção  $MQ_{reg}/MQ_r$  para os analitos excede significativamente o limiar da distribuição  $F$ , com um nível de confiança de 95%. Os valores de  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  para todos os analitos foram menores que os ponto de distribuição  $F$ , considerando um nível de 95% de confiança e os mesmos graus de liberdade. Comprovando assim, que não há evidências de falta de ajuste para os modelos. Isso significa que os modelos adotados se ajustam adequadamente aos dados e que a relação linear entre as variáveis independentes e dependentes é estatisticamente significativa, fornecendo um bom ajuste aos dados disponíveis.

### 4.3.2 Exatidão

Antes do procedimento de digestão ácida ser aplicado nas amostras, foi utilizado um CRM para avaliação da exatidão do procedimento através do teor determinado dos

analitos, conforme descrito na seção 3.6. Na **Tabela 9** são apresentados os teores encontrados no CRM.

**Tabela 9** - Comparação do teor de Ca, Fe, Mg e Zn em mg Kg<sup>-1</sup> determinados por MIP OES pós-digestão ácida, para o material de referência NIST 1547 (n = 3).

<b>Analito</b>	<b>Procedimento proposto</b>	<b>CRM</b>	<b>Recuperação</b>
<b>Cálcio</b>	16380 ± 492,19	15590±160	105,07%
<b>Ferro</b>	211,17±7,08	219,8 ± 6,8	96,07 %
<b>Magnésio</b>	4358,41 ± 61,06	4320 ± 150	100,89 %
<b>Zinco</b>	16,28 ± 2,05	17,97 ± 0.53	90,58 %

A recuperação dos analitos foi calculada a partir da comparação dos teores encontrados no CRM com os teores obtidos pelo procedimento proposto. Os resultados indicam que o procedimento proposto de digestão ácida apresentou boa recuperação para todos os analitos, com valores que variaram de 90,58 % a 105,07%. A recuperação dos analitos é importante para avaliar se o procedimento de digestão ácida está sendo eficiente na extração dos analitos das amostras, o que pode afetar os resultados obtidos. Portanto, pode-se concluir que o procedimento de preparo de amostra adotado é confiável e eficiente na extração dos analitos nas amostras de interesse.

Para a avaliação da exatidão do procedimento SBET na determinação dos valores bioacessíveis, os resultados para o CRM estão apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10** - Concentração dos conteúdos bioacessíveis e residuais de Ca, Fe, Mg e Zn (média  $\pm$  desvio padrão; n = 3) determinados na amostra de CRM após o procedimento SBET ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

<b>Analito</b>	<b>FB</b>	<b>Resíduo</b>	<b>Teor total (FB + Resíduo) determinado</b>	<b>Teor total certificado</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Cálcio</b>	3558 $\pm$ 56	11401 $\pm$ 135	14959 $\pm$ 285	15590 $\pm$ 160	95.96
<b>Ferro</b>	87.9 $\pm$ 3.5	121.6 $\pm$ 4.3	209.6 $\pm$ 5.9	219.8 $\pm$ 6.8	95.48
<b>Magnésio</b>	2674 $\pm$ 115	1831 $\pm$ 110	4506 $\pm$ 120	4320 $\pm$ 150	104.31
<b>Zinco</b>	10.45 $\pm$ 0.73	6.45 $\pm$ 0.29	16.97 $\pm$ 0.9	17.89 $\pm$ 0.53	94.88

Os valores de FB (fração bioacessível) para todos os analitos foram menores que os valores de resíduo, indicando que a maior parte desses elementos estava na forma não bioacessível nas amostras. No entanto, quando somados os valores de FB e resíduo, os teores totais determinados para cálcio, ferro, magnésio e zinco foram bastante próximos dos teores totais certificados, indicando que o procedimento SBET é capaz de extrair uma grande parte dos analitos das amostras. Os valores de recuperação apresentados indicam que o procedimento SBET foi capaz de recuperar, em média, entre 94,88% e 104,31% dos teores totais certificados dos analitos. Esses valores estão dentro do intervalo de aceitação para recuperação, que geralmente varia entre 80% e 120% (AOAC, 2016).

### 4.3.3 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada em termos de repetitividade, através de dez ensaios do procedimento proposto para digestão das amostras de suplementação adulta. Para estes ensaios foi utilizada a amostra 1. A estimativa do coeficiente de variância (CV) está exposta na **Tabela 11** para as amostras de suplementação adulta.

**Tabela 11** - Teste de repetitividade na amostra 1 para determinações por MIP OES (n=10)

<b>Analito</b>	<b>Concentração (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
<b>Cálcio</b>	6600,12	440	6,4
<b>Ferro</b>	134,79	8,16	5,8
<b>Magnésio</b>	607,93	16,90	4,8
<b>Zinco</b>	43,45	2,25	5,2

Os resultados apresentados indicam que o método analítico utilizado para a determinação dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn apresenta uma boa precisão, uma vez que os valores de CV estão abaixo de 10% para todos os analitos. Os resultados sugerem que o método analítico utilizado é preciso e confiável para a determinação desses elementos.

#### **4.3.4 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)**

Os resultados de LOD e LOQ são de extrema importância na validação de métodos analíticos, uma vez que indicam a sensibilidade do método para a detecção e quantificação de analitos em uma amostra. Os valores de LOD E LOQ obtidos para o método de digestão estão apresentados na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Valores de LOQ e LOD para procedimento de digestão ácida realizado para determinação dos analitos por MIP OES.

	<b>Ca</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<b>Fe</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<b>Mg</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<b>Zn</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>LOD</b>	0,0009	0,0023	0,0918	0,0077
<b>LOQ</b>	0,0032 <sup>1</sup>	0,0077	0,3059	0,0256

O método de digestão proposto revelou-se altamente sensível na detecção dos elementos Ca, Fe, Mg e Zinco, como indicado pelos valores muito baixos LOD e LOQ obtidos para os analitos. Esses resultados destacam a capacidade do método em identificar e quantificar esses elementos, mesmo em concentrações extremamente baixas, validando sua eficácia na análise de suplementos para adultos e garantindo a precisão e confiabilidade dos resultados.

#### 4.3.5 Teste de adição e recuperação

Os percentuais de recuperação para Ca, Fe, Mg e Zn são apresentados na **Tabela 13**. A adição dos analitos em diferentes concentrações foram realizadas anteriormente a digestão ácida das amostras.

**Tabela 13** - Recuperações de Ca, Fe, Mg e Zn (em porcentagem, %) adicionadas a amostra de suplementos previamente a digestão ácida (média  $\pm$  desvio padrão; n = 3).

<b>Elemento</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Ca</b>	92 $\pm$ 2.8
<b>Fe</b>	85 $\pm$ 1.4
<b>Mg</b>	94 $\pm$ 3.2
<b>Zn</b>	87 $\pm$ 2.2

As recuperações dos analitos variaram de 85,0 a 94%, demonstrando que todos os analitos foram recuperados quantitativamente, sem perdas significativas durante a digestão. Essas recuperações estão entre 80 e 120%, conforme recomendado pelos métodos oficiais da AOAC International (AOAC, 2016). Pode-se inferir a partir desses resultados que as intensidades de emissão dos analitos não foram significativamente afetadas pelos efeitos da matriz.

É importante notar que os desvios padrão associados a cada recuperação são relativamente baixos, o que sugere uma boa precisão nos resultados. Isso fortalece a confiabilidade dos dados apresentados e aumenta a confiança na validade das recuperações relatadas. Dado que os parâmetros de desempenho foram avaliados com resultados satisfatórios, o procedimento utilizado foi validado e pôde ser empregado na análise de suplementação para adultos.

#### **4.4 Quantificação dos teores totais dos analitos por MIP OES**

As concentrações totais de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras foram determinadas por meio de digestão ácida utilizando 4 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$  e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seguida pela quantificação por MIP OES. O método foi validado e posteriormente aplicado às amostras de CLF e FNEO. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 14**. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata das medidas.

**Tabela 14** - Resultados determinados nas amostras analisadas por MIP OES (média ± desvio padrão, n=3) e valor descrito no rótulo dos alimentos

Amostras	Cálcio		Ferro		Magnésio		Zinco		
	Valor determinado	Valor rotulado	Valor determinado	Valor rotulado	Valor determinado	Valor rotulado	Valor determinado	Valor rotulado	
<b>CLF</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	Amostra 1	6600,12 ± 210	8000	134,79 ± 2,06	137	607,93 ± 16,90	800	43,45 ± 1,22	69
	Amostra 2	8620,44 ± 47,04	8000	77,51 ± 0,74	95	850,67 ± 5,78	800	42,93 ± 2,96	73
	Amostra 3	5483,65 ± 94,74	4500	35,99 ± 1,87	40	932,09 ± 54,37	750	39,47 ± 3,05	47
<b>FNEO</b> (mg L <sup>-1</sup> )	Amostra 1	1023,67 ± 27,46	1000	12,27 ± 1,68	26	597,97 ± 5,93	420	41,63 ± 2,01	24
	Amostra 2	632,52 ± 22,53	700	8,85 ± 0,62	13	255,47 ± 2,24	220	6,57 ± 0,25	10
	Amostra 3	564,83 ± 10,58	800	10,88 ± 1,02	20	257,98 ± 3,77	380	9,96 ± 0,30	18

Com base nos valores apresentados na **Tabela 14**, pode-se observar que dentre as amostras de CLF, a amostra 1 apresentou o maior teor de Fe e Zn, sendo que apenas o valor determinado de Fe estava condizente com a informação rotulada, conforme a **Tabela 14**. A amostra 2 apresentou o maior teor de Ca e a menor variação entre a informação apresentada no rótulo e os valores encontrados neste trabalho. Esta amostra indica que fornece 8000 mg kg<sup>-1</sup> de cálcio, enquanto o valor encontrado foi de 8620 mg kg<sup>-1</sup>. Observa-se que todas as amostras apresentaram valores de cálcio muito distinto das informações rotuladas. O mesmo foi observado no trabalho de Kich e Balestrin (2019), em que os autores relataram a discrepância entre as informações rotuladas e as encontradas para cálcio em amostras de leite.

Vale destacar que, para esse tipo de amostra, a fiscalização é realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No entanto, a Instrução Normativa nº 28 de 12/06/2007 orienta de forma ampla, não especificando teores máximos ou mínimos de minerais para esse tipo de alimento. A amostra 3 foi a que obteve a menor concentração de ferro e obteve a maior concentração de Mg e menor concentração de Zn. Essa amostra obteve a maior discrepância entre a informação obtida no rótulo já que na embalagem há indicação de 750 mgkg<sup>-1</sup> e o valor encontrado neste trabalho foi 932 mg kg<sup>-1</sup> um valor cerca de 25 % maior do que a informação rotulada. Um percentual considerável já que em outros estudos o percentual considerado normal era um valor de até 20% (ABE-MATSUMOTO et al., 2018; ITURBIDE-CASAS et al., 2019).

Ao comparar os valores determinados e os rotulados, percebe-se que, em relação aos CLF, os valores indicados nos rótulos das amostras são significativamente diferentes dos valores determinados nas análises. Isso sugere que pode haver uma imprecisão nas informações dos rótulos das amostras ou que os processos de produção e armazenamento das amostras podem ter influenciado nos teores dos minerais.

Já para as amostras de FNEO, observa-se que a amostra 1 é a que apresenta a maior concentração de todos os minerais estudados. Observou-se que para estas amostras a descrição do rótulo não variou como nas amostras de compostos lácteos, houve uma variação de 12 a 15 % dos valores descritos nas embalagens comparados aos encontrados neste trabalho, uma variação aceitável de acordo com ANVISA (ANVISA, 2003). A princípio, pode-se observar que todas as amostras analisadas apresentaram um alto valor de cálcio e magnésio principalmente, esses valores são esperados visto que as amostras

em análise apresentam nas embalagens alta concentração do analitos estudados.

Iturbide-Casas e colaboradores (2019) analisaram fórmulas de nutrição enteral para determinação de Ca, Mg, Fe e Zn e outros minerais e concluíram que, embora as amostras às vezes tenham um conteúdo mineral mais baixo do que o indicado no rótulo, eles ainda são boas fontes desses minerais, como também observado neste trabalho. Evidenciando assim que as FNEO são boas fontes desses minerais quando considerado o teor total de cada mineral em sua composição.

## **4.5 Determinação da bioacessibilidade dos analitos**

Nesta etapa foram realizados dois testes amplamente utilizados na literatura o SBET e o PBET para avaliar a bioacessibilidade dos analitos Ca, Fe, Mg e Zn. A seguir, serão detalhados os resultados obtidos em ambos os testes.

### **4.5.1 Determinação da bioacessibilidade usando o SBET**

Os estudos de bioacessibilidade fornecem informações importantes sobre a quantidade possível de espécies químicas que serão absorvidas pelo organismo durante a digestão. A análise em compostos fortificados para idosos é importante para avaliar a eficácia da fortificação nutricional nessa população. À medida que envelhecemos nosso sistema digestivo e absorção de nutrientes podem ser afetados, o que pode levar a uma absorção reduzida de nutrientes essenciais (VURAL et al., 2020).

Para determinar a bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Zn, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração do teor bioacessível SBET descrito na seção 3.7.1, logo após quantificação por MIP OES. Os resultados da fração bioacessível obtidos nas amostras estudadas estão expostos na **Tabela 15**.

**Tabela 15** - Teor bioacessível (%) quantificado nas amostras analisadas por meio do SBET (n=3).

	<b>Amostras</b>	Ca	Fe	Mg	Zn
<b>CLF</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	Amostra 1	28,01	23,41	35,09	47,18
	Amostra 2	14,26	33,07	21,81	35,42
	Amostra 3	16,85	35,24	22,47	33,00
<b>FNEO</b> (mg L <sup>-1</sup> )	Amostra 1	29,86	37,80	38,75	41,02
	Amostra 2	62,43	65,86	46,75	64,86
	Amostra 3	48,40	63,68	33,05	35,06

A partir dos resultados obtidos nas análises das amostras de CLF, pode-se observar que a amostra 1 apresentou o maior teor bioacessível de cálcio indicando que apenas cerca de ¼ do Ca presente na amostra é absorvido pelo organismo, enquanto que quase metade do zinco é bioacessível. Essa diferença pode ser explicada pelas interações que esses nutrientes têm com outros componentes da amostra, bem como pela capacidade do organismo em absorvê-los. Na amostra 3, é interessante observar que o teor bioacessível de Fe é maior do que nas outras amostras, enquanto que a amostra 2 apresenta o menor teor bioacessível de Ca.

Os resultados obtidos nas análises das amostras de CLF revelaram que ao comparar os teores bioacessíveis, expressos como porcentagens, com as concentrações totais de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras, observa-se diferenças marcantes, mesmo com altas concentrações totais de minerais, como observado na amostra 1 para Ca, os teores bioacessíveis foram relativamente baixos. Similarmente, o mesmo padrão foi observado para Fe, Mg, e Zn, sugerindo que uma proporção significativa desses minerais nas amostras de CLF pode não ser facilmente absorvida pelo organismo humano durante a digestão.

Ao analisar as amostras de FNEO, pode ser observado que a amostra 1 apresentou os mais baixos valores de bioacessibilidade para os analitos Ca e Fe. Na amostra 2, observa-se que todos os nutrientes apresentaram os valores mais elevados de bioacessibilidade, sendo que para Ca e Zn os valores foram ainda maiores do que nas

outras amostras, indicando que essa amostra pode ser a mais eficiente na disponibilização desses nutrientes para o organismo. Na amostra 3, observa-se que o teor bioacessível de ferro é o mais elevado entre os elementos estudados, enquanto que o de magnésio é o menor. É importante ressaltar que, apesar das diferenças nos teores bioacessíveis dos nutrientes, todas as amostras analisadas apresentam quantidades significativas de cálcio, ferro, magnésio e zinco bioacessíveis.

A bioacessibilidade dos elementos nas amostras variou de 14% a 62% para Ca, 23% a 65% para Fe, 21% a 46% para Mg e 33% a 64% para Zn. É importante ressaltar que a bioacessibilidade de minerais pode variar amplamente devido a diversos fatores, como as interações que esses nutrientes têm com outros componentes da amostra, bem como pela capacidade do organismo em absorvê-los. Em alguns casos, os nutrientes absorvidos podem estar em uma forma que não pode ser metabolizada pelo organismo (DAMODARAN et al., 2010).

Os resultados da análise das amostras de CLF e FNEO indicam que esses alimentos podem ser boas fontes de Ca, Fe, Mg e Zn bioacessíveis, indicando que a concentração total descrita no rótulo de um produto alimentício não implica na sua acessibilidade ao organismo. É importante considerar que a quantidade bioacessível de cada nutriente varia de amostra para amostra, o que sugere a necessidade de avaliar a composição nutricional de cada alimento individualmente antes de recomendá-lo para consumo.

De maneira geral, observa-se que as amostras de CLF apresentaram menores valores de bioacessibilidade em comparação com as amostras de FNEO. Essa discrepância nos resultados pode ser atribuída a diversas variáveis, incluindo a composição química das amostras, a estrutura molecular dos compostos presentes e os processos de interação que ocorrem durante a digestão gastrointestinal (PEIXOTO et al., 2016).

Estudos têm sugerido que a bioacessibilidade na fase gástrica pode ser maior do que na fase intestinal, devido ao baixo pH do fluido gástrico (em torno de 1,5). Em um ambiente ácido como esse, a solubilidade dos metais pode aumentar, levando à liberação e dissolução dos minerais das amostras. Além disso, durante a fase gastrointestinal, podem ocorrer processos de precipitação, complexação e absorção, que afetam a disponibilidade dos minerais para absorção pelo organismo (TOKALIOGLU et al., 2014).

Esses estudos ressaltam a importância de considerar não apenas a composição

total dos minerais nas amostras, mas também sua bioacessibilidade, que reflete a quantidade efetivamente disponível para absorção pelo corpo humano. A compreensão desses processos de liberação e interação durante a digestão pode fornecer *insights* importantes para a formulação de alimentos e suplementos nutricionais com melhor biodisponibilidade de minerais essenciais.

#### 4.5.2 Determinação da bioacessibilidade usando o PBET

A determinação da bioacessibilidade dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn foi realizada também por meio do teste *in vitro* PBET esse teste tem a finalidade de avaliar a fração de um nutriente presente em uma amostra que é potencialmente absorvível pelo trato gastrointestinal. Para isso as amostras foram submetidas ao procedimento de extração do teor bioacessível PBET descrito na seção 3.7.2, logo após quantificação por MIP OES. Os resultados da bioacessibilidade nas amostras estudadas estão expostos na **Tabela 16**.

**Tabela 16:** Teor bioacessível (%) quantificado nas amostras analisadas por meio do PBET

	<b>Amostras</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>	<b>Zn</b>
<b>CLF</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	Amostra 1	15,96	12,75	30,35	13,71
	Amostra 2	8,79	26,83	16,23	37,58
	Amostra 3	10,44	20,78	19,06	18,93
<b>FNEO</b> (mg L <sup>-1</sup> )	Amostra 1	17,96	41,50	15,5	30,94
	Amostra 2	31,78	27,45	35,33	46,92
	Amostra 3	36,87	38,10	26,78	25,13

Observando os dados obtidos para CLF, pode ser visto que a amostra 1 apresentou teores bioacessíveis de 15,96% de Ca, 12,75% de Fe, 30,35% de Mg e 13,71% de Zn. Isso indica uma boa disponibilidade de cálcio e magnésio, mas uma menor quantidade de ferro e zinco em comparação com as outras amostras de CLF. Quanto à amostra 2, os níveis de bioacessibilidade foram de 8,79% para cálcio, 16,23% para magnésio e 37,58% para zinco, enquanto o teor de ferro foi relativamente alto, alcançando 26,83%. A amostra 3 demonstrou teores bioacessíveis intermediários quando comparado com as amostras 1 e 2, e os valores foram de 10,44% para Ca, 20,78% para Fe, 19,06% para Mg e 18,93% para Zn. Esses resultados são coerentes com um estudo prévio realizado por Bossu e colaboradores (2020), que investigaram a bioacessibilidade *in vitro* utilizando enzimas e sais biliares para simular a digestão gástrica dos elementos Zn e Ca em amostras de leite. Eles observaram uma faixa de 12 a 20% para cálcio e de 9 a 11% para zinco, valores próximos aos encontrados para as amostras de CLF. Essa correlação destaca a consistência dos dados e reforça a validade dos resultados obtidos para as amostras analisadas.

Para as amostras de FNEO, a amostra 1 apresentou teores bioacessíveis de 17,96% de Ca, 41,50% de Fe, 15,5% de Mg e 30,94% de Zn, esta amostra parece ser uma fonte promissora de ferro, enquanto ainda mantém níveis razoáveis de cálcio e zinco. A amostra 2 apresentou os maiores teores bioacessíveis de Ca 31,78%, Fe de 27,45%, Mg de 35,33% e Zn 46,92%. A partir destes valores, pode-se observar que esta amostra é a mais enriquecida em minerais, especialmente Ca e Zn. A amostra 3 apresentou teores de 36,87% para Ca, 38,10% de Fe, 26,78% de Mg e 25,13% de Zn, essa amostra também mostrou níveis elevados de cálcio e ferro, tornando-se também outra boa opção para a suplementação mineral baseado nos valores determinados.

A partir dos resultados acima, observa-se que as amostras de FNEO apresentam teores mais elevados de minerais bioacessíveis em comparação com as amostras de CLF. Os teores bioacessíveis de todos os minerais são mais altos (exceto Mg) para as amostras de FNEO em comparação com as amostras CLF, indicando uma possível maior biodisponibilidade das amostras de FNEO. Isso pode ser devido a diferenças na composição mineral, processamento ou forma de apresentação das amostras (PEIXOTO et al., 2016).

Esses resultados destacam a importância de investigações adicionais para compreender os fatores que afetam a biodisponibilidade dos minerais em diferentes tipos

de amostras. Estudos futuros poderiam explorar os mecanismos subjacentes à liberação e absorção de minerais durante a digestão e identificar estratégias para melhorar sua biodisponibilidade em alimentos e suplementos dietéticos.

#### **4.6 Comparação dos métodos SBET e PBET**

Os dois métodos têm sido amplamente utilizados na área da ciência dos alimentos e da nutrição para avaliar a fração de nutrientes que é potencialmente absorvível pelo trato gastrointestinal humano (SANTOS et al., 2018).

O método SBET é projetado para simular a solubilização de minerais em condições fisiológicas ao longo do trato gastrointestinal. Este teste envolve uma única etapa de extração combinando a digestão gástrica e intestinal. A amostra é submetida a um meio ácido para simular as condições estomacais, seguido por uma etapa de neutralização para simular as condições intestinais. A partir das concentrações de minerais liberadas durante essas etapas, a bioacessibilidade dos nutrientes na amostra é determinada (MENDOZA et al., 2017).

Por outro lado, o método PBET é mais complexo e envolve duas etapas distintas de extração que simulam separadamente a digestão gástrica e intestinal. Durante a etapa de digestão gástrica, a amostra é exposta a um meio ácido para liberar os minerais da matriz da amostra. Em seguida, durante a etapa de digestão intestinal, um tampão de bicarbonato é adicionado para simular as condições alcalinas do intestino delgado e facilitar a absorção dos minerais liberados. A bioacessibilidade é então calculada a partir das concentrações de minerais obtidas em ambas as etapas (MNISI et al., 2017).

Ambos os métodos possuem vantagens e limitações. O método SBET é mais simples e rápido de executar, sendo adequado para análises de rotina. No entanto, ele pode subestimar a bioacessibilidade de certos minerais devido à sua abordagem simplificada. O método PBET é mais representativo das condições fisiológicas reais do trato gastrointestinal, fornecendo uma estimativa mais precisa da bioacessibilidade dos nutrientes. No entanto, sua execução é mais complexa e demorada (LI et al., 2014).

A escolha entre os métodos SBET e PBET depende das necessidades específicas da pesquisa ou aplicação. Ambos os métodos podem ser empregados para avaliar a bioacessibilidade de elementos em diferentes amostras alimentícias, fornecendo informações importantes para a formulação de dietas balanceadas e a avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. A análise comparativa entre os métodos SBET e

PBET revelou diferenças significativas na extração de elementos traço. No SBET, a predominância de extração ocorre devido à acidez mais elevada do meio gástrico, facilitando a solubilização desses íons. Utilizou-se uma solução extratora composta apenas por glicina a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , ajustada para pH 1,5 com ácido clorídrico concentrado para simular o compartimento gástrico no SBET, enquanto no PBET foram empregados pepsina, malato e citrato.

Durante o processo digestivo, as enzimas presentes no trato digestivo facilitam transformações químicas essenciais, catalisando a hidrólise de proteínas, amidos e gorduras, tornando os minerais e vitaminas lipossolúveis mais acessíveis para as funções metabólicas (FERREIRA, 2023).

Os resultados mostram que, entre os elementos analisados, o Ca, Fe, e Zn apresentaram os maiores percentuais de extração no SBET, chegando a taxa de absorção superior a 60% para algumas amostras. Foi observado também que para Ca a maior bioacessibilidade foi observada quando o método SBET foi empregado, devido ao fato de que no compartimento intestinal, a solubilidade deste elemento cai substancialmente devido ao aumento do pH para 7. No entanto, a queda da solubilidade depende da fonte de cálcio. O Mg mostrou uma distribuição mais equitativa entre SBET e PBET.

Os resultados quantitativos da bioacessibilidade dos elementos traço nas amostras analisadas são apresentados nas Tabelas 15 e 16. Observa-se que o PBET apresentou uma maior porcentagem de extração em relação aos elementos traço, enquanto o SBET extraiu predominantemente magnésio e cálcio. Consequentemente, a análise desses resultados proporciona uma compreensão mais profunda da disponibilidade de elementos traço nos suplementos nutricionais investigados.

#### **4.7 Contribuição do consumo de CLF e FNEO para a recomendação dose diária**

De acordo com a Anvisa (2005), existe uma quantidade recomendada de ingestão diária (IDR) para cada nutriente pelo organismo, a fim de atender às necessidades nutricionais individuais e manter a saúde. As amostras de CLF e FNEO mostraram ser boas fontes de Ca, Fe, Mg e Zn. Contudo, a consideração da fração bioacessível ocasiona a diminuição da contribuição dos valores de concentração. A contribuição de cada amostra foi calculada com base nos teores totais e bioacessíveis de cada analito,

considerando a porção recomendada de ingestão pelo fabricante, considerando o IDR para cada analito para adultos cerca de 70 kg (ANVISA, 2005).

Ao observar os valores da **Tabela 17**, nota-se que as amostras de CLF apresentaram uma maior contribuição na ingestão de cálcio e ferro quando comparadas com as fórmulas modificadas. Por outro lado, as fórmulas modificadas apresentaram contribuições variáveis para os elementos em questão, sendo que em alguns casos as contribuições foram maiores do que as observadas nas amostras de compostos lácteos fortificados. Vale lembrar que as amostras de fórmula modificada analisadas neste trabalho possuíam um conteúdo de 200 mL e a porção de compostos lácteos poderia ser utilizada para produzir de 150 a 200 mL de bebida pronta a depender do fabricante de cada amostra.

**Tabela 17** - Contribuição dos elementos ao IDR nas amostras considerando o teor total

		<i>Contribuição (%)</i>					
		<i>CLF*</i>			<i>FNEO**</i>		
<i>Elemento</i>	<i>IDR para adultos</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>
<i>Cálcio</i>	1000 mg	20,80	23,70	29,5	20,5	12,6	11,3
<i>Ferro</i>	14 mg	30,32	15,22	13,8	17,5	12,6	15,5
<i>Magnésio</i>	260 mg	7,37	9,00	19,3	46,0	19,6	19,8
<i>Zinco</i>	7mg	19,55	16,9	30,3	37,3	18,8	28,5

\*Levando em consideração uma porção recomendada pelo fabricante de cada amostra

\*\*Levando em consideração uma porção de 200mL

Em relação ao cálcio, pode-se observar que ele é o elemento mais presente em ambas as amostras, com contribuição variando de 11,29% a 29,49% para o IDR. No que se refere ao ferro, pode-se observar que a contribuição para o IDR varia entre 13,82% e 30,32%, sendo mais expressiva em amostras de CLF. O magnésio, por sua vez, apresentou uma contribuição para o IDR que variou de 7,37% a 46%, sendo mais

expressiva em amostras de FNEO. Por fim, o zinco apresentou uma contribuição que variou entre 16,86% e 37,35% para o IDR. Em geral, os resultados indicam que as amostras de CLF e FNEO podem ser fontes importantes desses minerais para indivíduos que necessitam de suplementação nutricional. No entanto, é importante destacar que outras fontes alimentares devem ser consideradas para atingir o IDR completo de todos os nutrientes necessários para uma alimentação saudável e equilibrada.

Levando em consideração o teor bioacessível encontrado nas amostras pelo método SBET pode-se observar que a contribuição ao IDR diminuiu em até 85% como exposto na **Tabela 18**.

**Tabela 18** - Contribuição dos elementos ao IDR nas amostras considerando o teor bioacessível.

<i>Contribuição (%)</i>							
		<i>CLF*</i>			<i>FNEO**</i>		
<i>Elemento</i>	<b>IDR para adultos</b>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>
<i>Cálcio</i>	1000 mg	5,82	3,33	4,97	6,11	7,90	5,47
<i>Ferro</i>	14 mg	7,10	5,03	4,87	6,62	8,33	9,90
<i>Magnésio</i>	260 mg	2,58	1,96	4,33	17,82	9,18	6,56
<i>Zinco</i>	7mg	9,22	5,98	10,00	15,3	12,17	9,98

\*Levando em consideração uma porção recomendada pelo fabricante de cada amostra

\*\*Levando em consideração uma porção de 200mL

No geral, a bioacessibilidade das amostras de CLF influenciou pouco ao IDR com menos de 10 % de contribuição para Ca, Fe, Mg e Zn. Para as amostras de FNEO há um ligeiro aumento na contribuição chegando até 18%. Pode-se observar que as amostras de FNEO obtiveram maiores valores de contribuição para todos os analitos estudados com ênfase para Mg. Ao comparar os resultados da **Tabela 17** (considerando o teor total dos elementos) com a **Tabela 18** (considerando a bioacessibilidade), podemos notar

diferenças significativas nas contribuições percentuais de cada elemento para o IDR com queda de até 85% de contribuição quando se compara o teor bioacessível na mesma porção. Pode-se concluir que a bioacessibilidade e a composição das amostras podem afetar significativamente a contribuição dos elementos para o IDR. Portanto ao comparar a ingestão de Ca, Fe, Mg e Zn recomendada no IDR há uma boa ingestão desse mineral a partir dos resultados de teor total, principalmente para as amostras de compostos lácteos. Porém, ao fazer a mesma comparação no teor bioacessível temos uma baixa porcentagem de ingestão, mesmo sendo uma fonte rica nesse nutriente.

Este resultado demonstra a importância de se considerar e inserir as bioacessibilidades dos nutrientes em tabelas de composição de nutrientes dos alimentos fornecendo informações nutricionais mais realistas e podem ser úteis para selecionar as melhores amostras para serem utilizadas em dietas específicas ou na produção de alimentos enriquecidos. É importante ressaltar que as quantidades da fração bioacessível desses minerais podem ter sido superestimados devido o teste ser feito considerando apenas o compartimento estomacal (SANTOS e NANO, 2015).

## CONCLUSÕES

---

O método de digestão usando  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi otimizado e empregado para avaliar as concentrações totais de Ca, Fe, Mg e Zn se mostrou eficaz para as análises nas amostras de suplementação demonstrando que o procedimento de preparo de amostra é adequado para essas análises. O método proposto foi validado e aplicado para a determinação dos analitos em seis amostras de suplementação adulta por MIP OES. A técnica se mostrou apropriada para a determinação dos analitos sendo prática e rápida, podendo oferecer uma alternativa mais econômica às técnicas de análise tradicionais de rotina, visto que funciona à base de  $\text{N}_2$ . A análise total e bioacessível dos elementos inorgânicos utilizando um instrumento multielementar de MIP OES foi realizada de maneira simples, rápida e confiável.

Os métodos SBET e PBET foram usados para determinar a bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Zn nas amostras de suplementação adulta e confirmaram que menores quantidades de minerais são extraídas ao usar o método que simula condições gastrointestinais (PBET) quando comparado ao método que simula apenas a condição do compartimento estomacal (SBET). Isso pode, de fato em certos cenários, resultar em uma superestimação da bioacessibilidade. Contudo, essa tendência não é universal, já que ela pode diferir de elemento a elemento e entre diferentes matrizes alimentares.

A partir dos resultados, foi possível concluir que a avaliação da bioacessibilidade se torna importante para avaliar o teor nutritivo de suplementação adulta visto que os teores rotulados nem sempre estão acessíveis ao organismo, portanto considerar as condições gástricas simuladas fornecem valores reais de absorção dos minerais pelo corpo humano.

As importâncias dos resultados para a bioacessibilidade desses elementos nas amostras de compostos lácteos fortificados informações inéditas a respeito do comportamento de Ca, Fe, Mg e Zn nas condições gástricas simuladas e fornecem valores do teor bioacessível que podem ser absorvidos pelo corpo humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABE-MATSUMOTO, L. T., SAMPAIO, G. R., BASTOS, D. H. M. Do the labels of vitamin A, C, and E supplements reflect actual vitamin content in commercial supplements. 2018. **Journal of Food Composition and Analysis**, 72, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.001>.

AGUDELO, Mónica Alejandra Herrera. **Estudo da bioacessibilidade in vitro (estática e dinâmica) de alguns metais de importância biológica em sementes de soja transgênica e não-transgênica.** (2015). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química.

AGUDELO, M.A H., MIRÓ, M., ARRUDA, M.A.Z. In vitro oral bioaccessibility and total content of Cu, Fe, Mn and Zn from transgenic and nontransgenic precursor/successor soybean seeds. 2017. **Food Chemistry**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.017>.

ALMEIDA, C. A. N. et al. Fatores associados à anemia por deficiência de ferro em crianças pré-escolares brasileiras. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 229-234, maio/jun. 2004.

ALMEIDA, G.; MELO, M. S.; POPOV C. G. P.; Biodisponibilidade de cálcio numa dieta isenta de leite de vaca e derivados **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, vol. 15, núm. 3, pp. 147-158, Universidade Anhanguera Campo Grande, Brasil. 2011.

ANDRADE, L. S.; MARREIRO, D. N. Aspectos sobre a relação entre exercício físico, estresse oxidativo e zinco. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 4, p. 629-640 2011.

ANDRADE, S. I. E., LIMA, M. B., BARRETO, I. S., LYRA, W. S., ALMEIDA, L. F., ARAÚJO, M. C., & SILVA, E. C. (2013). A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al (III) and Cr (VI) in water. **Microchemical Journal**, 109, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.029>

ANDREKOWISK FIORAVANTI, M. I., MILANI, R. F., LIMA DE PAIVA, E., & MORGANO, M. A. (2020). Influence of various ingredients on mineral bioaccessibility in infant formula and whole milk. **International Dairy Journal**, 104808. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104808.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 150, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 de abril de 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (2016). Guidelines for Standard Method Performance Requirements; **AOAC Official Methods of Analysis**. Available at [http://www.eoma.aoc.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf). Accessed 20 May 2022.

ARRUDA, M. A. Z., Ed., Trends in Sample Preparation. **Nova Science Publishers**, New York, 2007.

AZEVEDO, CATARINA ISABEL COSTA. **A Importância dos Minerais na Indústria Farmacêutica e Cosmética**. Diss. Universidade Fernando Pessoa (Portugal), 2018.

BALARAM, V., V. DHARMENDRA, P. ROY, C. TAYLOR, C.T. KAMALA, M. SATYANARAYANAN, P. KAR, K.S.V. SUBRAMANYAM, A.K. RAJU, A. KRISHNAIAH, **Analysis of geochemical samples by microwave plasma-AES**, *At. Spectrosc.* 35 (2014) 65–78.

BALARAM, V., **Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry (MP-AES) and its Applications – A Critical Review**, *Microchemical Journal* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105483>.

BALESTRIN, P.; KICH, A. R. **Determinação de cálcio em amostras de leite integral por volumetria de complexação**. In: 26 Encontro de Química da região Sul, 2019, Caxias do Sul. Anais do 26 Encontro de Química da Região Sul, 2019.

BARAUD, F., ZAITER, A., PORÉE, S. et al. New approach for determination of Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn in sewage sludges, fired brick, and sediments using two analytical methods by microwave-induced plasma optical spectrometry and induced coupled plasma optical spectrometry. *SN Appl. Sci.* 2, 1536 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03220-0>

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 3. ed. Campinas, SP: **Editora Unicamp**, 2007. ISBN 978-85-268-0753-2.

BENITO, P., MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*, v. 18, n., p. 581-603, 1998.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar o (Bio)disponibilidade de Pb em solos contaminados. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 394-400, 2008.

BOSSU, Carla M.; MENEZES, Eveline A.; NOGUEIRA, Ana Rita A. Bioacessibilidade de zinco, cálcio e fósforo em extrato de soja e amostras de leite bovino, caprino e ovino. *Química Nova*, v. 43, p. 718-722, 2020. <https://www.scielo.br/j/qn/a/tvQ9CZB8Df34btxsHJwGhxf/?lang=pt>.

BOSSU, M.C.; MENEZES, A. E.; NOGUEIRA, A. R. A. **Biodisponibilidade de zinco em amostras de leite**. 1º encontro brasileiro de especiação química. São Pedro, SP, 2008.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa. Instrução Normativa Mapa instrução Normativa nº 28 de 12/06/2007, Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Composto Lácteo. 2007.

**BRASIL.** Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (idr) de proteína, vitaminas e minerais. Resolução RDC, nº269, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_269\\_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3)>. Acesso em 14 de julho de 2020.

BREITHAUPT, D. E.; YAHIA, E. M.; VILAZQUEZ, F. J. V. Comparison of the absorption efficiency of alpha and beta-cryptoxanthin in female wistar rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 97, n. 2, p. 329-336, feb. 2007.

BRIGIDE, P. et al. Bioacessibilidade de minerais em combinações de alimentos biofortificados com Fe, Zn e vitamina A. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-8, 2021. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-021-04966-0>

CALLOU K.R.A.; SILVA, M.C.F. **Biodisponibilidade de micronutrientes e compostos bioativos: aspectos atuais**, Rev Eletrônica Estácio Recife. Vol. 1 - N0 1 2016.

CAMPOS, N. S. et al. Multivariate approach to assess in vitro Fe bioaccessibility in chicken meat. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 157-163, 2017.

CARBONELL-CAPELLA JM, BUNIEWSKA M, BARBA FJ, ESTEVE MJ, FRÍGOLA A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Compr Rev Food Sci Food Saf**. 2014 Mar;13(2):155-171. doi: 10.1111/1541-4337.12049. PMID: 33412647.

CARDOSO, C., AFONSO, C., LOURENÇO, H., COSTA, S., NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2015.

COELHO, Hugo Alexandre et al. Eficiência agrônômica da aplicação foliar de nutrientes na cultura da soja. **Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 73-78, 2011.

CORREIA, M. I. T.; PERMAN, M. I.; WAITZBERG, D. L. Hospital malnutrition in Latin America: A systematic review. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 4, p. 958-967, 2017.

COZZOLINO S. M. F. Deficiências de minerais. *Estud Av* 2007;21(60):119-26.

COZZOLINO, S. M. F.; **Biodisponibilidade de minerais**. *Rev. Nutr.* [online]. 1997, vol.10, n.2, pp.87-98. ISSN 1415-5273. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52731997000200001>.

DA SILVA, E. do N.; DE FARIAS, L. O.; CADORE, S. The total concentration and bioaccessible fraction of nutrients in purées, instant cereals and infant formulas by ICP OES: A study of Dietary Recommended Intakes and the importance of using a standardized in vitro digestion method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 65-72, 2018.

DA SILVA, Andreia Fátima; SANTOS, Virgínia Souza. Qualidade nutricional de dietas da moda veiculadas em revistas não científicas. **Journal of Health & Biological**

*Sciences*, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2021.

DAMODARAN, S., PARKIN, K., FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. (4<sup>a</sup> ed.). Porto Alegre: Artmed. 2010.

DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE, B., BITOBROVEC, A., HACKE, A. C. M., PEREIRA, R. P., WEINERT, P. L., & DOS ANJOS, V. E. In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro-intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. **Food Chemistry**. 2019 doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.102.

LIMA, A. C. S., SOARES, D. J., DA SILVA, L. M. R., DE FIGUEIREDO, R. W., DE SOUSA, P. H. M., & DE ABREU MENEZES, E. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, 161, 142–147. 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.12

DA SILVA, Emanuéli do Nascimento et al. Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. **Talanta**, v. 117, p. 184-188, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.008>.

ETCHEVERRY, Paz; GRUSAK, Michael A.; FLEIGE, Lisa E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 317, 2012.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J., & DE SESMAISONS, A. (2018). **Approaches used to estimate bioavailability when deriving dietary reference values for iron and zinc in adults**. Proceedings of the Nutrition Society, 1–7. doi:10.1017/s0029665118000484.

FANTINI, A. P.; CANNIATTI-BRAZAC, S. G.; SOUZA, M. C.; MANSI, D. N. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e cisteína. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campina, v. 28, n. 2, p. 435-439, 2008.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I., PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. 2009. **Nutrition Research**, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>

FERREIRA, EDILENE CRISTINA et al. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**, v. 27, p. 77-90, 2002.

FILBIDO, G.S., NARITA, I.M.P., DE OLIVEIRA PINHEIRO, A.P. et al. **In vitro bioaccessibility of minerals in fortified infant foods and correlation between mineral absorption facilitators and inhibitors**. Food Measure 15, 5648–5656 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01137-9>

FIORAVANTI, M. I. A., & MORGANO, M. A. (2021). An in vitro testing approach to estimate mineral absorption in infant formulas. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2020098. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09820>.

GARCIA-CASAL, M. N.; LAYRISSE, M. Absorción del hierro de los alimentos: papel de la vitamina A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 48, n. 3, p. 191-195, sept. 1998.

GHARIBZAHEDI, S. M. T., & JAFARI, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: **Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation**. *Trends in Food Science & Technology Journal*, 62, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.0.2017>.

GIORI, FERNANDA PEIXOTO. **Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de beta-caroteno em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

GONÇALVES, T.O., FILBIDO, G.S., PINHEIRO, A.P.O., PIERETI, P.D.P., VILLA, R.D., OLIVEIRA, A.P. (2020). In vitro bioaccessibility of the Cu, Fe, Mn and Zn in the baru almond and bocaiúva pulp and macronutrients characterization. **J Food Compos Anal**, 86, 103356.

GREINER, R. e KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2006.

GRÖBER, Uwe; SCHMIDT, Joachim; KISTERS, Klaus. Magnesium in prevention and therapy. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8199-8226, 2015.

GROPPER SS, SMITH JL, GROFF JL. Advanced nutrition and human metabolism. 6th ed. **Belmont, CA: Wadsworth**; 2013.

GROPPER, S. S., SMITH, J. L., GROFF, J. L. *Nutrição Avançada e Metabolismo Humano*. São Paulo: **Cengage Learning**, 612p., 2011

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 32: 08–17, 2010.

GUANGBO LIU, TIAN CHEN, JINLI CUI, YANPING ZHAO, ZHI LI, WEIXIN LIANG, JIANTENG SUN, ZHENGHUI LIU, TANGFU XIAO. Trace Metal(loid) Migration from Road Dust to Local Vegetables and Tree Tissues and the Bioaccessibility-Based Health Risk: Impacts of Vehicle Operation-Associated Emissions. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2023, 20 (3), 2520. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032520>

GUERRA, A., ETIENNE-MESMIN, L., LIVRELLI, V., DENIS, S., BLANQUET-DIOT, S., ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends Biotechnol**, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

GUNNARSSON, B. S.; THORSODDOTTIR, I.; PALSSON, G. Associations of iron status with dietary and other factors in 6-year-old children. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 61, n. 3, p. 398-403, mar. 2007.

HERNÁNDEZ-CARABALLO, E. A., BURGUERA, M., BURGUERA, J. L. Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program. **Talanta**, 63: 419-424, 2004.

HUR, S.J., LIM, B.O., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. **Food Chem**, 125, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>. HORIE, L. M. et al. Diretriz BRASPEN de terapia nutricional no paciente com câncer. 2019.

IACONE, R., SCANZANO, C., SANTARPIA, L., D'ISANTO, A., CONTALDO, F., PASANISI, F. (2016). Micronutrient content in enteral nutrition formulas: comparison with the dietary reference values for healthy populations. **Nutrition Journal**, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0152-2>.

IAQUINTA, F., PISTÓN, M., & MACHADO, I. (2021). In vitro bioaccessibility of Cu and Zn in cooked beef cuts. **LWT**, 150, 112027. doi:10.1016/j.lwt.2021.112027 .2021.

Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQCGCRE-Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQCGCRE-008, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Brasil). **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de Métodos analíticos: documento orientativo**. Revisão: 02, Jul. 2007.

IULIANO, S., POON, S., WANG, X., BUI, M., & SEEMAN, E. Dairy food supplementation may reduce malnutrition risk in institutionalised elderly. **British Journal of Nutrition**, 117(01), 142–147. 2017.

ITURBIDE-CASAS, M. A., MOLINA-RECIO, G., CÁMARA-MARTOS, F. (2019). Macronutrients and trace elements in enteral nutrition formulas: Compliance with label, bioaccessibility and contribution to reference intakes through a probabilistic assessment. **Journal of Food Composition and Analysis**, 83, 103250. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103250>.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: F. J. Krug, 2008. 340p.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção Atômica: Fundamentos e Atomização com Chama. Junho de 2004. 40 p. Disponível em: <[http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1\\_revisada.pdf](http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1_revisada.pdf)> Acesso em: 25 set. 2020.

JACOBS, Bruno.; BONEMANN, Daisa H.; PEREIRA, Camila C.; DE SOUZA, Alexander O.; LUCKOW, Ana Claudia B.; LISBOA, Meibel T.; RIBEIRO, Anderson S.; CADORE, Solange; NUNES, Adriane M. Avaliação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva de cultivares Tannat e Cabernet

Sauvignon por MIP OES. **Química Nova**, v. 44, p. 547-552, 2021.

JIN, YONG-GUO; FU, WEN-WEN; MA, MEI-HU. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10204-10211, 2011.

KAMCHAN, A.; PUWASTIEN, P.; SIRICHAKWAL, P. P.; KONGKACHUICHAI, R. In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3–4, p. 311-320, 2004.

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

KREBS NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **J Nutr.** 2000;130(5S Suppl):1374S-7S.

KUMAR, V., SINHA, A. K., MAKKAR, H. P. S., BECKER, K. Dietary roles of phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v. 120, n., p. 945-959, 2010.

KUMARI, M., & PLATEL, K. Bioaccessibility of trace elements and chromium speciation in commonly consumed cereals and pulses. **International Journal of Food Properties**, 20(7), 1612–1620, 2017.

LLORENTE-MIRANDES, Toni et al. Assessment of arsenic bioaccessibility in raw and cooked edible mushrooms by a PBET method. **Food Chemistry**, v. 194, p. 849-856, 2016.

LICHTENSTEIN, Arnaldo et al. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495-506, 2013.

LOPES, A.C.F.; PEREIRA, C. S. S.; FERNANDES, F. L., et al. Prevalência de Alterações Gustativas em idosos em uso crônico de fármacos. **Revista Geriatria e Gerontologia**. Ipatinga, v.9, n. 4, p. 132-137, 2015.

LORIEAU, L., LE ROUX, L., GAUCHERON, F., LIGNEUL, A., HAZART, E., DUPONT, D., FLOURY, J., Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by in vitro digestion, **Food Chemistry** (2017), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.108>.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. A importância do zinco na nutrição humana. **Rev. Nut.** Campinas. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732004000100009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732004000100009)>. Acesso: 21 out. 2018.

MARTIN, K. J.; GONZALEZ, E. A.; SLATOPOLSKY, E. Clinical consequences and management of hypomagnesemia. **Journal of the American Society of Nephrology**; 20(11): p. 2291-95, 2009.

MINEKUS, Mans et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília:2014, p. 9.

MOREDA-PIÑEIRO, J., MOREDA-PIÑEIRO, A., ROMARÍS-HORTAS, V., MOSCOSO-PÉREZ, C., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., BERMEJO-BARRERA, P., PRADA-RODRÍGUEZ, D. (2011). In vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**. 30 (2), 324-345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.008>.

NAITHANI, M.; BHARADWAJI, J.; DARBARI A. Magnesium: The fifth electrolyte. **Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals**; 3(2): p. 186-92; 2014.

OKADA, I.A. **Determinação simultânea de nutrientes inorgânicos em alimentos: desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação de seus níveis em amostras de arroz e feijão “in natura”**. Dissertação de mestrado SÃO PAULO 2003.

OLIVEIRA, S. D.; SALLES, M. R. R. A alimentação e a comensalidade como forma de socialização entre idosos numa cidade do interior paulista. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**. São Paulo, v.5, n.1, p. 40-53, 2016.

OLIVEIRA, S. S.; ALVES, C. N.; MORTE, E. S. S. B.; DE FREITAS S. J., A.; ARAUJO, R. G. O.; SANTOS, D. C. M. B. Determination of essential and potentially toxic elements and their estimation of bioaccessibility in honeys. **Microchemical Journal** , v. 151, p. 104221, 2019.

OOMEN, A. G. et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 15, p. 3326-3334, 2002.

PASTERNAK, Kazimierz; KOCOT, Joanna; HORECKA, Anna. Biochemistry of magnesium. **Journal of Elementology**, v. 15, n. 3, p. 601-616, 2010.

PENG, Z., HOU, H., ZHANG, K., LI, B., Effect of Calcium-binding Peptide from Pacific Cod (*Gadus macrocephalus*) Bone on Calcium Bioavailability in Rats, **Food Chemistry** (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.078>

PERALES, S., BARBERÁ, R., LAGARDA, M. J., FARRÉ, R. Fortification of milk with calcium: effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 13, p. 4901-4906, 2006.

PEREIRA, G.A.P. et al. Cálcio dietético- estratégias para otimizar o consumo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 49, n. 2, mar./abr. 2009.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO M.D. L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p.112-123, 2004.

QUINTAES, K.; DIEZ-GARCIA, D.; WANDA, R. The importance of minerals in the human diet. **Handbook of mineral elements in food**, p. 1-21, 2015.

RUBY, M. V<sup>†</sup> et al. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. **Environmental science & technology**, v. 33, n. 21, p. 3697-3705, 1999.

SANCHES, Vitor Lacerda. **Estudo da bioacessibilidade e biodisponibilidade de elementos metálicos em leite e bebidas à base de soja**. 2018. Dissertação de Mestrado. 79 f. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

SANTOS, I. et al. Prevalência e fatores associados à ocorrência de anemia entre menores de seis anos de idade em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 403-415, dez. 2004.

SANTOS, W. P. C. dos, NANO, R. M. W. (2017). Sample Preparation for Determination of Bioaccessibility of Essential and Toxic Elements in Legumes. **InTech**. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69850>.2017.

SANTOS, W. P.; SIQUEIRA, J. S. A.; FRAGA, J. O. Avaliação de métodos in vitro para a determinação da bioacessibilidade de elementos traços em leguminosas. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012

SARIS NE, MERVAALA E, KARPPANEN H, KHAWAJA JA, LEWENSTAM A. Magnesium. An update on physiological, clinical, and analytical aspects. **Clin Chim Acta**. 2000;294(1-2):1-26.

SEVERO, JULIANA SOARES et al. Aspectos metabólicos e nutricionais do magnésio. **Nutr. clín. diet. hosp**, p. 67-74, 2015.

SILVA, ARLENE S. ; BRANDAO, GEOVANI C. ; MATOS, GERALDO D. ; FERREIRA, SERGIO L.C. Direct determination of chromium in infant formulas employing high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and solid sample analysis. **Talanta** (Oxford) , v. 144, p. 39-43, 2015.

SILVER, H. J. Oral strategies to supplement older adults' dietary intakes: comparing the evidence. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 1, p. 21-31, 2009.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A; **Princípios de Análise Instrumental**, 5a ed., Bookman, São Paulo, 2002.

SOUZA, A. O. de; Pereira, C. C.; Heling, A. I; Oreste, E. Q.; Cadore, S.; Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A. Determination of total concentration and bioaccessible fraction of metals in infant cereals by MIP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 77, p. 60-65, 2019.

SOUZA, L. A.; ROSENDE, M., KORN, M. G. A., & MIRÓ, M. Flow-through dynamic microextraction system for automatic in vitro assessment of chyme bioaccessibility in food commodities. **Analytica Chimica Acta**, 1026, 51–61.doi:10.1016/j.aca.2018.04.067, 2018.

SOUZA, L. A.; SOUZA, T. L. ; SOUZA, A, F. B. ; ARAUJO, R. G.O. ; TEIXEIRA, L.O. S.G. ; SANTOS, D. C.M.B. ; KORN, M. G. S A. . Determination and in vitro

bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame. **Microchemical journal** , v. 137, p. 8-14, 2018.

SPINELLI, M. G. N. et al. Fatores de risco para anemia em crianças de 6 a 12 meses no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 17, n. 2, p. 84-91, feb. 2005.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA A. Evaluation of the Bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in Ground Coffee Infusions by in vitro Gastrointestinal Digestion, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 25, No. 11,1993-1999, 2014.

TEIXEIRA, JOSÉ LUAN DA PAIXÃO, DÉBORA PARRA BAPTISTA, EDUARDO ADILSON ORLANDO, MIRNA LÚCIA GIGANTE, AND JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE. Effect of Processing on the Bioaccessibility of Essential Minerals in Goat and Cow Milk and Dairy Products Assessed by Different Static in Vitro Digestion Models. **Food Chemistry**. 2022.

TEIXEIRA, M.B ;RUBIM, M. Z.;NERI, C.; DA VEIGA, M. A. M. S. . Evaluation of açai (euterpe oleracea) as source of iron: speciation and bioaccessibility. In: XVII Euroanalysis - European Conference on Analytical Chemistry, 2013, Varsóvia. XVII Euroanalysis - European Conference on Analytical Chemistry, 2013.

TOKALIOGLU, S., CLOUGH, R., FOULKES, M., WORSFOLD, P. (2014). Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**. 150, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.151>.

TREVIZAN, Lilian C.; NÓBREGA, Joaquim A. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 678-690, 2007.

URIBE-WANDURRAGA, Z. N. et al. In vitro bioaccessibility of minerals from microalgae-enriched cookies. **Food & function**, v. 11, n. 3, p. 2186-2194, 2020.

VERSANTVOORT, C. H. M., OOMEN, A. G., VAN DE KAMP, E., ROMPELBERG, C. J. M., & SIPS, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, 43(1), 31–40. doi:10.1016/j.fct.2004.08.007.

WANG P, YIN N, CAI X, DU H, LI Z, SUN G, CUI Y. Variability of chromium bioaccessibility and speciation in vegetables: The influence of in vitro methods, gut microbiota and vegetable species. (2019). **Food Chem**. Mar 30;277:347-352. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.120. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30502156.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: World Health Organization.2003.

WHO. World Health Organization. **Guidelines on food fortification with micronutrientes**.In, 341 p., 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition**. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Second Edition, 2004.

XAVIER, A. D. S., FURTADO, D. Z. S., ASSUNÇÃO, N. A., & DO NASCIMENTO, A. N. Bioaccessibility of Fe and Zn (associated to proteins) in cashew nut. **Journal of Food Composition and Analysis**, 103259, 2019 doi:10.1016/j.jfca.2019.103259.

YIN, N., ZHANG, Z., CAI, X., DU, H., SUN, G., CUI, Y. (2015). In vitro method to assess soil arsenic metabolism by human gut microbiota: arsenic speciation and distribution. **Environmental Science & Technology**, 49(7), 10675-10681.