Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de
micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais.”**

André Luiz Tognon

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área: Química).

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**“Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de
micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais.”**

André Luiz Tognon

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área: Química).

RIBEIRÃO PRETO – SP

2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**“Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de
micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais.”**

André Luiz Tognon

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Andreia Mesquita Silva da Veiga

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área: Química).

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom de estudar, por ter me iluminado em todos esses anos de estudo e na realização desta dissertação de mestrado.

“A Sabedoria é radiante, não fenece, facilmente é contemplada por aqueles que a amam e se deixa encontrar por aqueles que a buscam. Ela mesma se dá a conhecer aos que a desejam. Quem por ela madruga não se cansa: encontra-a sentada à porta.”

Sabedoria 6,12-14

“Por isso vos digo: não vos preocupeis com a vossa vida quanto ao que haveis de comer, nem com o vosso corpo quanto ao que haveis de vestir... Buscai, em primeiro lugar, o Reino de Deus e sua justiça, e todas essas coisas vos serão acrescentadas. Não vos preocupeis, portanto, com o dia de amanhã, pois o dia de amanhã se preocupará consigo mesmo.”

Mateus 6,25-34

Minha gratidão especial...

Aos meus pais, Luiz e Dirce, e ao meu irmão, Carlos, pelos incentivos e auxílios que me deram em todos esses anos de estudos e por tudo que fizeram por mim.

Agradecimentos

À Prof.^a Dra. Márcia Andreia Mesquita Silva da Veiga, pela oportunidade que me concedeu de trabalhar em seu laboratório, ajudando-me e incentivando-me na realização desta pesquisa de mestrado e em todos os assuntos que a envolviam, bem como pelos seus ensinamentos, conselhos e sua amizade.

À Prof.^a Dra. Delia Rita Tapia Blácido, por ter atuado como co-orientadora de mestrado, fornecendo suporte para a realização de algumas das análises e dando dicas muito úteis durante a elaboração desta dissertação.

A todos os amigos do laboratório da professora Márcia, pela boa convivência, boas risadas e estudos.

À minha namorada e futura esposa, Sara, pelo seu companheirismo, amizade e compreensão.

À FAPESP, processo nº 2009/12061-9, pelo auxílio financeiro concedido.

E aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Química da FFCLRP, que de uma forma ou de outra participaram de minha caminhada durante o mestrado.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas do Inositol, Ácido fítico e Fitato (forma mais desprotonada).....	24
Figura 2. Os estereoisômeros do inositol, destacando a estrutura do mio-inositol (figura retirada da referência [66]).....	25
Figura 3. O processo de absorção atômica. O ponto cheio representa o elétron e os traços horizontais representam os níveis de energia do átomo.....	30
Figura 4. O processo de absorção atômica. Neste caso a fonte de atomização (geração de átomos no estado gasoso) é uma chama aquecida (técnica de F AAS).....	30
Figura 5. Os principais componentes de um Espectrômetro de Absorção Atômica. Conforme indica a figura, a fonte de atomização pode ser uma chama (F AAS) ou um forno (ET AAS).....	31
Figura 6. As três etapas do funcionamento de uma lâmpada de cátodo oco usada nos Espectrômetros de Absorção Atômica.....	32
Figura 7. Esquema de uma válvula fotomultiplicadora usada no sistema de detecção de Espectrômetros de Absorção Atômica. A válvula é composta de nove (9) dinodos mantidos nos potenciais E_i ($i = 0, 1, 2, \dots, 9$).....	34
Figura 8. Queimador de mistura prévia (queimador de fluxo laminar) usado em Espectrômetros de Absorção Atômica com Chama.....	36
Figura 9. Típico Forno de Grafita usado em Espectrômetros de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica.....	39
Figura 10. Representação esquemática da digestão gastrointestinal de amostras alimentares para avaliação da bioacessibilidade de elementos químicos (adaptado de Reddy et al., 2007).....	52
Figura 11. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras cruas dos cereais analisados. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam o cereal correspondente ao ponto: A = Arroz, M = Milho, Am = Amaranato, e Q = Quinoa.....	83
Figura 12. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras das frutas. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam a fruta correspondente ao ponto: C = Cupuaçu, G = Graviola, M = Maçã, e B = Banana.....	88
Figura 13. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras das hortaliças. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam a hortaliça correspondente ao ponto: A = Alface, e V = Alfavaca.....	89

Figura 14. Exemplo mostrando a interação simultânea do íon Fe^{+2} com um fitato e o grupo carboxila de uma molécula de proteína.....90

Figura 15. Relação entre a porcentagem de bioacessibilidade média e o conteúdo de ácido fítico médio das três classes de alimentos analisadas: cereais (C), frutas (F) e hortaliças (H).....93

Lista de Tabelas

Tabela 1. Elementos químicos atuando como cofatores para enzimas do metabolismo humano.....	2
Tabela 2. Alimentos analisados na pesquisa.....	43
Tabela 3. Fotografias digitais dos alimentos analisados na pesquisa.....	45
Tabela 4. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (por ET AAS) nas soluções provenientes das digestões totais (tanto das amostras alimentares quanto do material de referência certificado) e do teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>	56
Tabela 5. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes das digestões totais das amostras alimentares) por F AAS.....	57
Tabela 6. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes da digestão total da amostra do material de referência certificado) por F AAS.....	58
Tabela 7. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes do teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>) por F AAS.....	58
Tabela 8. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por F AAS e ET AAS na matriz resultante do procedimento de digestão ácida das amostras (tanto das amostras alimentares, quanto da amostra do Material de Referência Certificado).....	61
Tabela 9. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por F AAS e ET AAS na matriz resultante do teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>	61
Tabela 10. Valores do teste <i>t</i> de Student.....	67
Tabela 11. Composição centesimal dos alimentos analisados, considerando apenas a parte comestível (valores em porcentagem).....	71
Tabela 12. Comparação entre os valores experimentais e certificados das quantidades totais (mg do elemento/100 g de amostra seca) dos elementos no Material de Referência Certificado (NIST – SRM 1515 – Apple Leaves); nível de confiança de 95%.....	73
Tabela 13. Valores de $t_{\text{calculado}}$ para o teste <i>t</i>	73
Tabela 14. Quantidades totais dos micro e macroelementos determinados nos alimentos analisados.....	74
Tabela 15. Concentrações bioacessíveis dos micro e macroelementos obtidas pelo método da digestão gastrointestinal (teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>) dos alimentos analisados.....	76

Tabela 16. Conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados (g de ácido fítico/100 g de amostra alimentar seca).....77

Tabela 17. Comparação entre as quantidades bioacessíveis de todos os elementos determinados nos alimentos mais e menos conhecidos pela população brasileira em geral.....81

Tabela 18. Relação entre as variações da porcentagem de bioacessibilidade média e as variações percentuais do conteúdo de ácido fítico dos cereais crus e cozidos.....86

Tabela 19. Comparação entre o conteúdo de ácido fítico presente nos alimentos mais e menos conhecidos pela população brasileira em geral.....94

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Elementos químicos no metabolismo humano	1
1.2 Micro e macroelementos no metabolismo humano	3
1.2.1 Cálcio (Ca) - Macroelemento	4
1.2.2 Magnésio (Mg) - Macroelemento	5
1.2.3 Potássio (K) - Macroelemento	6
1.2.4 Sódio (Na) - Macroelemento	7
1.2.5 Cobre (Cu) - Microelemento	7
1.2.6 Ferro (Fe) - Microelemento	9
1.2.7 Zinco (Zn) - Microelemento	10
1.3 Frutas, hortaliças e cereais como fonte de micro e macroelementos.....	11
1.4 Frutas, hortaliças e cereais: uma visão geral sobre os alimentos estudados... ..	12
1.4.1 Frutas, hortaliças e cereais: os mais conhecidos pela população brasileira.....	13
1.4.2 Frutas, hortaliças e cereais: os menos conhecidos pela população brasileira	16
1.5 Bioacessibilidade de elementos em alimentos e as formas de determiná-la.....	20
1.6 Fatores antinutricionais relacionados ao conteúdo de ácido fólico em alimentos de origem vegetal.....	23
1.7 Composição centesimal de alimentos.....	27
1.8 Determinação de elementos químicos por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).....	29
1.8.1 F AAS.....	35
1.8.2 ET AAS	38
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo principal.....	42
2.2 Outros objetivos	42
3. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1 Obtenção dos alimentos para as análises.....	43
3.2 Reagentes e equipamentos.....	46
3.3 Condições para as análises	48

3.4 Secagem dos alimentos	48
3.5 Digestão total (mineralização)	49
3.6 Material de referência certificado	50
3.7 Teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>	51
3.8 Quantificação dos elementos químicos por F AAS ou ET AAS.....	53
3.8.1 Parâmetros analíticos de mérito das técnicas de F AAS e ET AAS	59
3.9 Determinação do conteúdo de Ácido Fítico.....	62
3.10 Determinação da composição centesimal	62
3.10.1 Determinação de umidade	63
3.10.2 Determinação do conteúdo de lipídios	63
3.10.3 Determinação do conteúdo de proteínas	64
3.10.4 Determinação do conteúdo de cinzas	65
3.10.5 Determinação do conteúdo de carboidratos	66
3.11 Tratamentos estatísticos e matemáticos	66
3.11.1 Intervalo de confiança.....	66
3.11.2 Teste <i>t</i>	68
3.11.3 Propagação de incertezas.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1 Composição centesimal	71
4.2 Validação da metodologia de digestão total (mineralização) das amostras alimentares.....	72
4.3 Quantidades totais dos micro e macroelementos presentes nos alimentos.....	74
4.4 Quantidades bioacessíveis dos micro e macroelementos presentes nos alimentos.....	74
4.5 Conteúdo de ácido fóico dos alimentos analisados.....	76
4.6 Discussão dos resultados obtidos.....	77
4.6.1 Comparação entre as quantidades dos elementos nos cereais crus e cozidos	77
4.6.2 Discussão sobre as quantidades totais e bioacessíveis dos macro e microelementos	79
4.6.3 Influência do conteúdo de ácido fóico nas bioacessibilidades	82
4.6.4 Importância nutricional dos fitatos	95

4.6.5	Discussão geral sobre as bioacessibilidades	96
4.6.5.1	Zinco (Zn).....	96
4.6.5.2	Cobre (Cu)	97
4.6.5.3	Ferro (Fe).....	97
4.6.5.4	Magnésio (Mg)	97
4.6.5.5	Cálcio (Ca)	98
4.6.5.6	Sódio (Na).....	99
4.6.5.7	Potássio (K).....	99

5. CONCLUSÕES	101
----------------------------	------------

6. REFERÊNCIAS.....	103
----------------------------	------------

Resumo

Os micro e macroelementos são nutrientes essenciais para o correto funcionamento do metabolismo humano, participando direta ou indiretamente de diversas funções metabólicas e estruturais do organismo, tais como cofatores de enzimas, equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas, biossinalização, constituintes de biomoléculas importantes para o organismo, dentre outros. O consumo de frutas, hortaliças e cereais na dieta é uma forma de se obter as necessidades diárias destes nutrientes, uma vez que se trata de um grupo de alimentos ricos nesses elementos. Levando em conta que apenas uma parcela dos nutrientes de um alimento é bioacessível durante a digestão humana, avaliar a bioacessibilidade destes nutrientes é muito importante. Esta pesquisa de mestrado destinou-se a quantificar, por meio de técnicas espectrométricas de absorção atômica, o teor de micro e macroelementos em alimentos dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais (mais e menos conhecidos pela população brasileira em geral), e posteriormente avaliar, por meio de um teste *in vitro*, a bioacessibilidade destes elementos nos alimentos. Além disso, visando buscar correlações entre os resultados, a composição centesimal e o conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados foram também determinados. A composição centesimal dos alimentos revelou que os pseudocereais amaranto e quinoa são fontes importantes de proteínas para os humanos. No que diz respeito aos cereais, evidenciou-se que o processo de cozimento provoca uma diminuição dos conteúdos totais dos micro e macroelementos determinados na pesquisa, mas também faz com que as porcentagens de bioacessibilidade aumentem consideravelmente em relação aos cereais crus, mostrando que o maior aproveitamento do potencial nutritivo dos cereais analisados no que tange aos micro e macroelementos estudados é obtido quando os cereais estão cozidos. As quantidades totais e bioacessíveis dos elementos nos alimentos permitiram constatar que existe um relacionamento entre a quantidade de um determinado elemento químico necessária na dieta diária dos seres humanos, e a quantidade deste mesmo elemento presente nas frutas, hortaliças e cereais analisados na pesquisa de mestrado, pois para os macroelementos estas quantidades (total e bioacessível) foram, de modo geral, maiores do que as correspondentes quantidades para os microelementos. Além disso, os resultados mostraram que as hortaliças analisadas podem atuar como boas fontes de cálcio (Ca) para a dieta diária dos seres humanos, e que o macroelemento potássio (K) possui as maiores quantidades totais e bioacessíveis, informação que se encontra em concordância com o fato de este elemento (o K) ser fundamental no

crescimento de qualquer espécie vegetal, e de que todos os alimentos analisados na pesquisa são provenientes direta ou indiretamente de espécies vegetais. De modo geral observou-se que a quantidade bioacessível dos elementos nos alimentos menos conhecidos é maior ou igual em relação às correspondentes quantidades presentes nos alimentos mais conhecidos pela população brasileira em geral, demonstrando o potencial nutritivo das frutas, hortaliça e cereais menos conhecidos analisados. A determinação do conteúdo de ácido fítico (fitatos) dos alimentos permitiu evidenciar a tendência de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico de um alimento, menor a porcentagem de bioacessibilidade mineral (micro e macroelementos). Para os cereais observaram-se algumas contradições a esta tendência, que possibilitaram concluir que a influência do ácido fítico (e seus fitatos) na bioacessibilidade mineral depende das partes dos grãos cereais (pericarpo, endosperma ou gérmen) que alojam as maiores porcentagens do conteúdo total tanto de ácido fítico, quanto dos elementos químicos nutrientes. Além disso, os resultados também permitiram concluir que os fitatos possuem diferentes intensidades de ligação com os cátions dos elementos nutrientes presentes nas amostras alimentares; desse modo, a influência dos fitatos na bioacessibilidade é maior para alguns elementos e menor para outros, dependendo da estabilidade dos complexos mineral-fitatos. Comparando tipo a tipo os alimentos menos conhecidos e os mais conhecidos pela população brasileira em geral, constatou-se que mesmo tendo conteúdos de ácido fítico comparáveis aos alimentos mais conhecidos, nos alimentos menos conhecidos esse conteúdo exerce uma influência menor sobre a bioacessibilidade mineral de forma geral, mostrando que os alimentos menos conhecidos estudados possuem um valor nutricional no que tange aos micro e macroelementos comparável e, em alguns casos, até maior do que os alimentos menos conhecidos. Levando em conta que o ácido fítico (e seus fitatos) também pode apresentar benefícios para a saúde, os resultados permitiram concluir que o amaranto e a quinoa são alimentos com notáveis propriedades nutricionais, pois combinam um significativo conteúdo de ácido fítico com boas quantidades bioacessíveis dos micro e macroelementos determinados na pesquisa de mestrado.

Abstract

The micro and macroelements are essential nutrients for proper functioning of the human metabolism, directly or indirectly participating in various metabolic functions and structural organization, such as cofactors of enzymes, osmotic equilibrium at the interface of biological membranes, biosignaling, important constituents of biomolecules for body, among others. The consumption of fruits, vegetables and cereals in the diet is a way to obtain the daily requirements of these nutrients, since it is a group of foods rich in these elements. Taking into account that only a portion of the nutrients of a food is bioaccessible during human digestion, assess the bioaccessibility these nutrients is very important. This research aimed to quantify, by means of atomic absorption spectrometric techniques, the micro and macroelements content in foods within of group of fruits, vegetables and cereals (more or less known by Brazilian population in general), and subsequently evaluating, by means of an *in vitro* test, the bioaccessibility these elements in the food. Furthermore, in order to seek correlations between the results, the percent composition and phytic acid content of foods analyzed were also determined. The percent composition of food revealed that the pseudocereals amaranth and quinoa are important sources of protein for humans. With regard to cereals, it became clear that the cooking process causes a decrease in the total contents of micro and macroelements determined in the research, but also makes the percentages of bioaccessibility increase considerably compared to raw grains, showing that the more nutritional potential of cereals analyzed (in relation to micro and macroelements studied) is obtained when the cereals are cooked. The total and bioaccessibles amounts of elements in foods allowed to observe that there is a relationship between the amount of a chemical element necessary in the daily diet of humans, and the amount of that element present in fruits, vegetables and cereals analyzed in the research, because for the macroelements these quantities (total and bioaccessible) were generally larger than those corresponding to the microelements. Furthermore, the results showed that the vegetables analyzed can act as good sources of calcium (Ca) for the daily diet of humans, and that the macroelement potassium (K) has the largest totals and bioaccessibles quantity, information that is in accordance with the fact of the K be essential in the growth of any plant species, and that all foods analyzed in this research are derived directly or indirectly from plant species. Overall it was observed that the amount bioaccessible of elements in the food less known is equal or greater in relation to the corresponding quantities present in the foods well known by Brazilian population,

demonstrating the nutritive potential of fruits, vegetable and cereals less known analyzed. The determination of content of phytic acid (phytates) of foods allowed to evidence the trend of that as higher the phytic acid content of a food, lower the percentage of bioaccessibility mineral (micro and macroelements). For cereals was observed some contradictions to this trend, which allowed to conclude that the influence of phytic acid (and their phytates) in the bioaccessibility mineral depends of part of cereal grains (pericarp, endosperm and germ) that contains the largest percentages of total content of phytic acid and of chemical elements nutrients. Furthermore, the results also showed that the phytate have different intensities of connection with the cations of nutrients elements present in food samples; thus the influence of phytic acid in bioaccessibility is greater for some elements and smaller for other, depending on stability of mineral-phytate complexes. Comparing type by type the foods less and well known by Brazilian population in general, it was found that even with phytic acid content comparable to the most popular foods, in less known foods this content has a minor influence on the mineral bioaccessibility in general, showing that the foods less known studied have a nutritional value in relation to micro and macroelements comparable and, in some cases, greater than the well known foods. Taking into account that the phytic acid (and their phytates) can also bring health benefits, the results showed that amaranth and quinoa are foods with remarkable nutritional properties, since they combine a significant content of phytic acid with good bioaccessibles amounts of micro and macroelements determined in the research.

1. Introdução

1.1. Elementos químicos no metabolismo humano

Na Bioquímica, o metabolismo pode ser definido como uma atividade celular altamente coordenada na qual diversos sistemas multienzimáticos (vias metabólicas) atuam conjuntamente visando a algumas funções básicas, necessárias à manutenção da vida [1]. Em um papel não tão quanto evidente ao dos sistemas multienzimáticos, os elementos químicos ingeridos diariamente na dieta dos seres humanos são de especial e fundamental importância, estando envolvidos como cofatores de enzimas, equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas, biossinalização, constituintes de biomoléculas importantes para o organismo, dentre outros. Estes elementos químicos são denominados, na Nutrição, de minerais.

Os minerais (elementos químicos) ingeridos na dieta podem ser classificados como macrominerais (macroelementos) e microminerais (microelementos). Os macrominerais são aqueles que precisam estar em quantidades consideráveis no organismo humano para se ter uma vida saudável. Sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) são todos considerados macrominerais. Os microminerais também são importantes para a manutenção da vida, só que em quantidades menores do que as dos macrominerais. Os microelementos também são conhecidos como elementos-traço e considerados tão essenciais como as vitaminas; dentre eles pode-se citar: cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe). Na seção seguinte dar-se-á uma definição mais precisa a respeito de macro e microminerais.

Muitas enzimas que participam de diversas vias metabólicas humanas possuem alguns desses elementos já citados atuando como cofatores. Um cofator enzimático pode ser definido como uma pequena molécula orgânica ou inorgânica (ou até mesmo um íon metálico) que é necessário para a função de uma determinada enzima. A tabela a seguir, adaptada de [1], mostra alguns exemplos de enzimas cujos cofatores são íons metálicos.

Tabela 1. Elementos químicos atuando como cofatores para enzimas do metabolismo humano

Íon do elemento	Enzima
Cu^{+2}	Citocromo oxidase
Fe^{+2} ou Fe^{+3}	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
Mg^{+2}	Hexoquinase, glicose 6-fosfatase
K^{+}	Piruvato quinase
Zn^{+2}	Anidrase carbônica, álcool desidrogenase

O exemplo mais típico do envolvimento de macrominerais (macroelementos) no equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas é a bomba de sódio e potássio. Em praticamente toda célula animal (incluindo os humanos), a concentração de Na^{+} é menor na célula que no meio circundante, e a concentração de K^{+} é maior, sendo esse equilíbrio mantido por meio de um transporte ativo primário na membrana plasmática envolvendo a enzima $\text{ATPase Na}^{+}\text{K}^{+}$. Desse modo, para manter o correto funcionamento deste sistema de transporte ativo primário (que também é crítico para o funcionamento de alguns sistemas de transporte ativo secundário no metabolismo dos humanos) é fundamental manter, através da dieta, os níveis de Na^{+} e K^{+} adequados no organismo.

Os elementos químicos ingeridos na dieta (principalmente os macroelementos, ou macrominerais) também estão envolvidos em processos de biossinalização do metabolismo humano. A habilidade das células de receber e reagir a sinais vindos do outro lado da membrana plasmática é fundamental para a vida. Embora o número de sinais biológicos seja enorme, os organismos (incluindo o humano) usam apenas alguns poucos mecanismos evolucionários para detectar sinais extracelulares e transformá-los em alterações intracelulares e vice-versa. Os mais simples transdutores de sinais são os canais iônicos presentes na membrana plasmática, os quais se abrem ou fecham em resposta à ligação de ligantes químicos ou a alterações no potencial transmembrana. A excitabilidade de células sensoriais, neurônios e miócitos depende dos canais iônicos, transdutores de sinais que fornecem uma via regulada para a movimentação de íons inorgânicos, tais como o Na^{+} , K^{+} e Ca^{+2} através da membrana plasmática, em resposta a vários estímulos [1]. Isto mostra, mais uma vez, a importância desses macroelementos para a vida humana e a necessidade de se ter uma dieta que supra as necessidades dos mesmos para o organismo diariamente.

Um exemplo da importância dos microelementos (microminerais) para o organismo humano são as proteínas conjugadas conhecidas como metaloproteínas. As proteínas conjugadas são aquelas que têm permanentemente associado à cadeia de

aminoácidos um ou mais dos chamados grupos prostéticos, que podem ser lipídios (lipoproteínas), açúcares (glicoproteínas) e metais (metaloproteínas). Exemplo de metaloproteína com seu grupo prostético é a álcool desidrogenase, cujo grupo prostético é o cátion do elemento Zn. A hemoglobina, a proteína carreadora de oxigênio do plasma sanguíneo, é um exemplo de uma hemoproteína que tem como grupo prostético o grupo Heme, uma estrutura porfirínica contendo um íon de Fe^{+2} , que por sua vez é classificado como um microelemento (micromineral). Este íon metálico exerce uma função muito importante na hemoglobina, pois é ele que faz a ligação com o oxigênio sanguíneo. De forma geral, a atividade das proteínas conjugadas é dependente dos seus grupos prostéticos [1].

Todos esses exemplos ilustram como os elementos químicos ingeridos na dieta humana exercem ações diretas e fundamentais para o bom funcionamento do metabolismo, e ressaltam a importância de se escolher os alimentos adequados para que as necessidades de micro e macroelementos (micro e macrominerais) sejam atendidas diariamente.

1.2. Micro e macroelementos no metabolismo humano

Todos os nutrientes usados na alimentação humana podem ser classificados em dois grupos: macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes são macromoléculas que podem ser digeridas, absorvidas e utilizadas como fontes de energia e como substrato para a síntese de carboidratos, gorduras e proteínas necessárias para manter a integridade celular e do metabolismo [2]; os principais macronutrientes da alimentação são os carboidratos, as proteínas e os lipídios. Os macronutrientes recebem essa designação em virtude de serem necessários em maior quantidade (na ordem de gramas) na dieta diária em relação aos outros nutrientes (micronutrientes). Os micronutrientes, por sua vez, também são nutrientes necessários para manter a integridade celular e do metabolismo; no entanto, ao contrário dos macronutrientes, os micronutrientes são requeridos em pequenas quantidades (na ordem de miligramas a microgramas) na dieta diária. Fazem parte do grupo dos micronutrientes as vitaminas e os minerais.

Falando especificamente dos minerais, objetos de estudo desta dissertação, eles são uma grande classe de micronutrientes, sendo em sua maioria considerados essenciais. São tradicionalmente divididos em *macrominerais* (macroelementos ou elementos de volume) e *microminerais* (microelementos ou elementos traço). Mais

recentemente, o termo “elementos ultra-traço” tem sido utilizado para descrever os elementos consumidos em quantidades medidas em microgramas (μg) a cada dia. Os macrominerais (macroelementos), tais como Ca (Cálcio), P (Fósforo), Na (Sódio), K (Potássio) e Mg (Magnésio), são necessários em quantidades de 100 mg/dia ou mais na dieta, enquanto os microminerais (microelementos), tais como Fe (Ferro), Se (Selênio), Cu (Cobre) e Zn (Zinco), são necessários em quantidades muito menores, tipicamente menos que 15 mg/dia. Apenas para citar, exemplos de “elementos ultra-traço” são: F (Flúor), Mo (Molibdênio), V (Vanádio), Ni (Níquel), Li (Lítio), B (Boro) e Br (Bromo).

No escopo desta dissertação de mestrado serão considerados alguns macro e microminerais (macro e microelementos) selecionados. Assim, segue-se agora uma descrição mais detalhada dos macro e microelementos que foram analisados neste trabalho, dando ênfase na forma como eles atuam no metabolismo humano, bem como as fontes alimentares nas quais eles podem ser adquiridos na dieta.

1.2.1. Cálcio (Ca) – Macroelemento

O cálcio (do latim *calx* – cal) foi descoberto por Sir Hunphrey Davy (Químico inglês), em 1808, quando promovia a eletrólise do óxido de cálcio (CaO) com óxido de mercúrio (HgO) [3]. São muitos os isótopos naturais (^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{46}Ca e ^{48}Ca), sendo ^{40}Ca o mais abundante.

É o quinto elemento mais abundante da crosta terrestre (cerca de 3 % em massa). Trata-se de um elemento essencial à vida animal; o corpo humano contém aproximadamente 1,5 a 2 % em massa de cálcio, 99 % deste concentrado nos ossos e dentes, e o restante 1% está no sangue, fluidos extracelulares e dentro das células dos tecidos moles, onde regula muitas funções metabólicas importantes. O sangue contém da ordem de 1 g/L de Ca; os ossos contêm na base de 110 g/Kg.

A ingestão adequada de cálcio é necessária para permitir ganhos ótimos na massa e densidade óssea nos anos iniciais da vida e na adolescência. Este elemento químico desempenha um papel fundamental no organismo das mulheres, pois participa de processos importantes durante a gravidez e a lactação. Além de sua função na construção e manutenção de ossos e dentes, o cálcio também possui uma série de papéis metabólicos nas células de todos os outros tecidos. As funções de transporte das membranas celulares são influenciadas pelo cálcio; este elemento afeta a liberação dos neurotransmissores nas ligações sinápticas, a função dos hormônios protéicos e a liberação ou ativação de enzimas intra e extracelulares. O cálcio também é necessário para a transmissão nervosa e regulação da função muscular e cardíaca. Os íons cálcio

(Ca^{+2}) atuam como cofatores em várias reações enzimáticas, inclusive na conversão de protrombina em trombina, que auxilia na polimerização do fibrinogênio em fibrina, passo final na formação de coágulos de sangue. Por todos esses fatos expostos, evidencia-se o importante papel que o macroelemento (ou macromineral) cálcio desempenha no organismo humano.

No que diz respeito às fontes alimentares de cálcio, as hortaliças de folhas verdes escuras como a couve, folhas de mostarda e brócolis, são boas fontes de cálcio na dieta. As sardinhas, salmão enlatado, moluscos e ostras também são fontes importantes de cálcio. No entanto, os alimentos mais usados como fonte deste elemento na dieta diária da maioria das pessoas são o leite, os queijos, pães, sorvetes, bolos e biscoitos.

A deficiência de cálcio na dieta (e, conseqüentemente, no organismo) ocasiona vários distúrbios, dentre os quais se pode citar a osteoporose, e também várias doenças crônicas como o câncer de cólon e a hipertensão, que ocorrem comumente nas sociedades ocidentais, inclusive a do Brasil. Apesar disso, uma ingestão muito alta de cálcio (isto é, 2000 mg ou mais por dia), especialmente em uma pessoa com um alto nível de vitamina D, é uma causa potencial de hipercalcemia; este distúrbio pode levar à calcificação excessiva em tecidos moles, especialmente os rins, sendo um risco para a manutenção da vida. Além disso, altas ingestões de cálcio (na forma catiônica, Ca^{+2}) também podem interferir na absorção de outros cátions bivalentes, como ferro (Fe^{+2}), zinco (Zn^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) [4].

1.2.2. Magnésio (Mg) – Macroelemento

O magnésio (de Magnésia, distrito da Tessália – Grécia) foi descoberto em 1755 por Joseph Black (Médico, Químico e Físico britânico). Em 1808, Sir Hunphrey Davy o isolou aquecendo um amálgama formado na eletrólise da mistura de óxido de magnésio (MgO) com óxido de mercúrio (HgO) [3]. Existem três isótopos naturais deste elemento (^{24}Mg , ^{25}Mg e ^{26}Mg).

O magnésio é o segundo cátion intracelular mais abundante (após o potássio) no corpo humano. O organismo do ser humano adulto contém aproximadamente de 20 a 28 g de magnésio, dos quais cerca de 60 % se encontram nos ossos, 26 % nos músculos e o restante nos tecidos moles e fluidos corporais.

A principal função do magnésio é estabilizar a estrutura do ATP nas reações enzimáticas dependentes de ATP. O cátion magnésio (Mg^{+2}) é um co-fator para mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo de componentes alimentares e na síntese de

muitas moléculas importantes. Entre as reações que necessitam de magnésio estão a síntese de ácidos graxos e proteínas, a fosforilação da glicose e seus derivados na via glicolítica, e as reações da transcetolase. O magnésio desempenha um papel na transmissão e atividade neuromuscular, trabalhando em conjunto e contra os efeitos do cálcio, dependendo do sistema envolvido; na contração muscular normal, o cálcio atua como um estimulador e o magnésio atua como um relaxante. As altas ingestões de magnésio estão associadas ao aumento da densidade óssea [5].

O magnésio é abundante em muitos alimentos e a dieta comum deve fornecer quantidades adequadas deste elemento. Boas fontes são as sementes, nozes, leguminosas e cereais integrais moídos, assim como hortaliças de folhas verde-escuras, uma vez que o magnésio é um constituinte essencial da clorofila. Outras fontes comuns do elemento são: leite, peixes, carnes e frutas (laranjas, maçãs e bananas).

Apesar de muito rara, são sintomas da deficiência grave de magnésio: tremores, espasmos musculares, mudanças de personalidade, anorexia, náusea e vômito. A depleção moderada de magnésio é em geral causada por ingestões dietéticas persistentemente baixas do elemento, ocorrendo em indivíduos que evitam o consumo de hortaliças de folhas verde-escuras, leite e outras boas fontes de magnésio.

1.2.3. Potássio (K) – Macroelemento

O potássio (do latim *kalium* – álcali) foi descoberto por Sir Hunphrey Davy, em 1807, quando promovia a eletrólise do hidróxido de potássio (KOH) fundido; o elemento possui três isótopos naturais: ^{39}K , ^{40}K e ^{41}K [3].

O cátion potássio (K^+) é o principal cátion do fluido intracelular, e está presente em pequenas quantidades no fluido extracelular; esta situação é mantida pelas bombas de sódio-potássio localizadas na membrana plasmática das células humanas.

Juntamente com o sódio, o potássio está envolvido na manutenção do equilíbrio hídrico normal, equilíbrio osmótico e o equilíbrio ácido-base. Juntamente com o cálcio, ele é importante na regulação da atividade neuromuscular. O potássio também promove o crescimento celular.

As principais fontes de potássio na alimentação humana são: frutas, hortaliças, carne fresca e produtos de laticínio. As necessidades mínimas de potássio para adultos estão entre 1600 mg e 2000 mg por dia, mas níveis mais altos são recomendados pela possibilidade do potássio prevenir a hipertensão. Ingestões insuficientes de potássio podem causar hipertensão [6] e osteoporose [7]. A principal razão para as ingestões precárias do elemento é o consumo inadequado de frutas e vegetais na dieta diária.

1.2.4. Sódio (Na) – Macroelemento

O sódio (do latim *natrium*) foi descoberto por Sir Hunphrey Davy, em 1807, quando promovia a eletrólise do hidróxido de sódio (NaOH) fundido. O único isótopo natural do elemento é o ^{23}Na [3].

O cátion sódio (Na^+) é o principal cátion do fluido extracelular. Várias secreções intestinais, tais como a bile e o suco pancreático, contêm quantidades substanciais de sódio. Aproximadamente 35 a 40 % do total de sódio corporal está no esqueleto.

Como o cátion predominante do fluido extracelular, o sódio regula o seu volume e o volume do plasma sanguíneo. O sódio também auxilia na condução de impulsos nervosos e no controle da contração muscular.

A principal fonte de sódio na dieta diária é o cloreto de sódio (NaCl), ou sal de cozinha comum, do qual o sódio constitui 40 % em massa. Os alimentos de origem protéica geralmente contêm mais sódio de ocorrência natural do que os vegetais e grãos, enquanto as frutas possuem pouco sódio. Alguns exemplos de alimentos da dieta humana que são fontes de sódio são: leite e derivados (queijos, por exemplo), ovos, carnes em geral, produtos enlatados, dentre outros. Na grande maioria da população, o consumo de sódio se faz através de alimentos industrializados que trazem direta ou indiretamente potenciais problemas para a saúde do indivíduo. Desta forma, aconselha-se que a ingestão de sódio seja feita através de alimentos mais saudáveis, tais como cereais (milho e seus derivados, por exemplo), frutas em geral, legumes, e hortaliças.

Uma ingestão isolada excessiva de sódio pode causar edema e hipertensão. Mais preocupante é a ingestão excessiva persistente de sódio; além de provocar a hipertensão, a ingestão excessiva de sódio está associada à maior excreção urinária de cálcio [8]. A deficiência de sódio no organismo é responsável por alguns distúrbios tais como letargia (perda temporária e completa da sensibilidade e do movimento), fraqueza e convulsões. No entanto, os maiores problemas estão associados ao consumo excessivo de sódio. Deste modo, apesar de ser um macroelemento (macromineral) essencial à manutenção do correto funcionamento do metabolismo humano, o sódio em excesso pode ser prejudicial à saúde. Isto enfatiza a importância de se escolher alimentos mais saudáveis na dieta que forneçam as necessidades diárias de sódio de forma adequada e balanceada.

1.2.5. Cobre (Cu) – Microelemento

O cobre (do latim *cuprum*, da ilha de Chipre) é um metal conhecido desde a Antiguidade. É usado desde épocas remotas pelo homem, sob a forma pura ou

combinada ao estanho, constituindo o Bronze. São conhecidos dois isótopos naturais desde elemento: ^{63}Cu e ^{65}Cu [3].

O cobre, um constituinte normal do sangue, é um micronutriente (dentro da classe dos microminerais ou microelementos) essencial. O interesse pelo cobre e vários outros microelementos aumentou em vista das muitas funções relacionadas aos tecidos e ao risco potencial de deficiência [8].

O cobre é um componente de muitas enzimas e as manifestações clínicas da deficiência de cobre são atribuíveis a falhas enzimáticas. Ele é indispensável na absorção do ferro, na síntese da hemoglobina, na manutenção da saúde óssea e do sistema nervoso central. Por meio do envolvimento das proteínas de transporte de elétrons que contêm cobre, este último também participa da produção de energia mitocondrial. O cobre participa da constituição da enzima chamada superóxido dismutase, que catalisa reações protetoras contra agentes oxidantes e radicais livres, e promove a síntese de melanina e catecolaminas. Estes exemplos evidenciam que o cobre no organismo humano está, em sua maioria, associado a proteínas que desempenham diversas funções; isto é reforçado pelo fato de não se observarem altas taxas de excreção para este elemento, uma vez o metabolismo humano evita a excreção de proteínas essenciais.

Os alimentos com boas quantidades de cobre (adequadas para satisfazer as necessidades diárias deste elemento na dieta humana) são os mariscos (ostras), vísceras (fígado, rim), carnes de músculos, chocolate, nozes, grãos de cereais, leguminosas secas e frutas secas. Em geral, as frutas e os vegetais contêm pouco cobre, mas podem também servir como fonte deste elemento na dieta diária.

A deficiência de cobre é caracterizada por distúrbios como a anemia, neutropenia (diminuição do número de neutrófilos no sangue) e anormalidades esqueléticas, especialmente a desmineralização. Outras alterações também podem ocorrer, tais como a despigmentação de cabelo e pele.

A toxicidade do cobre pelo consumo de alimentos é considerada impossível, pois os alimentos que geralmente são usados na dieta diária dos indivíduos não apresentam grandes teores do elemento; porém a toxicidade por suplementação excessiva ou por sais de cobre utilizados na agricultura foi relatada. Sintomas comuns de ingestões tóxicas de cobre são a cirrose hepática e anormalidades na formação das hemácias.

1.2.6. Ferro (Fe) – Microelemento

O ferro (do latim *ferrum*) é um elemento químico conhecido desde tempos antigos; existiu a chamada “Idade do Ferro”, iniciada por volta de 1100 a. C., com a introdução do elemento na Europa. São conhecidos quatro isótopos naturais do ferro: ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe e ^{58}Fe [3].

O ferro foi reconhecido como um nutriente essencial há mais de um (1) século. Os homens adultos saudáveis têm cerca de 3,6 g de ferro corporal, enquanto as mulheres têm cerca de 2,4 g. O ferro é altamente conservado pelo corpo. Aproximadamente 90 % são recuperados e reutilizados a cada dia; o resto é excretado, principalmente na bile. O ferro da dieta deve estar disponível para manter este equilíbrio, suprimindo esta lacuna de 10 %, caso contrário, resultará em sua deficiência.

As funções do ferro relacionam-se à sua habilidade de participar das reações de oxidação e redução. Quimicamente, o ferro é um elemento altamente reativo que pode interagir com o oxigênio para formar intermediários com o potencial de danificar membranas celulares ou degradar o DNA. O ferro, dessa forma, precisa estar firmemente ligado a proteínas para impedir esses efeitos potencialmente destrutivos. O metabolismo do ferro é complexo porque este elemento está envolvido em muitos aspectos da vida, inclusive na função das hemácias, na atividade da mioglobina e nas ações de várias enzimas heme e *não* heme (as enzimas heme são aquelas que apresentam o grupo prostético chamado Heme, uma estrutura porfirínica contendo o cátion Fe^{+2} ; as enzimas *não* heme não apresentam tal grupo prostético). O ferro possui um papel importante na respiração humana, auxiliando o transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) no sangue. É um componente ativo dos citocromos (complexos protéicos) envolvidos no processo de respiração celular e geração de energia (ATP). Apenas para enfatizar a importância do ferro na dieta, destaca-se a função que o mesmo desempenha na respiração humana. A hemoglobina é uma proteína presente nas hemácias do sangue e responsável pelo transporte de O_2 e CO_2 durante a respiração. Esta proteína contém o grupo Heme (que por sua vez possui em sua constituição o cátion Fe^{+2}); a hemoglobina trabalha de duas maneiras: o Fe^{+2} do grupo Heme se combina com o oxigênio nos pulmões; em seguida, o Heme libera o oxigênio nos tecidos, onde captura o dióxido de carbono, transportando-o até os pulmões e o liberando ali para ser exalado na respiração. A mioglobina, também uma proteína que contém o grupamento Heme, serve como um reservatório de oxigênio dentro do músculo. Por todos esses exemplos apresentados, constata-se a grande importância que

o micromineral (ou microelemento) Ferro possui para a manutenção da integridade celular e do metabolismo humano.

A melhor fonte de ferro na dieta é o fígado, seguido por frutos do mar (ostras e peixes), rim, coração, carne magra e aves. Os feijões secos e as hortaliças são as melhores fontes vegetais. Alguns outros alimentos que fornecem ferro são gemas de ovos, frutas e cereais.

A deficiência de ferro na dieta é a causa da mais comum de todas as doenças nutricionais: a anemia. Tal doença é prevalente em crianças e mulheres em idade fértil, sobretudo devido a hábitos nutricionais precários. A anemia pode ser corrigida pelo fornecimento de ferro na forma de suplementos (sulfatos ou gliconatos ferrosos) até que os parâmetros sanguíneos voltem ao normal. Os principais sintomas do indivíduo anêmico são: fraqueza, indisposição, fadiga generalizada, falta de apetite e palidez da pele.

1.2.7. Zinco (Zn) – Microelemento

O zinco (do alemão *zink*) foi descoberto por Andreas S. Marggraf, em 1746. Mas há indícios históricos de que o elemento era usado na Índia já no século XIII. Os isótopos naturais do elemento são: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn .

O zinco está abundantemente distribuído em todo o corpo humano, sendo o segundo micromineral (microelemento) mais abundante do organismo (o microelemento mais abundante é o ferro). O corpo humano possui cerca de 2 a 3 g de zinco, com as maiores concentrações no fígado, pâncreas, rins, ossos e músculos. Outros tecidos com concentrações consideráveis do elemento incluem várias partes do olho, próstata, espermatozóide, pele, cabelo e unhas dos dedos das mãos e dos pés [2]. O zinco é primariamente um íon intracelular (na forma de Zn^{+2}), que funciona em associação com mais de 300 enzimas diferentes de várias classes.

O zinco participa de reações que envolvem a síntese e degradação de metabólitos principais (carboidratos, lipídios e proteínas) e ácidos nucleicos (DNA e RNA). O elemento também desempenha papéis estruturais importantes, pois participa da constituição de proteínas, e funciona como um sinal intracelular nas células cerebrais. O zinco está envolvido ainda na estabilização de estruturas de proteínas e ácidos nucleicos, e na integridade de organelas subcelulares, assim como nos processos de transporte, função imune e expressão da informação genética. Estas funções citadas evidenciam a grande importância que o micromineral zinco apresenta dentro do metabolismo humano.

Na alimentação humana, a forma mais prontamente disponível de zinco é encontrada na carne de animais, em particular nas carnes vermelhas e aves. Outras fontes satisfatórias do elemento são: peixes, ostras (que são especialmente ricas em zinco) e outros mariscos, fígado, cereais de grãos integrais, nozes e produtos de soja. No geral, a ingestão de zinco correlaciona-se com a ingestão de proteínas.

Os sinais clínicos da deficiência de zinco em seres humanos foram descritos pela primeira vez em meninos no Irã e Egito e incluíam pequena estatura, hipogonadismo (termo médico para um defeito no sistema reprodutor que resulta na diminuição da função das gônadas, isto é, ovários e testículos) e leve anemia [9]. 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 fitato, os quais formam um complexo de coordenação com o zinco (íons Zn^{+2}) no intestino e impedem sua absorção. Sintomas adicionais da deficiência deste elemento incluem a cura demorada de ferimentos e o desenvolvimento de diversas lesões na pele.

1.3. Frutas, hortaliças e cereais como fonte de micro e macroelementos

Nas últimas décadas, condições favoráveis à ocorrência de deficiências nutricionais têm sido gradativamente substituídas por epidemias de obesidade e doenças crônicas relacionadas ao consumo excessivo e desequilibrado de alimentos. Segundo Claro [10], o padrão dietético associado à obesidade e a outras doenças crônicas é caracterizado essencialmente pelo consumo insuficiente de frutas, legumes, verduras e pelo consumo excessivo de alimentos de alta densidade energética e ricos em gorduras, açúcares e sal.

O consumo insuficiente de hortaliças e frutas é um fator de risco relacionado à causa de doenças crônicas não transmissíveis para a população. Esses alimentos são importantes para uma dieta saudável, pois são fontes de micro e macroelementos, fibras e de outros componentes com propriedades funcionais. As frutas e hortaliças têm baixa densidade energética, o que favorece a manutenção saudável da massa corporal [11].

Não menos importante que as frutas e hortaliças são os cereais. Os cereais possuem propriedades nutritivas (micro e macroelementos, vitaminas, proteínas), energéticas e fortificantes. As propriedades energéticas dos cereais estão relacionadas, sobretudo, ao alto teor de carboidratos que eles possuem; já as propriedades fortificantes são o resultado dos seus bons conteúdos de fibras. Nomeadamente estas últimas são

essências ao bom funcionamento do organismo, promovendo a regulação da atividade intestinal e também o controle dos níveis de colesterol e diabetes.

Com estes poucos aspectos que já foram expostos a respeito de frutas, hortaliças e cereais, pode-se evidenciar a importância que estes alimentos têm na alimentação humana, promovendo uma dieta mais saudável e fornecendo uma substancial contribuição aos conteúdos diários de micro e macroelementos para o metabolismo.

Dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais, pode-se destacar aqueles que são mais consumidos pela população brasileira, pois já estão a muito tempo inseridos na cultura alimentar das pessoas: banana e maçã (frutas), alface (hortaliça), arroz e milho (cereais). No entanto, existem outras variedades alimentares dentro deste grupo que são menos comuns perante a população brasileira em geral; são elas: cupuaçu e graviola (frutas), alfavaca (hortaliça), amaranto e quinoa (pseudocereais típicos de países andinos).

Todos estes alimentos citados são fontes fundamentais de micro e macroelementos para o organismo humano; mesmo sabendo disso, poucos sabem o verdadeiro conteúdo destes elementos presentes nestes alimentos. Assim, estudos que visem à quantificação dos micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais são importantes, pois geram informações a respeito das características nutritivas deste grupo alimentar, pouco difundidas perante a população. Além disso, o estudo de alimentos pouco conhecidos dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais torna-se ainda mais importante, pois permite avaliar e comparar o teor de micro e macroelementos neles presentes com o mesmo teor presente em alimentos mais conhecidos e consumidos pela população.

Destacado o papel que tem os alimentos dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais na alimentação humana, sobretudo como fonte de micro e macroelementos, descreve-se na seção seguinte alguns aspectos dos alimentos (dentro do grupo citado acima) que foram objeto de estudo desta dissertação de mestrado.

1.4. Frutas, hortaliças e cereais: uma visão geral sobre os alimentos estudados

Na seção anterior (I.3) foram citados alguns alimentos dentro do grupo compreendido pelas frutas, hortaliças e cereais que são mais conhecidos pela população brasileira de uma forma geral, e outros que são menos conhecidos, típicos da região norte do país, principalmente da região amazônica. Além disso, foram ainda citados

dois pseudocereais que são típicos de países andinos (o amaranto e a quinoa), cujas culturas estão sendo gradativamente inseridas no panorama agrícola brasileiro. Nesta seção, enfatizam-se os alimentos que foram analisados no escopo desta dissertação de mestrado, procurando dar informações mais detalhadas de todos eles. A descrição é dividida em duas etapas: a primeira é relativa aos alimentos mais comuns dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais, e a segunda diz respeito aos alimentos menos comuns dentro deste mesmo grupo.

1.4.1. Frutas, hortaliças e cereais: os mais conhecidos pela população brasileira

Dentro deste grupo inserem-se: banana, maçã, alface, arroz e milho.

Banana

A banana é uma planta herbácea da família *Musaceae*. A banana (juntamente com o arroz, o trigo e o milho) constitui um dos cultivares alimentares mais produzidos no mundo. As bananas (incluindo suas várias espécies) são originárias do sudeste da Ásia, sendo atualmente cultivadas em todas as regiões tropicais do planeta [12]. Trata-se de um alimento com um bom conteúdo de nutrientes; ela é fonte de carboidratos, proteínas, fibras, e vários elementos minerais que atuam como micro e macroelementos no metabolismo, além de possuir um satisfatório conteúdo em vitaminas.

No Brasil, a banana é a segunda fruta mais consumida na dieta da população, sendo facilmente encontrada nos supermercados da grande maioria das regiões do país. O cultivo de banana encontra-se entre os principais do país, em área plantada, volume produzido e valor de produção. Vários cultivares de banana são conhecidos e consumidos pela população, destacando-se a banana nanica, banana prata e banana maçã.

Maçã

A maçã (pertencente ao gênero *Malus*, possuindo várias espécies, sendo as mais comuns as espécies *domestica* e *sieversii*) é um pseudofruto bem conhecido pela população brasileira de uma forma geral. A distinção entre um fruto e um pseudofruto (na origem da palavra, um “falso fruto”) é a origem biológica de seu desenvolvimento; não entrando em muitos detalhes, pode-se dizer que um fruto é gerado a partir do amadurecimento do ovário da planta, o que geralmente ocorre após a fecundação. Já os pseudofrutos são estruturas suculentas que contêm reservas nutritivas, mas que não se

desenvolvem a partir do ovário [13]. No entanto, essas formalidades de descrição não são conhecidas pela grande parcela da população brasileira, que considera a maçã, de fato, uma fruta.

Originária da Europa e Ásia, a maçã exige clima temperado para se desenvolver. É, talvez, a fruta que engloba a maior quantidade de variedades conhecidas. Desde a metade dos anos 1970 o Brasil é um grande produtor desta fruta. A maçã é considerada como uma das frutas de preferência entre os consumidores. Sua disposição no mercado durante todo o ano e as várias formas de consumo (fresca, sucos, compotas, doces, geléias, dentre outras) faz da maçã um alimento de grande importância comercial. Além de sua importância comercial, diversos estudos têm demonstrado efeitos benéficos à saúde para aqueles que consomem a fruta regularmente.

A maçã apresenta um excelente valor nutritivo; em sua casca encontramos a pectina que ajuda a reduzir o colesterol do sangue. Além disso, a maçã é fonte das vitaminas B1, B2, niacina, e dos elementos ferro (microelemento) e fósforo (macroelemento) [14].

Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça bem conhecida e comum na alimentação diária da grande maioria dos brasileiros, e é mundialmente cultivada para o consumo em saladas, com inúmeras variedades de folhas, cores, formas, tamanhos e texturas [15]. É originária da Europa e da Ásia e conhecida desde 500 anos antes de Cristo; junto com o tomate, constitui a hortaliça preferida para as saladas presentes na alimentação diária da população brasileira, devido ao seu sabor agradável e refrescante e a sua facilidade de preparo [16].

A alface contém quantidades razoáveis de vitaminas A e C, além de bom conteúdo dos elementos cálcio, fósforo e ferro. Além disso, é rica em fibras que auxiliam na digestão e no bom funcionamento do intestino.

Acredita-se que a alface tenha sido introduzida no país pelos portugueses no século XVI. Atualmente é uma das hortaliças mais importantes no mercado brasileiro, tornando-se a mais consumida pela população, fato que a coloca como uma espécie alimentar cujo estudo possui grande relevância.

Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L., a variedade mais comum) é uma planta da família das gramíneas que alimenta uma grande parcela da população humana no mundo. É a

terceira maior cultura de cereal do mundo, ultrapassada apenas pelo milho e o trigo [17]. Para ser cultivado com sucesso, necessita de água em abundância para manter a temperatura ambiente dentro de intervalos adequados. Originário do Japão, onde é cultivado há pelo menos sete (7) mil anos, o arroz é presença marcante no cotidiano do povo asiático.

O arroz é uma fonte de muitos nutrientes para a dieta. Ele é constituído principalmente de carboidratos (aproximadamente 77 % em massa, para o arroz Tipo 1, cru, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, TACO [18]), mas também é fonte de proteínas e vários macro e microelementos fundamentais na dieta, tais como cálcio, magnésio, ferro, sódio e zinco.

No Brasil, o arroz é o cereal mais comum na dieta diária da população, e é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem. É ainda uma cultura extremamente versátil que se adapta a diferentes condições de solo e clima; além disso, é considerada a espécie que apresenta o maior potencial para o combate a fome no mundo [19]. Apenas para citar, segundo dados da Embrapa [19], o Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas produzidas anualmente para o consumo.

Milho

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal bem conhecido e cultivado em grande parte do mundo. Trata-se de uma espécie originária da América Central, onde era cultivado desde o período pré-colombiano [20]. O milho é cultivado em diversas regiões do mundo; o maior produtor mundial são os Estados Unidos. No Brasil, que também é um grande produtor e exportador, São Paulo e Paraná são os estados líderes na sua produção.

O milho é dos alimentos mais nutritivos que existem, contendo quase todos os aminoácidos conhecidos e essenciais para o organismo humano, sendo exceções a lisina e o triptofano. O milho também é rico em glicídios e lipídios, além de ser uma fonte importante de micro e macrominerais na dieta; dentro destes últimos pode-se destacar: enxofre, fósforo, sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro e zinco.

Cultivado em todo o Brasil, o milho é usado tanto diretamente como alimento, quanto para usos alternativos. A maior parte de sua produção é utilizada como ração de bovinos, suínos, aves e peixes. Apesar das boas características nutritivas, atualmente uma pequena porcentagem da produção brasileira de milho se destina ao consumo

humano e, mesmo assim, de maneira indireta na composição de outros produtos (por exemplo, nos cereais matinais). Isto se deve principalmente à falta de informação sobre o milho e à ausência de uma maior divulgação de suas qualidades nutricionais, bem como aos hábitos alimentares da população brasileira, que privilegia outros grãos. Dessa forma, o levantamento de novas características nutritivas deste cereal é muito importante, pois impulsiona um maior aproveitamento do mesmo na alimentação diária dos brasileiros.

1.4.2. Frutas, hortaliças e cereais: os menos conhecidos pela população brasileira

Dentro deste grupo inserem-se: cupuaçu, graviola, alfavaca, amaranto e quinoa. Vale ressaltar que tais alimentos são menos conhecidos pela população brasileira de uma forma geral, no entanto, podem existir regiões ou locais do país onde os mesmos são comuns. Por exemplo, o cupuaçu e a graviola são frutos comuns perante a população da região Norte do Brasil, mas são pouco comuns e pouco consumidos nas demais regiões e/ou localidades.

Cupuaçu

O cupuaçu (*Theobroma grandiflora*) é uma fruta nativa da Amazônia e pertence ao mesmo gênero do cacau (*Theobroma cacao* L.), espécie da qual se obtém o chocolate. O cupuaçu, nativo da Amazônia Oriental, atualmente está disseminado por toda a bacia amazônica e norte do Maranhão, atingindo também outros estados [21, 22]. A motivação para investimentos com o cupuaçu é atribuída ao aumento do mercado nacional e internacional, principalmente para o comércio da polpa. Estes fatores estão promovendo a substituição do extrativismo para a forma domesticada devido aos bons resultados dos sistemas consorciados, passando o cupuaçu a ser cultivado de forma mais racional [22, 23]. A fruta (cupuaçu) foi uma fonte primária de alimento na floresta amazônica tanto para as comunidades indígenas ali presentes, quanto para os animais daquela região. O cupuaçu ficou caracterizado por sua polpa cremosa e sabor exótico [24].

O cupuaçu, apesar de ser uma espécie comum à população da região amazônica, sendo uma fruta consumida de muitas formas diferentes (sucos, doces, compotas, bolos, tortas, licores, geléias, dentre outras), não é conhecida pela grande maioria da população brasileira que habita as outras regiões do país. Na região amazônica, onde a espécie é bem comum, os frutos são comercializados durante a época da colheita, geralmente *in*

natura; após o período de safra, a polpa congelada é a principal forma de comercialização. Apesar de ser pouco conhecido pela maioria da população brasileira nas demais regiões do Brasil, durante os últimos anos o interesse pela polpa congelada do cupuaçu tem crescido de forma significativa, especialmente para a fabricação de sucos e gelados [25].

No que diz respeito a sua composição média, o cupuaçu é uma fruta constituída por 43 % de casca, 38 % de polpa, 17 % de sementes e 2 % de placenta, todas as porcentagens em massa [21, 22]. A polpa é a principal fonte de nutrientes, contendo uma quantidade significativa de carboidratos e vitamina A; outras vitaminas em menores quantidades são as vitaminas B1, B2, C e Niacina. A polpa também é fonte importante de micro e macroelementos tais como cálcio, ferro e fósforo.

Como já relatado, o cupuaçu não é uma fruta comum perante a maioria da população brasileira, no entanto, durante os últimos anos o uso da sua polpa nas demais regiões do Brasil tem crescido. Isto coloca os estudos sobre esta espécie num lugar de destaque, pois os mesmos podem ajudar a divulgar novas características da fruta, sobretudo no que diz respeito ao seu potencial nutritivo.

Graviola

A graviola (*Annona muricata* L.) é uma fruta tropical importante, de grande destaque nos mercados frutícolas da América do Sul, América Central e Caribe. No Brasil, a graviola não é uma fruta muito conhecida. Embora venha sendo citada pela literatura desde o início do século, sua importância comercial em termos de mercado interno e de exportação ainda é muito pequena, e o interesse em explorá-la é bastante recente [26].

A graviola é citada como sendo originária das terras baixas da América tropical, mais precisamente da América Central e dos vales peruanos. No Brasil, foi introduzida pelos portugueses no século XIV. Atualmente é uma fruta bem conhecida na região quente e semi-árida do Nordeste, tornando-se subespontânea na Amazônia [27]. Mesmo assim, a graviola ainda não é uma fruta popular perante a maioria da população brasileira, sobretudo devido ao pouco conhecimento que as pessoas possuem a respeito de suas propriedades nutritivas.

No que diz respeito às propriedades nutritivas, a graviola é uma fonte importante de vários micro e macroelementos para o metabolismo humano, tais como cálcio, ferro, fósforo, potássio e sódio. A fruta também é fonte de algumas vitaminas importantes como as vitaminas B1, B2 e Niacina, além de possuir uma quantidade relevante de

carboidratos [28]. Quanto à alimentação, a graviola pode ser consumida crua (*in natura*) ou na forma de produtos tais como sorvetes e sucos; no preparo destes últimos, a principal forma com que a fruta é encontrada à venda é como polpa, fato que contribui para justificar sua pouca popularidade perante a maioria da população brasileira.

Alfavaca

A alfavaca (*Ocimum basilicum* L.) é uma hortaliça originária da África e Ásia tropical, que é conhecida popularmente no Brasil com dois nomes diferentes: manjerição e alfavaca (nome popular na região Norte do país). É uma planta herbácea anual, muito ramificada, aromática e perfumada, sendo seu cultivo bem adaptado em climas subtropicais e temperado quente ou úmido [29].

A alfavaca (manjerição) é geralmente referida como uma hortaliça com propriedades medicinais, sendo seus chás popularmente conhecidos por tratar gripes, dor de cabeça, cólica renal e tosses. A planta possui um cheiro acentuado e agradável para a maioria das pessoas, em virtude de na sua composição química estarem presentes muitos óleos essenciais. Na culinária, esta hortaliça é geralmente usada como condimento para outros alimentos, na preparação de sopas, molhos e caldos [30]. Apesar disso, esta hortaliça ainda é muito pouco usada nos pratos e temperos do cotidiano da grande maioria da população brasileira, em virtude da pouca divulgação de suas propriedades nutritivas (fato que contribui significativamente para que um alimento seja inserido na dieta diária dos indivíduos).

No que diz respeito às suas características nutritivas, pode-se citar que a espécie (alfavaca) apresenta quantidades relevantes de proteínas e de micro e macroelementos tais como magnésio, ferro, fósforo, sódio, potássio e zinco, além de algumas vitaminas [18].

Amaranto

O cultivo de amaranto (gênero *Amaranthus*, várias espécies) data de 5000 a 7000 anos atrás. Os Maias foram provavelmente os primeiros a usarem o amaranto como cultura produtiva, e os Incas e Astecas o adotaram posteriormente. Com o início da colonização espanhola na América, as culturas de amaranto foram parcialmente banidas, ficando restrito apenas a um cultivo de pequena escala [31].

O amaranto é considerado um pseudocereal e, no Brasil, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) vem realizando desde 1995 um trabalho pioneiro com as principais espécies de amaranto, visando adaptá-las ao cultivo no país [32]. As

espécies de amaranto tornaram-se conhecidas no país devido a esses esforços da Embrapa, e estão sendo introduzidas como alternativas para a diversificação do cultivo em áreas dominadas, geralmente, por culturas populares tais como arroz, feijão, milho e soja [33].

Na atualidade, o amaranto ainda está no *status* de um cereal pouco conhecido e pouco usado na dieta dos brasileiros, fato que o torna alvo de muitas pesquisas por diversas instituições. No dia 03 de Agosto de 2010, o telejornal da TV Globo (uma das emissoras de televisão mais conhecidas do Brasil) “Jornal Hoje” divulgou uma reportagem [34] que abordava justamente essas pesquisas com o cereal amaranto, enfatizando suas características nutritivas e seus potenciais usos na dieta da população. Segundo o conteúdo da reportagem, pesquisadores da UNICAMP já estudam uma das variedades de amaranto há mais de oito anos, relatando que o mesmo tem propriedades nutritivas que se assemelham às presentes na combinação do arroz com o feijão. Apesar disso, no Brasil, há poucos pontos de venda deste cereal, fato que pode ser entendido pela pequena divulgação de suas características nutricionais.

Falando especificamente do valor nutricional do amaranto, pode-se dizer que o mesmo é fonte de muitas proteínas de alto valor biológico e com uma boa absorção pelo organismo humano; além disso, essas proteínas são fontes de muitos aminoácidos essenciais para o metabolismo, fator esse que diferencia o cereal amaranto de outros cereais e vegetais consumidos na dieta dos brasileiros. O amaranto também é fonte importante de fibras, vitaminas (vitaminas A e C, principalmente) e de diversos micro e macromelementos, dentre os quais se destacam o zinco, o fósforo, o cálcio e o magnésio [35].

Quinoa

A quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) é originária da região dos Andes e há registros de que os Incas utilizavam-na desde 3000 anos antes de Cristo. Este pseudocereal era muito cultivado nesta região; no entanto, houve um declínio no seu cultivo coincidindo com o início da colonização espanhola na América, com a inserção da cevada na alimentação [36]. No Brasil, o cereal ainda é muito pouco conhecido perante a maioria da população, apesar de apresentar um conteúdo nutricional relevante.

A quinoa é pesquisada pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) desde 1980. Somente no ano de 1998, uma unidade desta empresa em Planaltina (DF) conseguiu adaptar o cultivo do cereal às características do cerrado brasileiro. O cultivo da quinoa não se adapta em regiões úmidas, pois a umidade reduz a

qualidade das sementes; por isso, no Brasil, as regiões que apresentam o maior potencial para o cultivo desta espécie são as áreas áridas da região central, e as áreas altas e frias da região sul. No momento atual, a quinoa é cultivada no Brasil apenas em caráter experimental por produtores parceiros da Embrapa, durante as entressafras da soja.

No que diz respeito às características nutricionais, a quinoa é uma excelente fonte de proteínas contendo muitos aminoácidos essenciais à alimentação humana. Em relação a outros cereais, a quinoa contém mais riboflavina e ácido fólico, e também uma alta concentração de α -tocoferol, fato que a torna uma fonte importante de vitamina E. Além disso, este pseudocereal também contém quantidades relevantes de carboidratos, fibras, ferro, fósforo e cálcio.

1.5. Bioacessibilidade de elementos em alimentos e as formas de determiná-la

Atualmente existem muitos alimentos que recebem a denominação de “alimentos funcionais”, pois são fontes de nutrientes (micro e macromelementos, vitaminas, proteínas, dentre outros) essenciais para o organismo humano, além de promoverem um benefício à saúde do indivíduo que o consome. Desta forma, muito se dedica às pesquisas que objetivam identificar e isolar estes nutrientes nestes alimentos (tais como frutas, hortaliças, cereais, etc., de origem natural), a fim de adicioná-los artificialmente na matriz de produtos alimentares industrializados para melhorar as características nutritivas desses últimos [37]. No entanto, o conteúdo total de um nutriente presente em um alimento não revela realmente o valor nutricional deste alimento, pois se deve destacar que nem toda a quantidade de um nutriente presente na matriz de um alimento é liberada para a absorção no organismo durante a digestão humana; este aspecto é muitas vezes referido como a bioacessibilidade do nutriente no alimento, e esta é muitas vezes negligenciada quando se promove o valor nutricional de um produto. No que diz respeito a este assunto, dois termos devem ser distinguidos para um melhor entendimento: biodisponibilidade e bioacessibilidade.

O termo biodisponibilidade pode apresentar várias definições dependendo da área em que se aplica. Do ponto de vista nutricional, biodisponibilidade refere-se à fração de um nutriente presente em um dado alimento que é disponível para ser usado nas funções fisiológicas ou para ser estocado [38]. Isto é, somente certas quantidades de todos os nutrientes de um alimento serão usadas efetivamente pelo organismo.

Bioacessibilidade é definida como a fração de um nutriente que é liberada da matriz de um alimento no trato gastrointestinal (durante a digestão), tornando-se disponível para a absorção intestinal, isto é, para entrar na corrente sanguínea [39]. Apesar dos termos “biodisponibilidade” e “bioacessibilidade” serem frequentemente usados indistintamente, é importante compreender a diferença entre eles. A bioacessibilidade refere-se à quantidade de um determinado nutriente presente em um alimento (para cada nutriente temos uma bioacessibilidade específica) que é liberada no trato gastrointestinal durante a digestão; nem todo o conteúdo deste nutriente presente no alimento é liberado durante a digestão, sendo que o conteúdo liberado é considerado a fração bioacessível para a absorção pelo organismo. Agora, deste total de nutriente bioacessível, apenas uma fração tornar-se-á disponível realmente para ser usada pelo organismo nas suas funções fisiológicas, ou ser estocado para uso posterior; isto é, apenas uma parte do total bioacessível será de fato absorvida pelo organismo: essa parte refere-se ao conteúdo biodisponível do nutriente, ou seja, sua biodisponibilidade.

Falando especificamente de bioacessibilidade, existem basicamente duas maneiras de se determinar a mesma para um nutriente específico num determinado alimento: testes *in vivo* e testes *in vitro*. Ambas as estratégias apresentam suas vantagens e desvantagens, e o uso de uma ou outra depende dos propósitos da análise e da disponibilidade de materiais e reagentes para efetuá-las.

Dentro dos testes *in vivo*, estudos de balanço de matéria e de concentração tecidual são basicamente as duas estratégias que permitem a determinação da quantidade absorvida de um nutriente em uma matriz alimentar [37]. Os estudos de balanço de matéria determinam a quantidade absorvida de um nutriente por medidas da diferença entre a quantidade de nutriente ingerida e a quantidade deste mesmo nutriente eliminado nas excretas. Já nos estudos de concentração tecidual monitora-se o aumento da concentração do nutriente de interesse no plasma sanguíneo. Vários trabalhos na literatura [39 - 52] mostram que estas duas técnicas têm sido aplicadas com animais (cobaias) ou em humanos, com o objetivo de determinar a absorção de carboidratos, minerais, vitaminas, dentre outros nutrientes.

Os estudos *in vitro* simulam as condições fisiológicas e os eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal humano. Nesta técnica, um método gastrointestinal *in vitro* é aplicado sobre a amostra alimentar, imitando as condições fisiológicas que ocorrem durante a digestão humana, levando em consideração as três áreas do sistema digestivo (boca, estômago e intestino). Os principais fatores da simulação gastrointestinal *in vitro* são a temperatura, velocidade de agitação e a

composição química e enzimática da saliva e dos sucos gástrico, duodenal e biliar [53]. Após esta simulação, a solução resultante é destinada à quantificação do nutriente de interesse, permitindo assim avaliar sua bioacessibilidade.

Como já foi destacado nas seções anteriores, frutas, hortaliças e cereais são fontes importante de vários micro e macroelementos (ou, de outra forma, micro e macrominerais) essenciais para o correto funcionamento do organismo humano, permitindo a este manter suas funções adequadamente. No entanto, devido ao conceito de bioacessibilidade supracitado, deve-se destacar que nem todo o conteúdo de um determinado elemento é liberado para uma possível absorção (diz-se “possível” absorção, pois também se leva em consideração o conceito de biodisponibilidade) no intestino humano. Desse modo, a fim de se aprofundar na caracterização nutricional de frutas, hortaliças e cereais no que diz respeito aos seus micro e macroelementos, são necessários estudos de bioacessibilidade para se avaliar a quantidade de um dado elemento que é liberada no trato gastrointestinal durante a digestão humana. Com este enfoque, vários estudos já foram publicados, objetivando basicamente avaliar a bioacessibilidade de elementos químicos selecionados em certos alimentos ou refeições [54 - 57].

No trabalho de Barberá et al. [55], as bioacessibilidades de Ca, Fe, Zn e Cu foram estimadas em 13 habituais refeições servidas em escolas na Espanha, objetivando avaliar as influências de diferentes ingredientes (usados na preparação das refeições) na bioacessibilidade dos elementos citados acima. Neste trabalho, dois diferentes testes de bioacessibilidade *in vitro* foram empregados, permitindo a comparação entre os resultados por meio deles obtidos.

Reddy et al. [56] avaliou as bioacessibilidade de alguns elementos químicos essenciais (K, Mn, Zn, Fe e Na) em sementes de trigo usadas como suplemento alimentar em dietas. Neste trabalho, os autores usaram dois testes de bioacessibilidade *in vitro*: um consistia de apenas uma digestão gástrica, e outro consistia de uma digestão gastrointestinal. O objetivo era fornecer novas informações nutricionais a respeito das sementes de trigo, bem como comparar as duas metodologias do teste de bioacessibilidade *in vitro*.

No trabalho de Hunt [54], as bioacessibilidades de Fe, Zn e outros elementos foram determinadas em dietas baseadas em produtos vegetais, uma vez que os alimentos vegetais estão inseridos dentro do contexto de uma alimentação mais saudável para os seres humanos. Barberá et al. [58] estimou as bioacessibilidades (por meio de um teste *in vitro*) de Fe e Zn em sucos de frutas comerciais enriquecidos artificialmente com Fe,

ou Zn, ou leite desnatado, objetivando avaliar a influência da composição desses sucos de frutas sobre as bioacessibilidades dos elementos supracitados.

Os trabalhos anteriormente citados avaliaram as bioacessibilidades de elementos em alguns alimentos ou classe de alimentos em específico, buscando gerar novas informações nutricionais, bem como obter correlações e comparações entre metodologias de testes de bioacessibilidade *in vitro*. No entanto, uma pesquisa que avalie a bioacessibilidade (através de um teste *in vitro*) de vários elementos químicos essenciais em frutas, hortaliças e cereais, comparando alimentos mais e menos conhecidos popularmente, ainda é ausente no meio científico. Mais ainda, o estudo de pseudocereais como o amaranto e a quinoa é muito relevante, pois as pesquisas com estes cereais são escassas e recentes, permitindo, assim, a obtenção de informações nutricionais inéditas e importantes para a cultura alimentar da sociedade. Isto ressalta a relevância da pesquisa desenvolvida nesta dissertação de mestrado, e mostra as informações que podem ser obtidas de estudos de bioacessibilidade mineral aplicados ao grupo das frutas, hortaliças e cereais, uma vez que esse grupo inclui alimentos que vem sendo adotados em maior proporção na dieta das pessoas, pois tais alimentos contribuem para uma vida mais saudável.

1.6. Fatores antinutricionais relacionados ao conteúdo de ácido fítico em alimentos de origem vegetal

Estudos sobre a biodisponibilidade de nutrientes demonstraram que os teores de minerais (elementos químicos) nos alimentos não podem ser considerados isoladamente e que o aumento da concentração dos mesmos na matriz alimentar nem sempre significa aumento da utilização pelo organismo. Tanto fatores intrínsecos (fisiológicos), quanto extrínsecos (dietéticos), podem interferir na absorção, no transporte, na utilização e no armazenamento desses minerais, com subsequente aumento da suscetibilidade à deficiência ou à toxidez [59]. Pesquisadores demonstraram o efeito de frutooligossacarídeos, de alguns aminoácidos, do ácido ascórbico e do β -caroteno, no aumento da biodisponibilidade mineral [60, 61]. Em contrapartida, o ácido fítico, o ácido oxálico e os taninos são alguns dos fatores dietéticos considerados como inibidores da absorção intestinal de minerais, dentre os quais, o ácido fítico tem papel de destaque. A análise dessas substâncias têm sido útil na avaliação da biodisponibilidade de Fe e Zn em alimentos e dietas [60]. No que diz respeito ao ácido fítico, na referência [62] cita-se diversos trabalhos desde 1973 até 2002 que mostram o

efeito negativo de fitatos na absorção de Zn, acarretando deficiências nutricionais tanto em animais quanto em humanos. Assim, o conteúdo de ácido fítico influencia a biodisponibilidade (e, também, a bioacessibilidade) dos minerais em alimentos e dietas, e alguns estudos inclusive já empregaram a razão molar ácido fítico/mineral para a estimação da biodisponibilidade de elementos químicos em alimentos [63, 64].

Na classe dos fitatos, o ácido fítico é o componente mais conhecido, sendo encontrado na forma de mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexadiidrogênioofosfato. A figura a seguir mostra as estruturas do inositol, do ácido fítico e do fitato na sua forma mais desprotonada (os fitatos são gerados a partir da desprotonação das moléculas de ácido fítico).

Figura 1. Estruturas químicas do Inositol, Ácido fítico e Fitato (forma mais desprotonada).

O mio-inositol é o único dos estereoisômeros do inositol que apresenta atividade metabólica no organismo humano, sendo um importante constituinte celular e atuando em diferentes processos bioquímicos (sobretudo na biossinalização). Além disso, apenas a forma mio-inositol do ácido fítico tem sido observada em tecidos de plantas, incluindo grãos, raízes, tubérculos e hortaliças [65]. A figura a seguir mostra as estruturas dos nove (9) estereoisômeros do inositol, destacando a estrutura do mio-inositol.

Figura 2. Os estereoisômeros do inositol, destacando a estrutura do mio-inositol (figura retirada da referência [66]).

O ácido fítico e os diversos fitatos estão entre os fatores antinutricionais mais importantes da dieta no que tange aos alimentos de origem vegetal, limitando a bioacessibilidade e a biodisponibilidade mineral. O ácido fítico e seus complexos de minerais (formados com os fitatos) são as principais formas de armazenamento de fósforo nas sementes das plantas. O ácido fítico mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexadiidrogênio-fosfato contém seis grupos fosfato esterificados com as hidroxilas do mio-inositol. Esses grupos fosfato são ionizados rapidamente no pH fisiológico do organismo humano, por isso, o ácido fítico é um potente quelante de cátions, em especial de cátions di- e trivalentes como Ca^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} e Mg^{+2} [67]. Nas células vegetais, o ácido fítico serve como um armazenamento de fósforo e também atua em diversas outras funções tais como transdução de sinais intra e intercelulares, exportação de RNA, reparação de DNA e recombinação de DNA [68].

As concentrações de fitatos nos alimentos de origem vegetal variam de 1 a 3% (em massa) em cereais e leguminosas, e chegam a até 1% (também em massa) em raízes, tubérculos e hortaliças [69]. Nas leguminosas, os fitatos estão associados às proteínas e eles exercem influência sobre a bioacessibilidade do ferro, diminuindo a liberação deste elemento da matriz do alimento durante a digestão gastrointestinal humana. Os fitatos também influenciam a bioacessibilidade do manganês, cobre e cálcio [70].

Estudos antigos já indicaram que o fitato pode alterar significativamente as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos [71]. A importância antinutricional destes sais deve-se à interação dos grupos fosfato com amido, minerais e proteínas, levando a uma alteração na solubilidade, funcionalidade, digestibilidade e absorção destes nutrientes [72]. Além disso, a fitase (que é a principal enzima responsável pela hidrólise do fitato durante o período de germinação de algumas espécies vegetais) não está presente em humanos, fato este que ressalta a relevância antinutricional que os fitatos desempenham, sobretudo no que diz respeito à bioacessibilidade de minerais (elementos químicos essenciais).

As correlações entre o conteúdo de fitatos e a bioacessibilidade de minerais e outros nutrientes essenciais (proteínas, carboidratos, lipídios, dentre outros) são tão importantes para se avaliar os potenciais nutritivos de um alimento, que vários estudos com este enfoque já foram publicados na literatura. Recentemente, em 2010, foi publicada uma revisão [73] na revista “Food Chemistry” que abordava o papel dos fitatos na nutrição humana; nesta revisão vários trabalhos envolvendo fitatos e minerais foram citados.

Brune et al. [74] mostrou que os fitatos presentes em vários tipos de alimentos inibem a absorção (a biodisponibilidade) de Fe^{+3} (o ferro não-heme) pelo organismo humano durante a digestão. No trabalho de Luo et al. [75] estimou-se a bioacessibilidade (usando um teste *in vitro*) de Fe e Zn em farinha de feijão e em frações de legumes, variando nas amostras o teor de fitatos destes alimentos através do uso artificial de fitases (enzimas especializadas na degradação de fitatos). Constatou-se uma melhora significativa na bioacessibilidade *in vitro* dos elementos citados conforme se aumentava a quantidade de fitase nos experimentos, evidenciando a característica antinutricional dos fitatos no que tange à liberação de Fe e Zn da matriz dos alimentos analisados durante a digestão humana. Liang et al. [76] avaliou as bioacessibilidades *in vitro* de Ca, Fe e Zn e suas relações com o conteúdo de ácido fítico em arroz comercial vendido na China, constatando uma diminuição das bioacessibilidades com o aumento do conteúdo de ácido fítico nas amostras de arroz. Outro trabalho publicado na literatura científica que mostra a importância das análises envolvendo fitatos foi a pesquisa de Arruda et al. [77]. Neste artigo, relata-se o conteúdo de minerais (Ca, Cu, Fe, P e Mg), ácido fítico e tanino de 18 frutas nativas do cerrado brasileiro, objetivando avaliar o potencial nutritivo destas frutas. Além disso, a biodisponibilidade destes minerais foi estimada usando a razão molar ácido fítico/mineral, conforme proposto nos trabalhos de Saha et al. [78] e Ellis et al. [79]. Constatou-se que o teor de ácido fítico das frutas

analisadas não é grande o suficiente para inibir a biodisponibilidade (durante a digestão humana) dos elementos considerados, fato que demonstrou o potencial nutritivo das frutas no que diz respeito aos minerais determinados. Numerosos outros estudos descreveram o efeito negativo dos fitatos sobre a bioacessibilidade (e biodisponibilidade) de elementos químicos essenciais em alimentos [80, 81, 82-88], mostrando a importância destas análises nestes estudos nutricionais.

Vários métodos convencionais têm sido utilizados para a determinação do ácido fítico em diversas amostras alimentares, sendo que a maioria deles é derivado do procedimento de Heubner and Stadler (1914)[89]. Estes métodos são baseados na precipitação do íon férrico (Fe^{+3}) com fitato em solução ácida diluída, e quantificação do fósforo no precipitado ou do ferro no sobrenadante [90,91]. Um método convencional para a determinação do conteúdo de fitato em amostras alimentares é o método espectrofotométrico de Haug e Lantzsch [91]. Neste método, o fitato é extraído da amostra alimentar usando uma solução diluída de HCl. Em seguida, todo o fitato extraído é precipitado (na forma do complexo representado por $[\text{Fe}_2(\text{Fitato})]$) com o uso de um excesso conhecido de solução de Fe^{+3} (solução de FeCl_3 , por exemplo). O Fe^{+3} restante no sobrenadante é determinado por meio de seu complexo com bipyridina, medindo a absorção do complexo em 519 nm. Desse modo, consegue-se indiretamente determinar a quantidade de fitato (ácido fítico) extraído da amostra alimentar.

1.7. Composição centesimal de alimentos

A composição centesimal de um alimento refere-se à porcentagem em massa de seus cinco (5) componentes principais: água, lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos. Ela é determinada considerando que o alimento é composto somente por estes cinco componentes e, desse modo, a soma das porcentagens destes componentes totaliza 100 %.

Quando se examina a composição da maioria dos alimentos, a água é encontrada como um componente fundamental, pois é nela que estão dissolvidas a maioria das outras substâncias nutrientes presentes nos alimentos [92]. Na composição centesimal de um alimento a água é referida como o teor de *umidade*, que é determinado secando o alimento de interesse e medindo indiretamente a massa de água perdida durante este processo. A umidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em: umidade de superfície, que se refere à água livre ou presente na superfície externa

do alimento, facilmente evaporada, e umidade adsorvida, referente a água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo [93].

Os lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, contêm ácidos graxos essenciais ao organismo humano e atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. Os lipídios são substâncias insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos, tais como éter, clorofórmio e acetona, dentre outros [93]. Os lipídios desempenham um papel importante na qualidade dos alimentos, pois contribuem com atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica [92]. A determinação de lipídios em alimentos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes, por exemplo, éter. Quase sempre se torna mais simples fazer uma extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes compostos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenóides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais etc., mas em quantidades relativamente pequenas que não chegam a representar uma diferença significativa na determinação [93].

As proteínas são macromoléculas formadas pela união de aminoácidos e diferenciam-se de acordo com os tipos, quantidades e modos de encadeamento dos aminoácidos. Nos alimentos as proteínas possuem funções estruturais e enzimáticas, e são nutricionalmente importantes, pois são fontes dos aminoácidos essenciais, isto é, os aminoácidos que o organismo humano não consegue sintetizar e precisam, necessariamente, ser adquiridos por meio da dieta. A determinação do conteúdo protéico de um alimento baseia-se na medida do teor de nitrogênio que é feita, geralmente, pelo processo de digestão Kjeldahl. Este foi o método empregado na determinação do conteúdo de proteínas dos alimentos analisados na pesquisa descrita nesta dissertação de mestrado.

As cinzas de um alimento são o resíduo obtido quando se aquece a amostra alimentar a uma temperatura alta, algo em torno de 550 - 570 °C. Elas abrangem a parte inorgânica do alimento, isto é, os elementos químicos presentes na constituição do alimento. Tais elementos químicos são fundamentais na dieta humana, pois são necessários para a manutenção de condições metabólicas saudáveis. É importante ressaltar que nem sempre o resíduo obtido na determinação de cinzas representa toda a parte inorgânica presente no alimento, uma vez que alguns sais podem sofrer volatilização durante o aquecimento a temperaturas altas [93]. No entanto, o teor de

cinzas de uma amostra alimentar fornece uma indicação da quantidade total de elementos químicos presentes em um dado alimento, mostrando o seu potencial nutritivo no que tange aos elementos químicos essenciais ao organismo humano.

Os carboidratos (ou hidratos de carbono) constituem um conjunto de substâncias (formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio) que atuam como fornecedores diretos de energia para o organismo humano. Nos alimentos, os carboidratos apresentam-se na forma de diferentes substâncias, tais como a glicose, sacarose, frutose, lactose, dentre outros. Nos grãos cereais em geral, o principal carboidrato presente é o amido, um polissacarídeo da glicose formado pela junção de dois outros polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. Existem procedimentos específicos para quantificar alguns desses carboidratos, como o amido e a glicose, em amostras alimentares. No entanto, para fins de determinação de composição centesimal de alimentos, o teor de carboidratos é geralmente obtido por diferença, subtraindo, de 100 %, a soma das porcentagens de umidade, lipídios, proteínas e cinzas.

1.8. Determinação de elementos químicos por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica é uma das técnicas mais usadas para a determinação de elementos químicos em alimentos, apesar de que sua utilização está apresentando uma diminuição relativa devido ao surgimento das técnicas de análise multielementar simultânea [94]. As duas principais modalidades usadas na análise elementar é a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (sigla inglesa, F AAS) e a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (sigla inglesa, ET AAS). Essas duas técnicas diferem basicamente nas instrumentações utilizadas (tipos de equipamento) e nos limites de detecção. Entretanto, ambas se baseiam no processo de absorção da radiação eletromagnética por átomos no estado gasoso. Para compreender tal processo é importante entender que os átomos são constituídos de um núcleo (contendo prótons e nêutrons, isto é, os núcleons) envolto por uma camada de elétrons, muitas vezes denominada eletrosfera. Tais elétrons ocupam orbitais atômicos específicos e com uma dada energia, ou melhor, seus estados são descritos por funções de onda que pontuam as características desses elétrons, sobretudo suas energias. O estado do átomo (na sua forma neutra, isto é, com o número de prótons do núcleo igual ao número de elétrons da eletrosfera) em que os elétrons ocupam os orbitais atômicos (seguindo o princípio da exclusão de Pauli e a regra de Hund) com as menores energias

possíveis é chamado de Estado Fundamental do átomo (no inglês, “Ground State”). Este é o estado termodinâmico em que o átomo de um determinado elemento químico possui a menor energia possível. No processo de absorção de radiação eletromagnética por átomos, a energia desta radiação (calculada pela energia dos fótons desta radiação, $E = h \cdot \nu$, onde h é a constante de Plank e ν é a frequência da radiação) excita os elétrons, promovendo uma transição eletrônica, isto é, um elétron passa de seu nível de energia original (do átomo no estado fundamental) para outro nível com energia maior. O estado do átomo com o elétron (ou os elétrons) neste nível de energia maior é chamado de Estado Excitado; neste estado a configuração eletrônica do átomo é diferente da configuração do átomo no Estado Fundamental. A figura abaixo ilustra o processo de absorção da radiação eletromagnética por átomos, conforme descrito.

Figura 3. O processo de absorção atômica. O ponto cheio representa o elétron e os traços horizontais representam os níveis de energia do átomo.

As técnicas espectrométricas de F AAS e ET AAS fundamentam-se neste processo de absorção. Para fins quantitativos, o sinal analítico de interesse em ambas as técnicas é a relação entre a intensidade (potência radiante) da radiação incidente na amostra (I_0 ou Φ_0) de átomos no estado gasoso, neutro e fundamental, e a intensidade (potência radiante) da radiação que deixa a amostra (I ou Φ) atingindo o detector do equipamento (tanto na técnica de F AAS, quanto na de ET AAS).

Figura 4. O processo de absorção atômica. Neste caso a fonte de atomização (geração de átomos no estado gasoso) é uma chama aquecida (técnica de F AAS).

A grandeza de interesse determinada por estas duas intensidade de radiação é a transmitância ($T = I/I_0$) e/ou absorvância ($A = \log_{10}(I_0/I)$, ou $A = -\log T$) da amostra analisada.

Os equipamentos destinados à técnica de Espectrometria de Absorção Atômica possuem uma constituição básica em termos de instrumentação. A figura a seguir indica os principais componentes destes equipamentos.

Figura 5. Os principais componentes de um Espectrômetro de Absorção Atômica. Conforme indica a figura, a fonte de atomização pode ser uma chama (F AAS) ou um forno (ET AAS).

A fonte de luz providencia uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda (λ) adequado para excitar átomos de um elemento químico em específico. Para cada elemento químico a ser determinado é necessário uma fonte de radiação eletromagnética específica; tal fonte é fornecida por uma lâmpada denominada Lâmpada de Cátodo Oco (outras fontes de radiação usadas são as fontes de espectro contínuo e as lâmpadas de descarga sem eletrodos, EDL). Esta lâmpada é constituída por um cátodo e um ânodo encerrados dentro de um cilindro oco de vidro; o interior deste cilindro é preenchido com um gás inerte, geralmente argônio ou neônio, em baixa pressão (1 a 4 mmHg). O cátodo é constituído da forma metálica do elemento a ser determinado (ou por um metal revestido pelo elemento de interesse a ser determinado); por exemplo, se o interesse é a quantificação de sódio por F AAS, o cátodo da lâmpada de cátodo oco usada na análise é constituído de sódio metálico. No funcionamento da lâmpada, quando um potencial elétrico é aplicado entre o cátodo e o ânodo, os átomos do gás inerte presentes no interior da lâmpada se ionizam, gerando cátions no estado gasoso (por exemplo, cátions $\text{Ar}^+_{(g)}$). Devido à diferença de potencial elétrico existente entre o cátodo e o ânodo, os cátions gerados são acelerados no sentido do cátodo (pólo negativo), colidindo contra este; as colisões dos cátions contra o cátodo promovem a liberação de átomos do elemento constitutivo do cátodo; esta etapa é conhecida no

inglês como “Sputtering”. Em seguida, os átomos neutros liberados, presentes no estado fundamental (representado simbolicamente como M^0), colidem com os cátions $Ar^+_{(g)}$ que estão sendo acelerados para o cátodo; estas colisões fazem com que os átomos liberados do cátodo passem do Estado Fundamental para o Estado Excitado (simbolicamente representado como M^*); este último processo é denominado Excitação (no inglês, “Excitation”). Os átomos excitados, ao retornarem para o Estado Fundamental, emitem radiação eletromagnética com uma frequência (ou um comprimento de onda) correspondente à diferença de energia entre os dois estados; esta radiação corresponde à radiação eletromagnética emitida pela lâmpada de cátodo oco. Este último processo recebe o nome de Emissão (no inglês, “Emission”). Uma vez que a diferença de energia entre os dois estados atômicos depende da identidade química do elemento constitutivo do cátodo, a radiação eletromagnética emitida no processo de relaxamento (passagem do Estado Excitado para o Estado Fundamental) é específica para ser absorvida pelos átomos do elemento constitutivo do cátodo da lâmpada, que é o elemento em análise. A figura abaixo ilustra os três processos em que se baseia o funcionamento da lâmpada de cátodo oco.

Figura 6. As três etapas do funcionamento de uma lâmpada de cátodo oco usada nos Espectrômetros de Absorção Atômica.

Entre a fonte de radiação eletromagnética (lâmpada de cátodo oco) e o compartimento da amostra (a chama em F AAS, ou o Forno de Grafita em ET AAS) existe, geralmente, um espelho rotatório que possui a função de modular a radiação emitida pela lâmpada. O espelho rotatório modula a radiação fazendo com que a radiação emitida pela lâmpada se alterne rapidamente entre um modo “ligado” e “desligado” no que diz respeito à sua passagem pelo local da amostra (Chama ou Forno de Grafita); ou seja, ora ele permite que a radiação emitida pela lâmpada passe pela amostra, ora ele impede essa passagem, desviando-a. Isto fornece um meio de seletivamente amplificar a luz emitida pela lâmpada e ignorar a emissão proveniente

unicamente do compartimento da amostra (a Chama ou a incandescência do Forno de Grafita).

Outra parte fundamental de um Espectrômetro de Absorção Atômica é a fonte de atomização da amostra, isto é, o local onde átomos do elemento de interesse no estado gasoso serão gerados para poderem absorver a radiação eletromagnética emitida pela lâmpada de cátodo oco. Esta parte pode ser constituída por uma Chama (alimentada por um combustível e um oxidante) ou por um Forno de Grafita aquecido eletricamente. Os detalhes dessas fontes de atomização serão descritos nas seções 1.8.1 e 1.8.2 que seguem esta seção.

Logo após o compartimento da amostra existe um monocromador que possui a função de selecionar um comprimento de onda específico para ser usado nas determinações. A lâmpada de cátodo oco adequada para a determinação de certo elemento químico (por Espectrometria de Absorção Atômica) não emite apenas um único comprimento de onda, mas uma estreita faixa constituída de alguns comprimentos de onda. De acordo com a sensibilidade desejada para a quantificação, pode-se escolher um dentre os comprimentos de onda possíveis a serem usados na medida. Desse modo, seleciona-se apenas um dos comprimentos de onda para que o detector determine as intensidades I_0 e I das radiações incidentes e emergentes da amostra, respectivamente. O monocromador é um dispositivo que seleciona as radiações (com determinados comprimentos de onda em específico) que atingirão o detector nos experimentos de AAS (sigla inglesa para Espectrometria de Absorção Atômica). O monocromador separa a linha espectral (a linha espectral é o mesmo que o comprimento de onda da radiação) de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, através da utilização de um prisma ou rede de difração associado a duas fendas estreitas que servem para a entrada e saída da radiação.

Os detectores encontrados nos espectrômetros de absorção atômica são as válvulas fotomultiplicadoras. A válvula fotomultiplicadora consiste de um sistema compacto composto por um cátodo recoberto com uma camada sensível à luz, e um ânodo que circunda o cátodo, ambos contidos no interior de um tubo de vidro mantido a vácuo. O potencial do ânodo é positivo e é mantido por uma fonte externa. Na superfície fotossensível do cátodo ocorre a emissão de fotoelétrons devido à incidência de radiação eletromagnética com energia $E = h \cdot \nu$ (particularmente nas regiões espectrais da luz visível e do ultravioleta), proveniente da fonte de radiação (lâmpada de cátodo oco) após ter atravessado a região da amostra (Chama ou Forno de Grafita) e ter sido selecionada na fenda de saída do monocromador (isto é, apenas um dos comprimentos

de onda emitidos pela fonte de radiação atinge o detector). Geralmente, a superfície do cátodo é constituída de um material que libera facilmente os elétrons externos, como, por exemplo, os metais alcalinos que possuem energias de ionização baixas e podem ser depositados em uma superfície por sublimação. Entre o cátodo e o ânodo existe uma série de dinodos, eletrodos também recobertos com material fotossensível. O potencial de cada dinodo é mantido, a partir do cátodo, cada vez mais positivo, atingindo o valor positivo máximo no ânodo. Os fotoelétrons emitidos do cátodo são acelerados até a série de dinodos. À medida que cada elétron se choca com um dinodo, provoca a liberação de 2 a 5 elétrons deste último, sendo que cada um desses elétrons provocará a retirada de mais 2 a 5 elétrons do próximo dinodo, e assim sucessivamente. Um tubo fotomultiplicador contendo 12 dinodos entre o cátodo e o ânodo provoca o deslocamento de aproximadamente 17 milhões de elétrons, gerando uma corrente elétrica de aproximadamente 1 mA. Após os elétrons serem gerados pela válvula fotomultiplicadora, os mesmos são recebidos num sistema de amplificação, que aumenta ainda mais o sinal original. A figura a seguir ilustra o funcionamento de uma válvula fotomultiplicadora.

Figura 7. Esquema de uma válvula fotomultiplicadora usada no sistema de detecção de Espectrômetros de Absorção Atômica. A válvula é composta de nove (9) dinodos mantidos nos potenciais E_i ($i = 0, 1, 2, \dots, 9$).

O sistema de detecção consiste de um amperímetro analítico, ou seja, um dispositivo capaz de medir a corrente proveniente da válvula fotomultiplicadora; essa corrente é registrada por meio de um sistema digital. Os espectrômetros modernos são interfaceados a um software de um microcomputador, que executa várias funções, permitindo o registro do sinal em absorbância ou concentração (mg/L, $\mu\text{g/L}$, etc.), registrando as curvas de calibração, verificando os coeficientes de correlação,

calculando médias e desvios-padrão, enfim, processando uma série de informações necessárias ao controle de qualidade da análise.

1.8.1. F AAS

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) pode determinar muitos elementos químicos com importância nutricional (micro e macrominerais) e também alguns elementos tóxicos em níveis de interesse presentes em amostras alimentares. As soluções destinadas à análise são aspiradas para dentro de uma chama que é usualmente constituída de ar-acetileno ou óxido nitroso-acetileno, dependendo do elemento de interesse (nestes dois tipos de chama o combustível é o acetileno, sendo o oxidante o ar, ou o óxido nitroso). Preferencialmente, as soluções devem estar límpidas (sem material particulado em suspensão) para serem conduzidas à análise.

Os instrumentos destinados à técnica de F AAS (os Espectrômetros de Absorção Atômica com Chama) são relativamente simples de operar. Já existem muitos métodos padronizados para a determinação de elementos químicos em alimentos usando F AAS disponíveis em trabalhos científicos [94 - 100]; tais trabalhos se destinaram a quantificação de elementos em alimentos, inclusive os do grupo das frutas, hortaliças e cereais. Isto mostra a importância da técnica, bem como a relevância de se propor estudos que visem quantificar micro e macroelementos em amostras alimentares.

Falando especificamente da técnica, em um experimento de absorção atômica com chama uma amostra líquida é aspirada (sugada) para dentro de uma chama cuja temperatura é de 2000 K a 3000 K (em geral). O líquido (solvente) evapora e o sólido restante é atomizado (decomposto em átomos) na chama, gerando átomos do elemento químico de interesse no estado gasoso.

O atomizador é uma parte importante da Espectrometria de Absorção Atômica, pois neste dispositivo serão gerados os átomos gasosos no estado fundamental, que absorverão a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação. No caso da técnica de F AAS, usa-se um queimador de mistura prévia (ou queimador de fluxo laminar). Neste tipo de queimador, o combustível, o oxidante e a amostra são misturados antes de serem introduzidos na chama. A amostra em solução (não necessariamente aquosa) é aspirada por um tubo capilar para dentro de um nebulizador pneumático, pelo fluxo rápido do oxidante (comumente o ar) próximo da ponta do capilar. O líquido se dispersa como uma fina névoa assim que deixa o capilar. A névoa é direcionada em alta velocidade sobre uma pérola de vidro, na qual as gotículas se dispersam em partículas ainda menores. A formação de pequenas gotículas

é chamada de nebulização. Forma-se, então, um aerossol, isto é, finas partículas líquidas dispersas em um gás. Desse modo, o nebulizador produz um aerossol a partir da amostra líquida. O aerossol, o oxidante e o combustível fluem pelos defletores, que promovem uma homogeneização adicional e evitam a passagem de gotículas grandes de líquido. O líquido inicialmente aspirado que não consegue entrar na chama é coletado no fundo da câmara de nebulização e é eliminado por meio de um dreno. Aproximadamente apenas 5% da amostra inicialmente aspirada consegue entrar na chama para a realização das determinações. A figura a seguir, adaptada do livro “Princípios de Análise Instrumental” (Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A; 5ª Edição, 2001), é um esquema do queimador de mistura prévia descrito no texto.

Figura 8. Queimador de mistura prévia (queimador de fluxo laminar) usado em Espectrômetros de Absorção Atômica com Chama.

Por meio de uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda selecionado para a determinação de um elemento em específico (usa-se, com frequência, uma lâmpada de cátodo oco para a geração desta radiação), mede-se a absorção do elemento atomizado na chama, gerando o sinal analítico de interesse. A quantificação faz-se comumente por um de dois métodos disponíveis: calibração externa ou adição de padrão.

Falando-se especificamente da quantificação por calibração externa, tomam-se inicialmente soluções do analito de interesse (um elemento metálico) com concentrações gradativamente crescentes e bem conhecidas. O meio em que tais

soluções são preparadas deve preferencialmente simular o meio das amostras reais contendo o analito para ser quantificado, evitando assim problemas de interferência de matriz que poderiam acarretar erros no valor calculado da quantidade do analito nas amostras. Com estas soluções padrão do analito, mede-se em um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama os valores da absorbância de cada um dos padrões, construindo em seguida uma curva de calibração externa, relacionando os valores de absorbância (eixo das ordenadas) com as respectivas concentrações (eixo das abscissas). De posse desta curva (que na verdade deve, de preferência, ser uma reta) pode-se quantificar o analito na amostra de interesse, medindo a absorbância do analito na amostra (com o mesmo aparelho usado na construção da curva de calibração externa) e verificando na curva de calibração a concentração correspondente aquela absorbância. Este método de quantificação é um dos mais usados em Química Analítica, não somente em Espectrometria de Absorção Atômica, mas também em outras técnicas quantitativas de análise.

Um fato importante nas determinações por F AAS diz respeito ao controle dos interferentes. Existem alguns tipos de interferências que podem prejudicar uma determinação feita por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama; estas podem ser divididas em duas classes: interferência espectral e interferência não espectral. O principal tipo de interferência espectral é a absorção de fundo, que se refere à superposição do sinal do analito aos sinais devido a outros elementos ou moléculas presentes na amostra, ou aos sinais provenientes da chama.

As interferências não espectrais são as mais comuns em experimentos de absorção atômica com chama. Os dois principais tipos de interferência não espectral são a interferência química e a interferência de ionização. A interferência química refere-se a reações químicas que diminuem a extensão de atomização do analito, causando um erro negativo na medida de sua real concentração em uma amostra. Um exemplo muito comum deste tipo de interferência ocorre na determinação de cálcio por F AAS. Os íons SO_4^{-2} e PO_4^{-3} dificultam a atomização do Ca, possivelmente pela formação de sais que não são voláteis. Para corrigir este tipo de interferência usam-se os chamados agentes de liberação, que são produtos químicos adicionados a uma amostra para diminuir a interferência química. O mais comum agente de liberação usado neste caso são sais contendo íons La^{+3} , que reagem preferencialmente com os íons fosfato e sulfato, liberando o cálcio para a atomização.

A interferência de ionização pode ser um problema na determinação de metais alcalinos (Na e K, por exemplo) nas temperaturas usuais de uma chama. Para entender

este tipo de interferência deve-se lembrar de que existe um equilíbrio de ionização em fase gasosa para qualquer elemento, que pode ser representado pela equação química abaixo:

Como os metais alcalinos possuem as menores energias de ionização, eles são os metais mais facilmente ionizados, isto é, transformados em cátions. Nas temperaturas típicas atingidas por uma chama (2000 K a 3000 K) os átomos de Na e/ou K recebem energia suficiente para estarem consideravelmente ionizados. Uma vez que os átomos ionizados (na forma de cátions) possuem níveis de energia diferentes dos mesmos níveis dos átomos neutros, o sinal de interesse (que é a absorção de radiação por átomos neutros, gasosos e no Estado Fundamental) diminui. Para corrigir este tipo de interferência usa-se um supressor de ionização. O supressor de ionização é um elemento adicionado à amostra (em uma determinada concentração) com a função de diminuir o grau de ionização do analito. Este elemento deve apresentar uma energia de ionização menor do que o elemento de interesse na determinação. Desse modo, o supressor de ionização se ioniza mais que o elemento de interesse na chama, liberando muitos elétrons que fazem com que o equilíbrio de ionização do elemento de interesse se desloque para a esquerda (conforme previsto pelo princípio de Le Chatelier), isto é, no sentido de aumentar a concentração de átomos neutros (não ionizados).

1.8.2. ET AAS

A Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica [101, 102, 103] (comumente referida Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafita) pode determinar uma variedade de elementos nutrientes e tóxicos em níveis de interesse nos alimentos. Nesta técnica, uma pequena alíquota da solução a ser analisada (geralmente na ordem de 20 a 100 µL, uma quantidade bem menor do que para a análise por F AAS, que requer geralmente pelo menos 1 a 2 mL de amostra) é injetada dentro de um tubo de grafita que, usualmente, contém uma plataforma de grafita (chamada plataforma de L'vov); o tubo de grafita é denominado forno (refere-se a ele como forno de grafita).

O forno de grafita em ET AAS desempenha uma função análoga à Chama em F AAS. O desempenho do forno é muito superior a um simples tubo oco de grafita. A

figura a seguir, adaptada de [104], é um esquema de um típico forno de grafita usado em Espectrômetros de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica.

Figura 9. Típico Forno de Grafita usado em Espectrômetros de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica.

A amostra é injetada em uma plataforma chamada plataforma de L'vov, que é aquecida pela radiação vinda da parede do forno, de modo que sua temperatura permanece menor do que a da parede durante o aquecimento. A radiação citada provém da incandescência da parede do forno aquecida eletricamente (por isso se diz “Atomização Eletrotérmica”). Apesar de na Figura 9 não ser visível, a plataforma de L'vov está muito próxima da parede do forno, no entanto não chega a encostar-se a ela. O forno representado na Figura 9 é aquecido transversalmente (de um lado a outro), fato que proporciona uma temperatura quase uniforme em todo o forno. Existem desenhos de fornos em que ocorre um aquecimento longitudinal (de uma extremidade a outra); nestes casos, o centro do forno fica mais quente que as extremidades, gerando o denominado efeito de memória: os átomos provenientes da região central condensam nas extremidades, podendo evaporar durante a atomização de outra amostra, gerando erros na determinação do analito.

Considerando o forno da Figura 9, o analito na plataforma não vaporiza até que a parede atinja uma temperatura constante. Nestas condições, o sinal analítico de interesse (que é a absorbância dos átomos gerados no processo de atomização do analito) é maior do que se o aquecimento fosse realizado diretamente a partir da parede do forno, e a área sob o pico de absorbância é uma medida confiável da quantidade total do analito (elemento químico a ser determinado) vaporizado a partir da amostra.

Com a amostra dentro do forno inicia-se um programa de aquecimento do mesmo, que é comumente dividido em cinco etapas. As duas primeiras etapas são

destinadas à *secagem* da amostra, de modo a remover o solvente. Após a secagem, segue-se uma etapa denominada *pirólise* (ou queima), na qual é eliminada a matriz da amostra, restando apenas o analito de interesse (o elemento metálico a ser quantificado). Na quarta etapa, denominada *atomização*, o analito é atomizado (decomposto em átomos) e levado ao estado gasoso; é nesta etapa que se faz a medida da absorbância do elemento de interesse através da passagem de uma radiação eletromagnética com o comprimento de onda específico para a absorção do analito. Na quinta e última etapa eleva-se a temperatura do forno a um valor adequado para fazer a limpeza do mesmo, eliminando qualquer resíduo que tenha permanecido. É importante ressaltar que em cada uma das etapas descritas, a temperatura do forno é ajustada em um valor específico durante um tempo controlado (geralmente por alguns segundos). Esses ajustes de temperatura e controles dos tempos das etapas são feitos automaticamente pelo Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica. A radiação eletromagnética que será absorvida pelo elemento de interesse (o analito) é gerada por uma lâmpada de cátodo oco específica.

No que diz respeito à sensibilidade na análise de um determinado elemento químico em uma amostra (por exemplo, uma amostra proveniente da mineralização de um alimento), a técnica de ET AAS é bem mais sensível do que a de F AAS. Isto pode ser entendido com base nos tempos de residência do analito no caminho óptico durante a atomização. Na espectrometria de chama, o tempo de residência do analito no caminho óptico é apenas de uma fração de segundo, quando ele ascende pela chama. Um forno de grafita confina a amostra atomizada no caminho óptico por vários segundos, dispondo, portanto, de uma sensibilidade maior [104]. Desse modo, a quantidade de amostra para uma análise por ET AAS é bem menor do que para uma análise por F AAS, condição que é vantajosa no caso de análises em que não se dispõe de muita amostra.

Na maior parte dos casos, quando se deseja analisar um determinado elemento em uma amostra usando a técnica de ET AAS, faz-se necessário o uso de um modificador de matriz. Denomina-se matriz tudo que esteja presente em uma amostra que não seja o analito. Idealmente, a matriz de uma amostra deve ser evaporada durante a etapa de *pirólise*; um modificador de matriz é uma substância adicionada à amostra para tornar a matriz mais volátil, ou o analito menos volátil, reduzindo, assim, as perdas de analito durante o processo de pirólise [104]. Existem várias composições de modificadores de matriz, e para cada elemento a ser analisado geralmente se tem um modificador adequado.

A quantificação de um determinado elemento químico usando ET AAS é semelhante à usada na técnica de F AAS, e é realizada na maior parte dos casos através de uma curva de calibração externa, conforme já explicado anteriormente. Falando especificamente da análise de alimentos com ET AAS, apenas para citar, várias pesquisas já foram realizadas na busca de determinar os teores de determinados elementos químicos em certos alimentos, inclusive dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais [105 - 108].

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

O objetivo principal da pesquisa desenvolvida e descrita nesta dissertação de mestrado foi quantificar e avaliar a bioacessibilidade (usando um teste *in vitro*) de micro e macroelementos em alimentos dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais que fazem parte da dieta do brasileiro, e também de outros alimentos (dentro do grupo supracitado) que não são tradicionais perante a maioria da população do Brasil, com o intuito de buscar alternativas nutritivas e promover o consumo e a cultura destes alimentos. Os elementos analisados foram: Zn, Cu, Fe (microelementos), Mg, Ca, Na e K (macroelementos).

2.2. Outros objetivos

Como outros objetivos da pesquisa desta presente dissertação citam-se:

- ✓ Determinação da composição centesimal (porcentagens de lipídios, proteínas, carboidratos, cinzas e umidade) dos alimentos analisados, visando fortalecer as conclusões da pesquisa e obter eventuais correlações com os outros resultados;
- ✓ Determinação do conteúdo de fitatos (ácido fítico) dos alimentos analisados, buscando obter uma correlação entre este conteúdo e as porcentagens de bioacessibilidade obtidas (para os elementos em estudo) por meio do teste *in vitro*.

3. Parte experimental

3.1. Obtenção dos alimentos para as análises

Os alimentos que foram analisados na pesquisa descrita nesta dissertação de mestrado inserem-se dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais e, para efeitos de comparação, foram divididos em duas classes: a) alimentos mais conhecidos e b) alimentos menos conhecidos pela população brasileira em geral. Dentro do primeiro grupo inserem-se banana nanica (*Musa acuminata* Colla x *Musa balbisiana* Colla, grupo genômico AAA), maçã (*Malus domestica*), alface (*Lactuca sativa* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e milho (*Zea mays* L.), e no segundo grupo inserem-se cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), graviola (*Annona muricata* L.), alfavaca (*Ocimum basilicum* L.), amaranto (*Amaranthus cruentus*) e quinoa (*Chenopodium quinoa* W.).

A tabela a seguir distribui cada um destes alimentos conforme a sua classe e o seu tipo (fruta, hortaliça ou cereal).

Tabela 2. Alimentos analisados na pesquisa

		CLASSES	
		Mais conhecidos	Menos conhecidos**
TIPOS	Frutas	Banana	Cupuaçu
		Maçã	Graviola
	Hortaliças	Alface	Alfavaca
	Cereais	Arroz	Amaranto*
Milho		Quinoa*	

* Amaranto e Quinoa são classificados, na verdade, como pseudocereais. No entanto, eles serão denominados “cereais” no escopo desta dissertação de mestrado.

** Trata-se de alimentos menos conhecidos pela população brasileira de uma forma geral. Eles podem ser conhecidos em algumas regiões e/ou localidades do Brasil, mas, na maioria das regiões, esses alimentos não são comuns.

Todos os alimentos analisados foram adquiridos em supermercados e varejões da cidade de Ribeirão Preto (SP, Brasil). Os alimentos estavam expostos à venda nas bancadas ou prateleiras destes estabelecimentos, e foram selecionados aleatoriamente para a realização das análises, conforme descrição a seguir:

- ✓ *Banana*: a amostra consistiu de seis (6) bananas nanicas maduras, cuja casca apresentava coloração amarelada típica da fruta. Escolheu-se a banana nanica, pois ela, juntamente com a banana prata, é uma das variedades de banana mais

cultivadas e conhecidas pela população brasileira. As bananas da amostra foram tomadas na bancada de frutas de um varejão da cidade de Ribeirão Preto (SP);

- ✓ *Maçã*: a amostra consistiu de sete (7) maçãs vermelhas (da variedade R. Gala) que já estavam maduras e, por isso, adequadas ao consumo humano. As maçãs da amostra foram tomadas na bancada de frutas de um varejão da cidade de Ribeirão Preto (SP);
- ✓ *Alface*: a amostra consistiu de vários “molhos” de alface crespa adquiridos em um supermercado da cidade de Ribeirão Preto (SP). As alfaces estavam visualmente adequadas ao consumo, apresentando-se frescas e com a coloração esverdeada característica;
- ✓ *Arroz*: a amostra de arroz foi obtida a partir de um pacote do produto exposto à venda na prateleira de um supermercado de Ribeirão Preto (SP). As especificações deste produto eram: arroz Vasconcelos, T-1, agulhinha, fabricado em 06/05/2010, lote 87, pacote de 5 Kg. Tratava-se de um arroz branco e polido;
- ✓ *Milho*: a amostra de milho consistiu de um pacote embalado de espigas de milho verde exposto à venda em um supermercado da cidade de Ribeirão Preto (SP). O pacote continha cinco (5) espigas de milho prontas para preparação alimentar;
- ✓ *Cupuaçu*: a amostra de cupuaçu foi obtida junto a um varejão da cidade de Ribeirão Preto (SP). Adquiriu-se sete (7) unidades dessa fruta típica da região amazônica, que estavam frescas e adequadas ao consumo humano (maduras). Apesar de o cupuaçu ser típico da região amazônica, este varejão tinha poucas unidades desta fruta disponível para venda, pois a mesma não é muito conhecida e procurada na cidade de Ribeirão Preto;
- ✓ *Graviola*: a graviola, assim como o cupuaçu, é uma fruta típica da região amazônica que é pouco comercializada em varejões e supermercados de outras regiões do Brasil. A amostra desta fruta foi adquirida no mesmo varejão em que foi obtido o cupuaçu, e consistia de duas (2) unidades da fruta madura;
- ✓ *Alfavaca*: a amostra consistiu de vários “molhos” desta hortaliça adquiridos no mesmo varejão onde foram obtidos o cupuaçu e a graviola. Assim como esses últimos, tal hortaliça não é usual na dieta da maior parcela da população brasileira e, por isso, apenas uma pequena quantidade da mesma era disponível à venda no varejão;
- ✓ *Amaranto*: a amostra de amaranto destinada às análises foi adquirida junto a um varejão da cidade de Ribeirão Preto (SP). Obteve-se uma massa adequada para a realização de todas as análises;

- ✓ *Quinoa*: a amostra de quinoa destinada às análises foi adquirida junto a um varejão da cidade de Ribeirão Preto (SP), no qual se obteve uma massa adequada deste pseudocereal para a realização de todas as análises.

Mostra-se na tabela a seguir fotografias digitais de todos esses alimentos descritos, para que se constate o aspecto físico com que foram encaminhados às análises.

Tabela 3. Fotografias digitais dos alimentos analisados na pesquisa

Arroz	Milho

Alface	Maçã

Banana	Amaranto

Quinoa	Alfavaca

Cupuaçu	Graviola

As fotografias das amostras de alface e alfavaca referem-se à amostra picada que foi conduzida ao procedimento de secagem, conforme será descrito adiante no texto desta dissertação (seção 3.4).

Vale ressaltar a informação que está presente como nota da Tabela 2: amaranto e quinoa, apesar de serem pseudocereais típicos de países andinos, serão nesta dissertação de mestrado classificados simplesmente como “cereais”. Pode-se dizer que *pseudocereais* são sementes semelhantes aos cereais, isto é, sementes com amido que não pertencem de fato à classe dos cereais; no entanto, na culinária, são utilizados como cereais e por isso são confundidos com esses. Os pseudocereais têm uma particularidade: eles não contêm glúten em suas constituições, sendo usados na dieta de pessoas alérgicas a essa substância [109].

Todas as amostras alimentares descritas foram submetidas à secagem para a remoção de seus conteúdos de umidade. A finalidade disso foi conservar as amostras, uma vez que logisticamente não havia condições de efetuar todas as análises (quantificação do total de micro e macroelementos, testes de bioacessibilidade *in vitro*, determinação do conteúdo de fitatos e determinação da composição centesimal) tão logo as amostras fossem obtidas.

3.2. Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes usados possuíam pureza analítica (p.a.) e todas as soluções foram preparadas usando água com alta resistividade (18,2 M Ω) obtida de um sistema Milli-Q da Millipore. Na secagem das amostras alimentares usou-se uma estufa de secagem e esterilização (Tecnal, TE 393/2). Ácido nítrico concentrado (HNO₃, 65 %, 14 mol L⁻¹, Merck), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30 %, 110 volumes, Carlo Erba) e um bloco digestor (Marconi, modelo MA4025) foram usados na mineralização das amostras. Para o teste de bioacessibilidade *in vitro* usou-se solução de pepsina (Pepsina Powder, J. T. Baker) 6% m/v (obtida dissolvendo 6 g de pepsina em 100 mL de solução de HCl 0,03 mol L⁻¹, pH = 1,75, preparada em água Milli-Q), solução de pancreatina (Pancreatin from Porcine Pancreas, Sigma Aldrich) e sais biliares (Bile Salts, Fluka Analytical) (obtida dissolvendo 0,5 g de pancreatina em 100 mL de água Milli-Q contendo 0,25 g de sais biliares), solução saturada de Bicarbonato de Amônio (NH₄HCO₃, Fluka Analytical) para ajuste de pH, e um banho de água com temperatura e agitação controladas (Marconi, Banho metabólico Dubnoff, MA - 095/CF). No experimento para a determinação do conteúdo de fitatos nos alimentos usou-se solução

de HCl (Merck) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, solução ácida de Fe^{+3} (10 mL de um padrão de Fe ($1000 \mu\text{g g}^{-1}$) na forma de FeCl_3 foram misturados com $828 \mu\text{L}$ de HCl concentrado (Merck, 12 mol L^{-1}), completando a seguir o volume para 50 mL com água Milli-Q), solução de bipyridina e ácido tioglicólico (2,5 g de 2,2'-bipyridina (Vetec) foram misturadas com 2,5 mL de ácido tioglicólico (Vetec), e o volume foi completado para 50 mL com água Milli-Q), fitato de sódio (Phytic acid sodium salt hydrate, Sigma Aldrich), mesa agitadora (Tecnal, TE-1401), banho de água com temperatura controlada (Marconi, Banho Maria-MA127), e uma centrífuga (Hermle, Z326K). Na determinação da composição centesimal usaram-se os reagentes e equipamentos descritos a seguir. Para a determinação da umidade se usou a estufa de secagem e esterilização já descrita, e uma balança analítica (com quatro casas decimais após a vírgula). Na determinação do conteúdo de lipídios usou-se, além da estufa de secagem e da balança analítica, um aparelho extrator tipo Soxhlet (Marconi, MA-491/6), um frasco dessecador com partículas de sílica como agente secante, e éter etílico (Merck). Para a determinação do teor de proteínas nas amostras alimentares usou-se um sistema de destilação Kjeldahl (Marconi, modelo MA-449/6/800), uma chapa aquecedora (Tecnal, modelo TE0181), balões Kjeldahl de 500 mL, frascos Erlenmeyer de 500 mL, bureta de 50 mL, ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , Merck), solução aquosa de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, solução de fenolftaleína, vermelho de metila 1 % m/v, zinco em pó (Merck), solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH, Merck) a 30 % m/m, solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro (todos da Sigma-Aldrich), na proporção 0,3:0,3:6). Na determinação do conteúdo de cinzas usaram-se cadinhos de porcelana, balança analítica e um forno mufla (Tecnal, 3000-10P).

As determinações dos elementos químicos considerados nesta pesquisa foram realizadas usando o Espectrômetro de Absorção Atômica *AAAnalyst 800* (Perkin Elmer), que pode operar no modo de ET AAS (Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, Forno de Grafita) ou F AAS (Espectrometria de Absorção Atômica com Chama). Nestas determinações usaram-se padrões (destinados à absorção atômica, $1000 \mu\text{g g}^{-1}$) dos vários elementos em estudo (Fe, Cu, Zn, Na, K, Ca e Mg), a fim de se prepararem as soluções quando da quantificação dos elementos nas amostras.

3.3. Condições para as análises

As amostras alimentares dos alimentos estudados nesta pesquisa foram destinadas a quatro análises distintas: digestão total (mineralização) para a determinação das quantidades totais dos elementos químicos em estudo nas amostras, teste de bioacessibilidade *in vitro*, determinação do conteúdo de fitatos, e determinação da composição centesimal. Para se efetuar adequadas comparações, as massas de cada um dos alimentos destinadas a essas análises foram provenientes de uma mesma amostra alimentar (para cada alimento em separado) seca e homogeneizada. Descreve-se a seguir o estado em que cada um dos alimentos analisados foi conduzido à secagem.

Cereais: as amostras originais de arroz, milho, amaranto e quinoa foram lavadas em água Milli-Q para a remoção de possíveis sujeiras nelas presentes. Uma parte de cada uma dessas amostras lavadas foi submetida ao procedimento de secagem descrito na próxima seção (seção 3.4). A outra parte foi cozida em água Milli-Q, sem óleo nem temperos; em seguida, estas amostras cozidas também foram levadas à secagem. Adotou-se tal procedimento, pois os cereais são, de modo geral, alimentos consumidos na forma cozida, e desejava-se, como um objetivo da pesquisa, avaliar o efeito da cocção sobre as quantidades totais e bioacessíveis dos micro e macroelementos nos cereais em estudo.

Frutas: as frutas são espécies alimentares que podem ser consumidas de diversas formas na dieta das pessoas (*in natura*, como sucos, doces, etc.). Sendo assim, para que os resultados fossem mais gerais, as análises desta pesquisa foram realizadas com as frutas *in natura*. As cascas e/ou sementes das frutas analisadas (banana, maçã, cupuaçu e graviola) foram removidas, e apenas a polpa das frutas foi submetida ao procedimento de secagem.

Hortaliças: as hortalças em estudo (alface e alfavaca) são usadas, na grande maioria dos casos, *in natura* na dieta das pessoas, sobretudo na forma de saladas e/ou temperos. Assim, as amostras de alface e alfavaca foram apenas lavadas em água Milli-Q para a remoção de sujeiras e, em seguida, submetidas à secagem.

3.4. Secagem dos alimentos

Com a finalidade de conservação das amostras alimentares adquiridas para a realização das análises, procedeu-se a secagem das mesmas, isto é, a remoção da água nelas presente. A disponibilidade de água é um dos fatores mais importantes para a

manutenção da vida dos microorganismos que promovem, com o passar do tempo, a deterioração dos alimentos. Nos microorganismos a água serve como meio de transporte de nutrientes para todo o espaço intracelular e também para solubilizar nutrientes que na sua forma original não poderiam ser aproveitados. Desse modo, ao se remover a água de um determinado alimento, impede-se a proliferação desses microorganismos deteriorantes, favorecendo suas mortes e contribuindo significativamente para a conservação da amostra alimentar. Todos os alimentos analisados foram submetidos ao procedimento de secagem que será agora descrito.

Para a secagem das frutas apenas a polpa foi usada. A polpa foi picada em pequenos pedaços com o auxílio de facas e esses pedaços foram espalhados sobre bandejas de alumínio. Alocou-se, em seguida, tais bandejas dentro da estufa de secagem (Tecnal, TE 393/2), mantendo-se a temperatura da mesma em 50 °C. O sistema foi mantido nessa condição por no mínimo 24 horas, deixando um tempo adicional caso a amostra não estivesse totalmente seca. Quando a amostra de fruta já se encontrava seca, a mesma foi deixada esfriar em temperatura ambiente e, posteriormente, alocada no interior de um dessecador (contendo partículas de sílica como agente secante), ficando aí armazenadas.

Na secagem das hortaliças (alface e alfavaca), as amostras lavadas em água Milli-Q foram picadas de tal modo a gerar folhas de pequeno tamanho que eram transferidas para bandejas de alumínio, seguindo-se o mesmo procedimento já descrito para a secagem das frutas. Após secas, as amostras de hortaliças foram alocadas em dessecador para armazenamento.

Para a secagem da amostra de milho, removeu-se os grãos das espigas, lavando-os em água Milli-Q. Uma parte desta amostra foi cozida em água Milli-Q, conforme já mencionado anteriormente. Logo após, tanto os grãos crus quanto os cozidos foram transferidos para bandejas de alumínio, seguindo-se o mesmo procedimento já descrito para a secagem das frutas. As secagens das amostras de arroz, amaranto e quinoa (tanto as amostras cruas quanto as cozidas) seguiram também o mesmo procedimento. Assim como as outras amostras secas, essas amostras de cereais foram alocadas em dessecador para armazenamento.

3.5. Digestão total (mineralização)

Para a determinação das quantidades totais dos micro e macroelementos considerados (Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu e Zn) nos alimentos, procedeu-se a mineralização

(ou digestão) de suas amostras. A mineralização de uma amostra alimentar é a destruição de sua matéria orgânica, restando apenas sua parte inorgânica. O procedimento de mineralização usado nesta pesquisa de mestrado foi adaptado de um dos métodos padrões para a digestão de amostras alimentares citados na literatura [110].

Para a digestão (realizada em triplicata para cada alimento), massas adequadas (medidas em uma balança analítica e compreendidas entre 0,5 g e 1 g) foram tomadas de uma amostra seca e homogeneizada (a homogeneização foi feita com o uso de um processador de alimentos, que reduziu a amostra a uma consistência de pó) do alimento em questão e, em seguida, transferidas para o interior de tubos de ensaio adequados para serem acoplados no bloco digestor. Nos tubos de ensaio foram adicionados 7 mL de HNO_3 concentrado, de tal modo que o volume do ácido cobrisse totalmente a amostra. Os tubos foram alocados nas entradas do bloco digestor e a temperatura deste regulada para que atingisse 65 °C. Manteve-se o sistema nessa situação o tempo suficiente para que praticamente toda a amostra alimentar tivesse, visualmente, se dissolvida no meio ácido. Logo após essa solubilização, os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados em capela para esfriarem a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 1 mL de H_2O_2 à solução dos tubos, alocando-os novamente no bloco digestor e elevando-se a temperatura deste para 95 °C. Os tubos foram parcialmente tampados com filme plástico protetor e o sistema permaneceu nesta situação durante 24 horas. Após este período, com a amostra alimentar mineralizada, transferiu-se a solução resultante da digestão de cada tubo a um frasco de polipropileno que foi acondicionado em geladeira para a posterior realização das determinações dos micro e macroelementos. O procedimento acima descrito foi realizado para cada tipo de amostra alimentar (fruta, hortaliça ou cereal), fazendo-se ainda, paralela e simultaneamente com a digestão das amostras, brancos analíticos contendo os mesmos reagentes e condições usadas na digestão das mesmas. Esses brancos foram usados no momento das análises das soluções para a correta quantificação dos micro e macroelementos nelas presentes.

3.6. Material de referência certificado

O material de referência certificado (sigla inglesa SRM) NIST 1515 - Apple Leaves, do National Institute of Standards and Technology, foi usado para se validar a metodologia de digestão total (mineralização) das amostras alimentares com a finalidade de se determinar as quantidades totais dos micro e macroelementos nelas presentes. Antes do experimento, secou-se uma massa adequada do SRM em um

recipiente dessecador contendo partículas de sílica como agente secante, durante 120 horas, conforme recomendado no protocolo de uso do SRM. Fez-se, em seguida, a digestão (em triplicata) de massas conhecidas deste SRM da mesma forma descrita para as amostras alimentares (seção 3.5). As soluções resultantes das digestões foram convenientemente preparadas para a quantificação (por ET AAS ou F AAS) dos elementos químicos em estudo (Fe, Cu, Zn, Na, K, Ca e Mg).

3.7. Teste de bioacessibilidade *in vitro*

O teste de bioacessibilidade *in vitro* empregado foi um método adaptado do usado por Reddy e colaboradores [56]. O método consiste de duas etapas consecutivas de digestão: a primeira é uma digestão gástrica utilizando solução de pepsina num meio ácido ($\text{pH} = 1,75$), e a segunda etapa consiste em uma digestão intestinal usando uma solução de pancreatina e sais biliares num meio neutro ($\text{pH} \approx 7$). O esquema da Figura 10 resume as etapas principais do método. Este teste de bioacessibilidade *in vitro* é dito “adaptado” do usado no trabalho de Reddy et al. (2007), pois neste último as quantificações de elementos químicos eram feitas após as digestões gástrica e intestinal, obtendo valores de bioacessibilidade para cada uma dessas etapas em separado. No entanto, ao se ingerir um alimento, inevitavelmente o mesmo será submetido à digestão humana completa (englobando as etapas de digestão gástrica e intestinal). Logo, um valor de bioacessibilidade global fornece informações mais objetivas a respeito do potencial nutritivo de um alimento. Assim, no teste usado na pesquisa de mestrado descrita nesta dissertação, a quantificação dos elementos químicos foi efetuada apenas ao final das duas etapas de digestão.

Figura 10. Representação esquemática da digestão gastrointestinal de amostras alimentares para avaliação da bioacessibilidade de elementos químicos (adaptado de Reddy et al., 2007).

Para o teste, uma parte da quantidade total da amostra seca de cada alimento foi triturada em um processador de alimentos, reduzindo-a a uma consistência de pó. Considerando apenas uma das amostras alimentares, aproximadamente 5 g do homogeneizado de alimento foi transferido para cada um de três frascos erlenmeyer de polipropileno, registrando a massa realmente presente em cada um deles. Isto ocorre, pois o teste foi efetuado em triplicata para cada amostra. Inicialmente, aos três erlenmeyers contendo a amostra do mesmo alimento foram adicionados 100 mL da solução de pepsina. O pH do meio resultante era de aproximadamente 1,75, simulando o valor presente no trato gástrico humano. Em seguida, com o auxílio de um bastão de vidro, a solução resultante foi agitada. Posteriormente, os frascos foram tampados e levados ao banho de água cuja temperatura foi ajustada para 37 °C e a agitação para 90 rpm (rotações por minuto). O sistema foi mantido nessa situação durante 3 horas, ao fim das quais o banho foi desligado e os erlenmeyers (com as amostras) retirados do mesmo. Os erlenmeyers foram destampados e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, gotas da solução saturada de NH_4HCO_3 foram adicionadas para elevar o pH das soluções até aproximadamente pH = 7. Em seguida, com o auxílio de bastões de vidro, as soluções foram vigorosamente agitadas para eliminar totalmente os gases gerados durante a neutralização das mesmas. Posteriormente, aos erlenmeyers foram adicionados 75 mL da solução de pancreatina e sais biliares. As soluções foram novamente agitadas e os frascos tampados, levando-os, em seguida, para o banho de água, mantendo novamente a temperatura em 37 °C e a agitação em 90 rpm, durante 4

horas. Ao final deste período, o banho de água foi desligado e os frascos contendo as amostras, retirados.

As soluções resultantes destas duas etapas do teste de bioacessibilidade *in vitro* foram esfriadas até a temperatura ambiente. Em seguida, elas foram transferidas para tubos de polipropileno e centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos. Os sobrenadantes de cada uma das soluções foram filtrados em filtros de 0,42 µm (Whatman®). As soluções resultantes desta filtragem foram transferidas para frascos adequados, e ao volume total de cada uma delas foram adicionados 3 mL de HNO₃ concentrado (Merck, 14 mol L⁻¹). Em seguida, tais frascos (contendo as soluções resultantes do teste de bioacessibilidade *in vitro*) foram acondicionados em geladeira até a realização da determinação dos micro e macroelementos (por ET AAS ou F AAS) nas soluções. Vale ressaltar que a adição de HNO₃ tem a finalidade de melhorar a conservação das amostras antes das determinações [111].

O procedimento descrito foi realizado para todos os alimentos (dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais) contemplados no presente estudo.

3.8. Quantificação dos elementos químicos por F AAS ou ET AAS

As soluções provenientes da digestão total (mineralização, tanto das amostras alimentares analisadas quanto do material de referência certificado) e do teste de bioacessibilidade *in vitro* foram destinadas à quantificação dos micro e macroelementos nelas presentes usando as técnicas de ET AAS ou F AAS, conforme a adequação e a conveniência da determinação. Antes das quantificações, as soluções foram preparadas (diluídas em alguns casos e, quando necessário, misturadas com modificadores químicos adequados) para que a concentração do elemento de interesse abrangesse o interior do intervalo de concentrações da curva de calibração. Usou-se o método da calibração externa (em ambas as técnicas analíticas) para as quantificações. Optou-se pelo uso do método da calibração externa, pois o mesmo proporcionava condições logísticas favoráveis ao desenrolar da pesquisa de mestrado (maior rapidez nas análises e preparação de um menor número de soluções para as quantificações), além de ser um método que se adequava à quantificação dos elementos nas soluções geradas durante os experimentos (matrizes de amostras conhecidas e de fácil simulação). O fundamento do método de calibração externa está descrito na seção 1.8.1. Em todas as quantificações, soluções padrões (1000 µg g⁻¹, Ultra Scientific – Analytical Solutions) dos elementos determinados foram usadas para a construção das curvas de calibração externa. Segue

abaixo uma descrição dos detalhes de como foram realizadas as quantificações dos micro e macroelementos em cada uma das soluções supracitadas.

Soluções provenientes da digestão total (mineralização)

Nas soluções provenientes da digestão total (mineralização) das amostras alimentares (seção 3.5), Mg, Fe, Cu e Zn foram determinados por ET AAS; Na, K e Ca foram determinados por F AAS. O motivo de se ter optado por esta estratégia foi: *a priori*, como uma estratégia da pesquisa, todos os elementos seriam quantificados por ET AAS, pois esta é uma técnica de alta sensibilidade (detecção de concentrações na ordem de $\mu\text{g Kg}^{-1}$) quando comparada com a de F AAS (detecção de concentrações na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$). No entanto, mesmo usando uma quantidade pequena de amostra alimentar na digestão total (massas compreendidas no intervalo de 0,5 g a 1,0 g), as concentrações de alguns dos elementos presentes nas soluções resultantes das digestões eram relativamente altas (na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$), o que permitia uma quantificação usando a técnica de F AAS. Por isso, para os elementos já citados, as análises foram realizadas usando o modo de F AAS do equipamento de absorção atômica. Na realidade, para os elementos Mg (magnésio) e Fe (ferro) as quantificações também poderiam ser feitas usando a técnica de F AAS, pois a concentração desses elementos presentes nas amostras era adequada para tal intuito. Entretanto, isto só foi evidenciado após ter sido feita a quantificação por ET AAS. Apesar de algumas das quantificações terem sido feitas por ET AAS, e outras terem sido feitas por F AAS, esta estratégia não afeta as comparações e conclusões obtidas. Nas soluções provenientes da digestão total da amostra do material de referência certificado (seção 3.6), Fe, Zn, Na, K, Ca e Mg foram determinados por F AAS, e o Cu foi determinado por ET AAS; o motivo disso é o mesmo já explicado anteriormente (elementos presentes em concentrações adequadas para serem determinados por F AAS foram quantificados usando esta técnica, caso contrário, usou-se a técnica de ET AAS). As soluções padrões usadas na construção da curva de calibração externa continham concentrações adequadas do elemento em determinação, e a matriz de tais soluções era composta de água Milli-Q acidificada com HNO_3 (Merck), simulando a matriz das soluções obtidas após as digestões totais. Uma solução aquosa de HNO_3 (Merck) foi usada como branco analítico para a construção da curva de calibração externa e a correta quantificação dos elementos químicos (em ambas as técnicas empregadas, F AAS e ET AAS).

Soluções provenientes do teste de bioacessibilidade *in vitro*

Nas soluções provenientes do teste de bioacessibilidade *in vitro*, o único elemento determinado por ET AAS foi o Cu; os demais elementos (Fe, Zn, Na, K, Ca e Mg) foram determinados por F AAS. O motivo desta estratégia é o mesmo já citado no último parágrafo. Para estas quantificações, as soluções padrões usadas na construção da curva de calibração externa continham concentrações adequadas do elemento em determinação, e a matriz de tais soluções continha todos os reagentes usados no teste de bioacessibilidade *in vitro* (seção 3.7), levando em conta a concentração destes reagentes nas soluções resultantes do teste. Isto foi feito para simular a matriz das amostras gerada ao final do teste *in vitro*, permitindo uma determinação mais exata da quantidade do elemento de interesse nas soluções resultantes do teste.

Para todas as determinações de elementos químicos nas várias amostras foi utilizado o Espectrômetro de Absorção Atômica AAnalyst 800 (PerkinElmer). Trata-se de um espectrômetro de absorção atômica de alto desempenho com um controle virtual de seu sistema mecânico proporcionado pelo software “WinLab32 for AA”. Através deste software pode-se alterar com facilidade o modo de operação do equipamento: modo de chama (técnica de F AAS) ou modo de forno de grafita (técnica de ET AAS).

Descreve-se a seguir as condições instrumentais (especificações do equipamento de ET AAS ou F AAS) e analíticas utilizadas na determinação/quantificação de cada um dos micro e macroelementos considerados nesta pesquisa. Quatro tabelas foram elaboradas para simplificar a descrição: a primeira é referente aos elementos que foram quantificados por ET AAS (em todas as soluções), e as outras três referem-se aos elementos quantificados por F AAS (uma tabela para cada tipo de solução). Em todas as tabelas constam as especificações instrumentais (do equipamento de absorção atômica) e as condições analíticas. Dentro dessas últimas abrange-se a equação da reta de calibração externa (obtida, por meio de uma regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pelo software de controle do equipamento de absorção atômica) usada na quantificação do elemento em questão, o valor do coeficiente de correlação (R^2) da regressão linear, o intervalo de concentrações (do elemento de interesse) da curva de calibração externa, e o tipo de modificador químico de matriz utilizado na determinação.

Tabela 4. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (por ET AAS) nas soluções provenientes das digestões totais (tanto das amostras alimentares quanto do material de referência certificado) e do teste de bioacessibilidade *in vitro*

			Elementos					
Condições do equipamento (ET AAS)			Zn	Cu*			Fe	Mg
Lâmpada				DTAA	DTMR	TB		
Corrente (mA) →			15	30	30	30	30	6
Fenda (nm) →			0,7	0,7	0,7	0,7	0,2	0,7
Comprimento de onda (nm) →			213,9	324,8	324,8	324,8	248,3	202,6
Forno de Grafita*								
ETAPAS	Secagem	Temperatura (°C)	110	110	110	110	110	110
		Ramp Time (s)	1	1	1	1	1	1
		Hold Time (s)	30	30	30	30	30	30
		Fluxo de Argônio (ml min ⁻¹)	250	250	250	250	250	250
		Leitura**						
	Secagem	Temperatura (°C)	130	130	130	130	130	130
		Ramp Time (s)	15	15	15	15	15	15
		Hold Time (s)	30	30	30	30	30	30
		Fluxo de Argônio (ml min ⁻¹)	250	250	250	250	250	250
		Leitura**						
	Pirólise	Temperatura (°C)	700	1200	1200	1200	1400	800
		Ramp Time (s)	10	10	10	10	10	10
		Hold Time (s)	20	20	20	20	20	20
		Fluxo de Argônio (ml min ⁻¹)	250	250	250	250	250	250
		Leitura**						
	Atomização	Temperatura (°C)	1800	2000	2000	2100	2100	1900
		Ramp Time (s)	0	0	0	0	0	0
		Hold Time (s)	5	5	5	5	5	5
		Fluxo de Argônio (ml min ⁻¹)	0	0	0	0	0	0
		Leitura**	X	X	X	X	X	X
	Limpeza	Temperatura (°C)	2450	2450	2450	2450	2450	2450
		Ramp Time (s)	1	1	1	1	1	1
		Hold Time (s)	3	3	3	3	3	3
		Fluxo de Argônio (ml min ⁻¹)	250	250	250	250	250	250
		Leitura**						
Condições Analíticas								
Equação da reta (curva de calibração externa) →			y = 0,01868.x + 0,05745	y = 0,00452.x - 0,00182	y = 0,00432.x - 0,00599	y = 0,00343.x + 0,00970	y = 0,00488.x + 0,00588	y = 0,00260.x + 0,00336
R ² →			0,99878	0,99977	0,99823	0,99365	0,99664	0,99856
Intervalo de concentrações da curva (µg Kg ⁻¹) →			10 a 50	5 a 60	5 a 60	5 a 60	10 a 80	10 a 100
Modificador químico de matriz →			0,005 mg de Mg(NO ₃) ₂	0,005 mg de Pd + 0,003 mg de Mg(NO ₃) ₂	0,005 mg de Pd + 0,003 mg de Mg(NO ₃) ₂	0,005 mg de Pd + 0,003 mg de Mg(NO ₃) ₂	0,015 mg de Mg(NO ₃) ₂	Nenhum

Conforme descrito anteriormente no texto desta dissertação, Zn, Fe e Mg foram quantificados por ET AAS apenas nas soluções resultantes da digestão total (mineralização) das amostras alimentares. Assim, as especificações listadas dizem respeito à apenas essas soluções.

* O Cu foi o único elemento quantificado por ET AAS nos três tipos de soluções. Assim, indicam-se as especificações para cada tipo de solução (digestão total das amostras alimentares (DTAA), digestão total da amostra do material de referência certificado (DTMR), e teste de bioacessibilidade *in vitro* (TB)).

** Trata-se das características do programa de aquecimento do forno de grafita.

*** Diz respeito a etapa do programa de aquecimento do forno de grafita em que o equipamento faz a medida da absorbância; tal etapa é marcada com um "X" na parte pertinente da tabela.

As condições do equipamento (ET AAS) presentes na Tabela 4 são as condições ótimas para a determinação/quantificação de cada um dos elementos considerados (Zn, Cu, Fe e Mg) na matriz de HNO₃ (aq) (que é a matriz proveniente das digestões totais, conforme pode ser constatado nas seções 3.5 e 3.6), e na matriz resultante do teste de

bioacessibilidade *in vitro* (somente para o Cu). Para esclarecimento deve-se citar que no caso do Zn, do Cu (DTAA e DTMR), do Fe e do Mg, as condições do equipamento de ET AAS são as fornecidas pelo software de controle do mesmo (que é padronizado para uma matriz constituída de uma solução aquosa de HNO_3 , a mesma matriz das soluções resultantes das digestões totais). Já no caso do Cu (TB), as condições foram ajustadas (por meio de um prévio procedimento de otimização das temperaturas das etapas de pirólise e atomização) para a melhor determinação deste elemento na matriz resultante do teste de bioacessibilidade *in vitro*. Na quantificação de cada elemento, o modificador químico (descrito na Tabela 4) foi adicionado em todas as alíquotas analisadas pelo aparelho (o branco analítico para a construção da curva de calibração externa, as soluções padrões usadas na construção da curva, e as soluções das amostras).

As tabelas a seguir mostram as condições instrumentais e analíticas das quantificações dos elementos que foram realizadas por F AAS.

Tabela 5. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes das digestões totais das amostras alimentares) por F AAS

Condições do equipamento (F AAS)	Elementos		
	Ca	Na	K
Lâmpada			
Corrente (mA) →	10	15	20
Fenda (nm) →	0,7	0,2	0,7
Comprimento de onda (nm) →	422,7	589,0	404,4
Chama*			
Fluxo do combustível (L min^{-1}) →	2,2	2,0	2,0
Fluxo do oxidante (L min^{-1}) →	17	17	17
Comprimento do queimador (cm) →	10	10	10
Condições Analíticas			
Equação da reta (curva de calibração externa) →	$y = 0,03856.x + 0,00165$	$y = 0,17870.x + 0,01917$	$y = 0,00024.x - 0,00051$
R^2 →	0,99862	0,99827	0,99136
Intervalo de concentrações da curva ($\mu\text{g g}^{-1}$) →	0,5 a 5	0,5 a 5	10 a 50
Modificador químico →	Lantânio**	Lantânio**	Lantânio**

* Para todos os elementos quantificados descritos na tabela, a composição da chama é: ar (oxidante) – Acetileno (combustível).

** Trata-se de uma solução de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 5 % m/v, usada conforme explicado posteriormente no texto da dissertação.

Tabela 6. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes da digestão total da amostra do material de referência certificado) por F AAS

Condições do equipamento (F AAS)	Elementos					
	Ca	Na	K	Mg	Fe	Zn
Lâmpada						
Corrente (mA) →	10	15	20	20	15	15
Fenda (nm) →	0,7	0,2	0,7	0,7	0,2	0,7
Comprimento de onda (nm) →	422,7	589,0	404,4	202,6	248,3	213,9
Chama*						
Fluxo do combustível (L min ⁻¹) →	2,2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Fluxo do oxidante (L min ⁻¹) →	17	17	17	17	17	17
Comprimento do queimador (cm) →	10	10	10	10	10	10
Condições Analíticas						
Equação da reta (curva de calibração externa) →	y = 0,02982.x + 0,00068	y = 0,37349.x - 0,11462	y = 0,00032.x - 0,00009	y = 0,00664.x + 0,0005	y = 0,01080.x + 0,00212	y = 0,12754.x + 0,00301
R ² →	0,99975	0,99752	0,99572	0,99350	0,99284	0,99928
Intervalo de concentrações da curva (µg g ⁻¹) →	0,5 a 5	0,1 a 6	10 a 50	0,5 a 10	0,1 a 5	0,050 a 3
Modificador químico →	Lantânio**	Lantânio**	Lantânio**	Lantânio**	CaCl ₂ ***	Nenhum

* Para todos os elementos quantificados descritos na tabela, a composição da chama é: ar (oxidante) – Acetileno (combustível).

** Trata-se de uma solução aquosa de La(NO₃)₃ 5 % m/v, usada conforme explicado posteriormente no texto da dissertação.

*** Trata-se de uma solução aquosa de CaCl₂, usada conforme explicado posteriormente no texto da dissertação.

Tabela 7. Condições instrumentais e analíticas usadas na quantificação dos elementos químicos (nas soluções provenientes do teste de bioacessibilidade *in vitro*) por F AAS

Condições do equipamento (F AAS)	Elementos					
	Ca	Na	K	Mg	Fe	Zn
Lâmpada						
Corrente (mA) →	10	15	20	20	15	15
Fenda (nm) →	0,7	0,2	0,7	0,7	0,2	0,7
Comprimento de onda (nm) →	422,7	589,0	404,4	202,6	248,3	213,9
Chama*						
Fluxo do combustível (L min ⁻¹) →	2,2	2,0	2,0	2	2,0	2,0
Fluxo do oxidante (L min ⁻¹) →	17	17	17	17	17	17
Comprimento do queimador (cm) →	10	10	10	10	10	10
Condições Analíticas						
Equação da reta (curva de calibração externa) →	y = 0,02287.x - 0,00113	y = 0,14423.x + 0,00407	y = 0,00018.x - 0,00010	y = 0,01331.x - 0,00535	y = 0,02033.x + 0,00029	y = 0,11246.x + 0,00182
R ² →	0,99952	0,99936	0,99493	0,99633	0,999676	0,99975
Intervalo de concentrações da curva (µg g ⁻¹) →	0,1 a 5	0,1 a 6	4 a 100	0,5 a 10	0,1 a 5	0,050 a 3
Modificador químico →	Lantânio**	Lantânio**	Lantânio**	Lantânio**	CaCl ₂ ***	Nenhum

* Para todos os elementos quantificados descritos na tabela, a composição da chama é: ar (oxidante) – Acetileno (combustível).

** Trata-se de uma solução aquosa de La(NO₃)₃ 5 % m/v, usada conforme explicado posteriormente no texto da dissertação.

*** Trata-se de uma solução aquosa de CaCl₂, usada conforme explicado posteriormente no texto da dissertação.

Em todas as quantificações realizadas por F AAS (cujas especificações estão resumidas nas Tabelas 5, 6 e 7), os fluxos usados do oxidante e do combustível são os valores ótimos fornecidos pelo software de controle do equipamento para a determinação dos elementos em questão.

Em todas as soluções, para a determinação de Ca, Na, K e Mg, usou-se como modificador químico o elemento La (lantânio). Para isso, no branco analítico, nas soluções padrões para a construção da curva de calibração externa, e nas soluções amostras, adicionou-se um volume adequado da solução aquosa de Nitrato de Lantânio (5% m/v) de tal modo que em todas as soluções existisse uma concentração de lantânio (La) de 0,5 % m/v. Esta última é a concentração fornecida pelo software de controle do equipamento para as determinações de Ca, Na, K e Mg por F AAS.

Nas determinações de Fe por F AAS (Tabelas 6 e 7) usou-se como modificador químico uma solução aquosa de CaCl_2 (Merck, $0,45 \text{ mol L}^{-1}$), adicionando o volume adequado desta solução a todas as soluções usadas na quantificação de Fe (o branco analítico, as soluções padrões para a construção da curva de calibração externa, e as soluções amostras), de tal modo que a concentração resultante de CaCl_2 fosse de 0,2 % m/m, conforme recomendado pelo software de controle do equipamento para as quantificações de Fe por F AAS.

3.8.1. Parâmetros analíticos de mérito das técnicas de F AAS e ET AAS

Nesta seção constam quatro (4) tabelas que mostram os parâmetros de mérito referentes às determinações dos elementos químicos nas duas diferentes matrizes das amostras analisadas na pesquisa desta dissertação de mestrado. Segue agora uma breve descrição destes parâmetros de mérito.

1) *RSD % (Desvio padrão relativo percentual)*: trata-se do desvio padrão relativo percentual referente a 5 medidas de absorbância de uma solução padrão do elemento de interesse em uma determinada matriz. A expressão para o cálculo deste parâmetro é:

$$\text{RSD \%} = \frac{\text{SD}}{\text{M}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde “M” é a média e “SD” é o desvio padrão referente às 5 medidas de absorbância realizadas com a solução padrão do elemento de interesse.

2) Concentração (c_0) ou massa característica (m_0): é a concentração ou massa do analito (elemento químico) que produz uma absorbância de 0,0044 (isto é, 1 % de absorção ou 99 % de transmissão). A expressão para o cálculo de c_0 ou m_0 é:

$$c_0 \text{ ou } m_0 = \frac{0,0044}{a} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde “a” é a sensibilidade ou a inclinação da curva analítica usada na determinação.

3) LOD (Limite de detecção): é a menor concentração ou massa do analito (elemento químico) na amostra que produz um sinal distinguível do sinal do branco dentro de certo critério estatístico. O LOD é definido pela seguinte expressão:

$$\text{LOD} = \frac{3 s_b}{a} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde s_b é o desvio padrão de 10 medidas da absorbância do branco analítico, e “a” é a inclinação da curva analítica usada na determinação.

4) LOQ (Limite de quantificação): é a menor concentração ou massa do analito que pode ser determinada quantitativamente com uma certeza estatística de 95 %. O LOQ é definido pela seguinte expressão:

$$\text{LOQ} = \frac{10 s_b}{a} \quad \text{(Equação 5)}$$

Nas tabelas a seguir constam os parâmetros de mérito referentes a todos os elementos que foram, nesta pesquisa de mestrado, quantificados nas soluções provenientes da digestão total e/ou do teste de bioacessibilidade *in vitro*, usando a técnica de F AAS ou ET AAS.

Tabela 8. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por F AAS e ET AAS na matriz resultante do procedimento de digestão ácida das amostras (tanto das amostras alimentares, quanto da amostra do Material de Referência Certificado)

F AAS				
Elementos	RSD (%)	Concentração característica (c _o), µg/g	LOD (Limite de detecção), µg/g	LOQ (Limite de quantificação), µg/g
Na	5,21	0,0076	0,049	0,16
K	2,28	0,010	1,28	4,26
Ca	4,30	0,025	0,13	0,43
Mg	8,72	0,033	0,086	0,29
Fe	0,76	0,0068	0,071	0,24
Zn	0,39	0,0056	0,031	0,10

ET AAS				
Elementos	RSD (%)	Concentração característica (c _o), µg/Kg	LOD (Limite de detecção), µg/Kg	LOQ (Limite de quantificação), µg/Kg
Mg	4,48	2,06	3,24	10,80
Fe	2,55	0,91	1,82	6,06
Zn	1,37	0,24	2,83	9,43
Cu	4,66	0,97	0,76	2,53

Tabela 9. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por F AAS e ET AAS na matriz resultante do teste de bioacessibilidade *in vitro*

F AAS				
Elementos	RSD (%)	Concentração característica (c _o), µg/g	LOD (Limite de detecção), µg/g	LOQ (Limite de quantificação), µg/g
Na	0,19	0,0081	0,054	0,18
K	1,46	0,022	1,45	4,82
Ca	0,31	0,020	0,10	0,33
Mg	3,72	0,047	0,097	0,32
Fe	4,54	0,0087	0,19	0,63
Zn	2,88	0,011	0,077	0,26

ET AAS				
Elementos	RSD (%)	Concentração característica (c _o), µg/Kg	LOD (Limite de detecção), µg/Kg	LOQ (Limite de quantificação), µg/Kg
Cu	2,53	1,28	1,05	3,5

3.9. Determinação do conteúdo de Ácido Fítico

O conteúdo de ácido fóico foi determinado segundo o método descrito por Haug e Lantzsch [91]. Inicialmente, massas conhecidas (≈ 1 g) de cada amostra alimentar seca (para cada alimento usou-se três massas, pois o experimento foi realizado em triplicata) foram transferidas para o interior de tubos de polipropileno. Para a extração do ácido fóico, o volume de 2 mL da solução de HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionado aos tubos contendo as amostras dos alimentos. Em seguida, os tubos foram agitados (150 rotações por minuto) na mesa agitadora durante 30 minutos à temperatura ambiente, e, logo após, centrifugados a $15000 \times g$ durante 15 minutos. Os sobrenadantes (0,5 mL) foram misturados com 1 mL da solução ácida de Fe^{+3} em outros tubos e, em seguida, as misturas foram aquecidas por 30 minutos a 100°C usando um banho de água (nesta etapa, todo ácido fóico extraído (e presente nos 0,5 mL do sobrenadante supracitado) é precipitado na forma do complexo $[\text{Fe}_2(\text{Fitato})]$). Após resfriamento a temperatura ambiente, as misturas foram centrifugadas a $3000 \times g$ durante 15 minutos. Os sobrenadantes das misturas (0,5 mL, contendo Fe^{+3} não precipitado, isto é, que estava em excesso) foram misturados com 0,75 mL da solução de biperidina e ácido tioglicólico. Logo após realizou-se a leitura da absorbância em 519 nm, e os valores foram transformados em concentração de ácido fóico pelo uso de uma curva de calibração externa construída a partir de soluções de diferentes concentrações de fitato de sódio. Essas soluções padrões de fitato de sódio foram submetidas ao mesmo procedimento experimental anteriormente descrito. A concentração foi expressa em g de ácido fóico/100 g de amostra alimentar seca.

3.10. Determinação da composição centesimal

Descreve-se a seguir as metodologias empregadas para a determinação de cada componente da composição centesimal dos alimentos analisados. Os procedimentos descritos foram realizados em triplicata para cada amostra alimentar. Como esta análise tinha como objetivo caracterizar os alimentos analisados, foram usadas as amostras originais dos mesmos para as análises, isto é, aquelas que não foram submetidas a nenhum tratamento específico (por exemplo, o cozimento que foi realizado com os cereais). Assim, para as análises, foram usadas as polpas cruas das frutas e as amostras cruas dos cereais e das hortaliças.

3.10.1. Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz [93]. A amostra alimentar (aproximadamente 1 g) foi transferida para uma placa de Petri (previamente seca e com sua massa registrada) e, em seguida, levada para a estufa de secagem a 105 °C, permanecendo ali durante 3 horas. Ao fim deste período, após o resfriamento em frasco dessecador contendo partículas de sílica como agente secante, a massa da amostra foi determinada e este procedimento foi repetido até a obtenção de uma massa constante. A porcentagem de umidade foi então calculada usando a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Umidade} = \frac{M_{\text{água}}(\text{g})}{M_{\text{amostra úmida}}(\text{g})} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde $M_{\text{água}}$ é a diferença entre a massa do sistema “placa de Petri/amostra alimentar” antes e depois do procedimento de secagem, e $M_{\text{amostra úmida}}$ é a massa inicial de amostra transferida para a placa de Petri.

3.10.2. Determinação do conteúdo de lipídios

Na determinação do conteúdo de lipídios foi utilizado o Método Intermitente Soxhlet [112]. A massa da amostra alimentar (aproximadamente 3 g) foi medida em cartucho extrator. O balão do extrator (previamente limpo e seco a 105 °C durante 1 hora) teve sua massa mensurada após o resfriamento. O cartucho com a amostra foi transferido para o aparelho Soxhlet, conectando-o ao balão e ao condensador (refrigerado à água). Ao balão adicionou-se éter etílico em uma quantidade adequada para a extração e, em seguida, o aquecimento (providenciado por uma manta aquecedora) foi ligado. Procedeu-se a extração continuamente por 4 horas, ao fim das quais o aquecimento foi desligado e o balão (contendo os lipídios extraídos dissolvidos no éter) retirado do extrator. O éter presente no balão foi recuperado usando um sistema existente no próprio extrator Soxhlet. O balão contendo o resíduo resultante desta recuperação (os lipídios extraídos) foi levado a uma estufa de secagem (105 °C), permanecendo ali durante 5 horas. Após isso, o balão foi resfriado em dessecador e sua massa foi medida. Repetiu-se tal procedimento de secagem até a obtenção de uma massa constante do sistema “balão/lipídios”. Por subtração da massa do balão seco e vazio da massa do balão contendo os lipídios, obteve-se a massa de lipídios extraídos e

presentes na amostra do alimento. A porcentagem de lipídios foi determinada pela seguinte expressão matemática:

$$\% \text{ de Lipídios} = \frac{M_{\text{lipídios}} \text{ (g)}}{M_{\text{amostra}} \text{ (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $M_{\text{lipídios}}$ é a massa de lipídios extraída, e M_{amostra} é a massa da amostra de alimento usada na extração.

3.10.3 Determinação do conteúdo de proteínas

Na determinação do conteúdo de proteínas das amostras alimentares foi usado o método proposto por Kjeldahl [93]. Este método tem sofrido numerosas modificações e adaptações (dependendo do tipo de amostra analisada), porém sempre se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. Neste método, inicialmente a matéria orgânica da amostra alimentar é decomposta (digestão) e o nitrogênio nela presente (contido praticamente em sua totalidade nas proteínas que compõe o alimento) é convertido em amônia (NH_3), sendo esta destilada (destilação) para uma solução ácida (por exemplo, de HCl ou H_2SO_4) de concentração conhecida. A amônia destilada reage com certa quantidade do ácido da solução, e o restante do ácido que não reagiu é titulado com uma solução de hidróxido de sódio (o titulante) de concentração conhecida. Assim, por meio deste procedimento de titulação reversa pode-se determinar a quantidade de amônia (que é convertida em quantidade de nitrogênio) liberada no processo inicial de digestão da amostra alimentar. Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16 % (m/m), introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar a massa de nitrogênio da amostra (em g) em massa de proteínas. Em alguns casos, emprega-se um fator empírico diferente de 6,25, conforme recomendado na referência 93.

Uma massa de aproximadamente 1 g do alimento em análise (reduzida a uma consistência de pó pelo uso de um processador de alimentos) foi transferida para o balão do sistema Kjeldahl. Ao recipiente foram adicionados 25 ml de ácido sulfúrico concentrado e cerca de 6 g da mistura catalítica. Em seguida, levou-se o sistema para o aquecimento em chapa elétrica (na capela), até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos); depois de atingido esta condição, manteve-se o aquecimento na chapa elétrica por mais uma (1) hora. Decorrido este tempo, o aquecimento foi desligado e a solução do balão foi deixada resfriar a

temperatura ambiente. Após este resfriamento, deu-se início ao processo de destilação. Adicionou-se 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco (Zn) em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de proteínas que eventualmente não foram clivadas durante o processo de digestão) ao balão do sistema Kjeldahl, que foi acoplado ao conjunto de destilação do sistema. A extremidade afilada de recolhimento do destilado foi mergulhada em 25 mL de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹, contendo 3 gotas do indicador vermelho de metila. Após feito estes ajustes, ao balão contendo a amostra digerida foi adicionado (por meio de um funil com torneira) solução de hidróxido de sódio 30 % (m/m) até garantir um ligeiro excesso de base. Em seguida, aqueceu-se a solução do balão até a ebulição, recolhendo-se a amônia (NH₃) destilada na solução de H₂SO₄, que foi, assim, parcialmente neutralizada. O excesso do ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹ foi titulado com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, usando vermelho de metila como indicador. A porcentagem de proteínas na amostra alimentar é calculada por meio da seguinte expressão matemática:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{V \times 0,14 \times f}{M_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde “V” é a diferença entre o volume (em mL) da solução de H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹ e o volume da solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) gasto na titulação, M_{amostra} é a massa (em gramas) da amostra alimentar usada na análise, e “f” é o fator empírico de conversão da massa de nitrogênio da amostra (em g) em massa de proteínas.

3.10.4 Determinação do conteúdo de cinzas

Na determinação do conteúdo de cinzas usou-se o método descrito por Gomes e colaboradores [112]. A massa de um cadinho de porcelana (previamente aquecido em mufla a 550 °C, e resfriado em frasco dessecador) foi medida em uma balança analítica. Em seguida, aproximadamente 3 g da amostra alimentar em análise foram transferidas para o cadinho, e a massa do sistema cadinho-amostra foi medida. A amostra alimentar no cadinho foi carbonizada em temperatura baixa (200 °C) usando uma chapa aquecedora elétrica e, em seguida, incinerada em mufla a 550 °C até que as cinzas se tornassem brancas. Posteriormente, o cadinho contendo as cinzas foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, e a massa do sistema foi medida. A porcentagem de cinzas no alimento é fornecida, então, pela seguinte expressão matemática:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{M_{\text{cinzas}}}{M_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde M_{cinzas} é a massa das cinzas (obtida pela diferença entre a massa do sistema cadinho-amostra antes e depois do processo de carbonização e incineração) e M_{amostra} é a massa da amostra alimentar usada na análise.

3.10.5 Determinação do conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença, após a determinação da porcentagem de cada um dos constituintes (anteriormente descritos) nos alimentos analisados. Para tal, somaram-se as porcentagens de umidade, lipídios, proteínas e cinzas, realizando, em seguida, a seguinte operação matemática:

$$\% \text{ de carboidratos} = 100 \% - \sum \% \text{ de umidade, lipídios, proteínas e cinzas} \quad (\text{Equação 10})$$

3.11. Tratamentos estatísticos e matemáticos

Nesta seção descrevem-se os tratamentos estatísticos e matemáticos usados ao longo da seção de Resultados e Discussão (seção 4) desta dissertação.

3.11.1 Intervalo de confiança

A partir de um número limitado de medidas, não se pode encontrar a média real de uma população, μ , ou o desvio padrão verdadeiro, σ . O que se pode determinar são $\bar{x}$ e s , isto é, a média e o desvio padrão das amostras. O intervalo de confiança é uma expressão condicionante de que a média real, μ , provavelmente tem uma posição dentro de uma certa distância da média medida, $\bar{x}$. A média real (μ) seria o valor encontrado da média se o experimento que gera o valor analítico de interesse fosse repetido infinitas vezes. O intervalo de confiança de μ é dado por:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde s é o desvio padrão medido, n é o número de medidas (número de experimentos), e o t é o valor do teste t de Student obtido na tabela abaixo.

Tabela 10. Valores do teste t de Student *

Graus de liberdade	Nível de confiança (%)						
	50	90	95	98	99	99,5	99,9
1	1,000	6,314	12,706	31,821	63,657	127,32	636,619
2	0,816	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	31,598
3	0,765	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	12,924
4	0,741	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	8,610
5	0,727	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	6,869
6	0,718	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,959
7	0,711	1,895	2,365	2,998	3,500	4,029	5,408
8	0,706	1,860	2,306	2,896	3,355	3,832	5,041
9	0,703	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,781
10	0,700	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,587
15	0,691	1,753	2,131	2,602	2,947	3,252	4,073
20	0,687	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,850
25	0,684	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,725
30	0,683	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,646
40	0,681	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,551
60	0,679	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,460
120	0,677	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,373

* Os dados desta tabela foram extraídos da referência **104**.

O desvio padrão s é dado por:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde x_i representa cada um dos valores do conjunto de medidas (por exemplo, para um experimento feito em triplicata, têm-se três valores de x_i).

A média $\bar{x}$ é dada por:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad (\text{Equação 13})$$

O significado do *nível de confiança* presente na Tabela 10 é o seguinte: se escolhermos um nível de confiança de 95 % e usarmos o valor de t adequado aos graus de liberdade ($n-1$) da análise, teremos 95 % de certeza (de confiança) de que a média

real (μ) estará compreendida dentro do intervalo dado pela equação 11. Alternativamente pode-se dizer que para o nível de confiança de 95 %, ao repetirmos o experimento de obtenção do resultado analítico (feito, por exemplo, em triplicata e, dessa forma, obtendo-se uma média $\bar{x}$ e um desvio padrão s para a triplicata de medidas) infinitas vezes, em 95 % das vezes o intervalo dado por $\bar{x} \pm s$ abrangerá a média real μ .

3.11.2 Teste t

O teste t é usado para comparar um grupo de medidas com outro, a fim de decidir se eles são ou não “diferentes”, isto é, se existe ou não uma diferença significativa entre eles. Um caso comum onde se aplica o teste t (e é o caso que será mencionado e usado posteriormente no texto desta dissertação) é na comparação de um resultado medido com um valor “conhecido”, por exemplo, o valor da quantidade de certo elemento químico presente em um material de referência certificado ou material padrão de referência (sigla inglesa, SRM). Nesta circunstância o teste t é aplicado do seguinte modo. Inicialmente calcula-se o valor de $t_{\text{calculado}}$ dado pela seguinte expressão:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x} - \text{valor conhecido}|}{s} \times \sqrt{n} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde “valor conhecido” é o valor certificado (no SRM) da quantidade do analito (é o valor absoluto, sem a correspondente incerteza), $\bar{x}$ é a média da quantidade do analito obtida experimentalmente, s é o desvio padrão das medidas, e n é o número de experimentos (número de medidas da mesma quantidade). A Equação 14 é escrita com valores absolutos (módulo) para que $t_{\text{calculado}}$ seja sempre positivo. Após obter $t_{\text{calculado}}$, compara-se o mesmo com outro valor, denominado t_{tabelado} , este último obtido na tabela dos valores do teste t de Student (Tabela 10). Se o $t_{\text{calculado}}$ é maior que o t_{tabelado} no nível de confiança escolhido (por exemplo, 95 % de confiança), os dois resultados (o valor certificado e o valor medido experimentalmente) são considerados diferentes, isto é, estatisticamente eles são significativamente diferentes. Caso contrário ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$), os dois valores serão considerados significativamente equivalentes.

O teste t descrito é muito útil para se comprovar que uma metodologia analítica é adequada a certo propósito, através de um procedimento de validação usando um material de referência certificado. Este teste foi usado na seção 4.2 desta dissertação de mestrado.

3.11.3 Propagação de incertezas

Frequentemente, na manipulação de dados analíticos, depara-se com o problema de somar, subtrair, multiplicar e dividir números expressos com uma incerteza (por exemplo, valores expressos como uma média e desvio padrão, $\bar{x} \pm s$). No escopo da pesquisa de mestrado descrita nesta dissertação, a divisão de valores com as características supracitadas foi realizada para se determinar a porcentagem de bioacessibilidade dos elementos químicos em estudo nos alimentos analisados. Para se propagar a incerteza (desvio padrão) nesta divisão procedeu-se do seguinte modo. Consideremos dois resultados analíticos representados por $\bar{x}_1 \pm s_1$ e $\bar{x}_2 \pm s_2$, onde s_1 e s_2 são os desvios padrões. Para propagar a incerteza na divisão

$$\frac{\bar{x}_1 \pm s_1}{\bar{x}_2 \pm s_2},$$

inicialmente calcula-se as incertezas relativas percentuais:

$$\% s_1 = \frac{s_1}{\bar{x}_1} \times 100$$

(Equações 15)

$$\% s_2 = \frac{s_2}{\bar{x}_2} \times 100$$

A incerteza relativa percentual no resultado da divisão ($\% s_3$) é fornecida pela seguinte expressão:

$$\% s_3 = \sqrt{(\% s_1)^2 + (\% s_2)^2} \quad \text{(Equação 16)}$$

Com o valor de $\% s_3$ pode-se determinar o valor absoluto da incerteza no quociente (resultado da divisão) do seguinte modo:

$$s_3 = \frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2} \times \frac{\% s_3}{100} \quad \text{(Equação 17)}$$

Assim, o resultado obtido na divisão dos dois resultados analíticos citados inicialmente é:

$$\frac{\bar{x}_1 \pm s_1}{\bar{x}_2 \pm s_2} = \frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2} \pm s_3$$

4. Resultados e discussão

4.1. Composição centesimal

A tabela a seguir mostra o resultado da determinação da composição centesimal dos alimentos analisados na pesquisa de mestrado. Conforme dito na seção 3.10, os experimentos de determinação da composição centesimal foram realizados em triplicata (para cada alimento e constituinte da composição centesimal). Assim, os valores presentes na Tabela 11 são as médias obtidas na triplicata de experimentos.

Tabela 11. Composição centesimal dos alimentos analisados, considerando apenas a parte comestível (valores em porcentagem)

Alimentos*	Umidade	Lipídios	Proteínas	Cinzas	Carboidratos
Arroz	10,6	0,3	7,5	0,4	81,2
Milho	79,6	0,7	6,1	0,9	12,7
Alface	95,0	0,5	1,5	0,8	2,2
Banana	74,0	0,2	1,2	0,9	23,7
Maçã	84,3	0,1	0,4	0,2	15,0
Amaranto	9,8	6,8	13,2	2,8	67,4
Quinoa	8,4	5,6	14,5	2,0	69,5
Alfavaca	91,3	0,6	3,0	1,5	3,6
Cupuaçu	86,0	1,2	1,0	1,1	10,7
Graviola	83,2	0,1	1,1	0,5	15,1

* Trata-se das amostras originais dos alimentos, que não foram submetidas a nenhum tratamento em específico além da lavagem em água Milli-Q.

Algumas constatações podem ser feitas observando os dados da Tabela 11. Pode-se ver que os cereais analisados são, de modo geral, os alimentos (dentre os considerados na pesquisa de mestrado) com os maiores teores de carboidratos, devido, sobretudo, ao alto conteúdo de amido normalmente presente nos cereais. As composições centesimais do amaranto e da quinoa chamam a atenção, pois, além de serem muito parecidas, estes alimentos possuem as maiores quantidades de lipídios, proteínas e cinzas quando comparados com os outros alimentos analisados. A esse respeito, é importante ressaltar as propriedades destes dois pseudocereais.

O amaranto chama a atenção pelo seu conteúdo relativamente alto de proteínas, lipídios e minerais (as cinzas), especialmente quando o comparamos com outros cereais mais populares na sociedade, como o arroz e o milho. As proteínas presentes no amaranto são consideradas de alto valor biológico (isto é, elas são bem aproveitadas

pelo organismo humano), pois as mesmas possuem um alto teor de lisina e outros aminoácidos essenciais, como os aminoácidos sulfurados (por exemplo, a metionina). A lisina e os aminoácidos sulfurados representam o que há de mais limitante em outros cereais [113 – 115]. O amaranto também se destaca por apresentar um valor energético maior do que outros grãos, e esta característica pode ser atribuída ao maior conteúdo de lipídios presentes no amaranto. Apesar deste maior teor de lipídios, dentro destes existe uma baixa porcentagem de gorduras saturadas, o que torna o amaranto um alimento mais saudável. Todas essas características fazem do amaranto um alimento atrativo para a nutrição humana, e destacam a importância da realização de pesquisas científicas envolvendo este pseudocereal, visando um melhor entendimento de suas propriedades nutricionais. Assim como o amaranto, a quinoa também é fonte de proteínas de alto valor biológico, ofertando todos os aminoácidos essenciais (isto é, aqueles que não são sintetizados pelo organismo e devem ser obtidos através da alimentação), principalmente a lisina, que possui funções importantes no desenvolvimento celular e crescimento do organismo humano. Os grãos de quinoa (assim como os de amaranto) não contêm glúten (o glúten é uma mistura heterogênea de proteínas, principalmente as gliadinas e as gluteninas, com solubilidade limitada em água [92]), e, portanto, são indicados para a alimentação de indivíduos alérgicos a esta substância. Além disso, a quinoa apresenta baixos teores de gorduras saturadas, sendo uma importante fonte de fibras e vitaminas quando comparada com outros tipos de cereais mais populares [116]. Por todas as características nutricionais supracitadas, a quinoa e o amaranto são considerados pela FAO (Food and Agriculture Organization) dois dos melhores alimentos de origem vegetal.

4.2. Validação da metodologia de digestão total (mineralização) das amostras alimentares

Na Tabela 12 constam os resultados da validação da metodologia analítica de digestão total das amostras (conforme descrito na seção 3.6), mostrando os valores de referência das quantidades dos elementos presentes no SRM, e as quantidades obtidas por meio do procedimento experimental de digestão total (mineralização, conforme seção 3.5); os valores são apresentados como intervalos de confiança para um nível de confiança de 95 %, levando em conta que o experimento foi realizado em triplicata. Eles são apresentados deste modo, pois os valores de referência também são certificados como um intervalo de confiança no nível de 95 % de confiança.

Tabela 12. Comparação entre os valores experimentais e certificados das quantidades totais (mg do elemento/100 g de amostra seca) dos elementos no Material de Referência Certificado (NIST – SRM 1515 – Apple Leaves); nível de confiança de 95%

Elementos	NIST - SRM - 1515: Apple Leaves (mg do elemento/100 g de amostra seca)	
	Valor medido*	Valor certificado*
Fe	$8,0 \pm 3,0$	$8,3 \pm 0,5$
Cu	$0,516 \pm 0,022$	$0,524 \pm 0,024$
Zn	$1,18 \pm 0,27$	$1,25 \pm 0,03$
Na	$2,75 \pm 1,07$	$2,44 \pm 0,12$
K	$1547,8 \pm 143,8$	$1610,0 \pm 20,0$
Ca	$1545,0 \pm 63,4$	$1526,0 \pm 15,0$
Mg	$275,0 \pm 9,9$	$271,0 \pm 8,0$

* Intervalo de confiança de 95 %.

Conforme pode ser constatado na Tabela 12, os valores certificados e experimentais das quantidades dos elementos presentes no SRM estão sobrepostos dentro do limite estabelecido pelas correspondentes incertezas. Para verificar que os valores medidos e os certificados para cada um dos elementos são significativamente equivalentes, fez-se o teste t (seção 3.11.2) usando-se um nível de confiança de 95 %. Uma vez que o experimento de digestão total (mineralização) do SRM foi realizado em triplicata, tem-se 2 graus de liberdade. Pela Tabela 10 (seção 3.11.1) vê-se que para essas condições $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. A tabela a seguir mostra os valores de $t_{\text{calculado}}$ para cada um dos elementos.

Tabela 13. Valores de $t_{\text{calculado}}$ para o teste t

Elementos	$t_{\text{calculado}}$
Fe	0,17
Cu	0,63
Zn	0,45
Na	0,50
K	0,75
Ca	0,52
Mg	0,70

Uma vez que para todos os elementos $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, os dois valores comparados são significativamente equivalentes, e isto demonstra a exatidão do método empregado para a digestão total (mineralização) das amostras alimentares, dando credibilidade aos resultados.

4.3. Quantidades totais dos micro e macronutrientes presentes nos alimentos

As quantidades totais dos micro e macronutrientes presentes nos alimentos analisados foram determinadas por meio da digestão total das amostras (conforme descrito na seção 3.5) e posterior análise das soluções resultantes das digestões por ET AAS (Mg, Fe, Cu, Zn) ou F AAS (Ca, Na e K) (conforme descrito na seção 3.8).

A tabela a seguir mostra as quantidades totais dos micro e macronutrientes determinados em todos os alimentos analisados. Para facilitar as comparações, dividiu-se os alimentos nas duas classes apresentadas na Tabela 2. Uma vez que os experimentos de digestão (mineralização) foram realizados em triplicata, os valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata de medidas.

Tabela 14. Quantidades totais dos micro e macronutrientes determinados nos alimentos analisados

Alimentos	Elementos (mg do elemento/100 g de amostra alimentar seca)						
	Zn	Cu	Fe	Mg	Ca	Na	K
<i>Mais conhecidos</i>							
Banana	0,18 ± 0,02	0,48 ± 0,05	1,06 ± 0,06	30,1 ± 2,6	14,6 ± 1,1	1,53 ± 0,17	750 ± 19
Maçã	0,30 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,79 ± 0,03	6,76 ± 0,73	18,4 ± 1,7	3,45 ± 0,13	221 ± 4
Alface	0,08 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,70 ± 0,04	13,8 ± 1,2	368 ± 7	32,4 ± 2,6	2037 ± 43
Arroz (cru)	0,57 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,85 ± 0,03	23,5 ± 1,2	2,94 ± 0,14	3,26 ± 0,20	112 ± 1
Arroz (cozido)	0,31 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,34 ± 0,03	7,08 ± 0,42	2,64 ± 0,21	3,31 ± 0,34	71,9 ± 3,9
Milho (cru)	0,43 ± 0,06	0,41 ± 0,02	1,22 ± 0,04	56,4 ± 0,4	5,30 ± 0,29	2,87 ± 0,53	706 ± 6
Milho (cozido)	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,55 ± 0,12	11,1 ± 0,5	4,95 ± 0,22	2,65 ± 0,25	550 ± 4
<i>Menos conhecidos</i>							
Cupuaçu	0,12 ± 0,01	0,74 ± 0,06	1,19 ± 0,06	18,4 ± 4,2	30,4 ± 0,5	4,26 ± 0,73	661 ± 4
Graviola	0,08 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,02	22,9 ± 1,5	63,9 ± 2,1	26,9 ± 1,4	2019 ± 41
Alfavaca	0,13 ± 0,01	0,72 ± 0,01	1,23 ± 0,04	62,7 ± 0,8	1866 ± 15	20,5 ± 0,2	1062 ± 4
Amaranto (cru)	1,16 ± 0,07	0,61 ± 0,01	15,8 ± 0,2	260 ± 10	172 ± 1	3,26 ± 0,14	891 ± 16
Amaranto (cozido)	0,45 ± 0,02	0,12 ± 0,03	5,61 ± 0,50	175 ± 8	110 ± 2	2,84 ± 0,21	650 ± 13
Quinoa (crua)	3,36 ± 0,39	0,55 ± 0,02	5,23 ± 0,69	202 ± 12	24,0 ± 0,5	8,07 ± 0,81	629 ± 10
Quinoa (cozida)	1,60 ± 0,20	0,28 ± 0,08	2,26 ± 0,42	151 ± 9	19,0 ± 0,9	7,18 ± 0,54	580 ± 15

4.4. Quantidades bioacessíveis dos micro e macronutrientes presentes nos alimentos

As quantidades bioacessíveis dos micro e macronutrientes foram determinadas usando o teste de bioacessibilidade *in vitro* descrito na seção 3.7. A tabela a seguir mostra os resultados obtidos. Como os experimentos foram realizados em triplicata, os

valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata de medidas. Os valores em negrito e entre parênteses na tabela são as bioacessibilidades calculadas usando a seguinte expressão matemática:

$$\% B = \frac{[TB]}{[T]} \times 100 \quad \textbf{(Equação 18)}$$

Onde [TB] é a concentração do elemento obtida pelo teste de bioacessibilidade *in vitro*, e [T] é a concentração total do elemento no alimento em questão, obtida pela digestão total (mineralização). Na tabela, os valores das porcentagens de bioacessibilidade são mostrados como um valor absoluto acompanhado da correspondente incerteza. Tal incerteza foi obtida através do procedimento de *propagação de incertezas* (desvios padrões) descrito na seção 3.11.3.

Tabela 15. Concentrações bioacessíveis dos micro e macronutrientes obtidas pelo método da digestão gastrointestinal (teste de bioacessibilidade *in vitro*) dos alimentos analisados

Alimentos	Elementos (mg do elemento/100 g de amostra alimentar seca)						
	Zn	Cu	Fe	Mg	Ca	Na	K
<i>Mais conhecidos</i>							
Banana	0,19 ± 0,01 (106 ± 13)	0,32 ± 0,03 (66,7 ± 9,3)	0,58 ± 0,06 (54,7 ± 6,4)	26,8 ± 3,7 (89,0 ± 14,5)	15,3 ± 2,1 (105 ± 16)	0,98 ± 0,49 (64,0 ± 32,8)	722 ± 16 (96,3 ± 3,2)
Maçã	0,14 ± 0,01 (46,7 ± 3,7)	0,13 ± 0,01 (68,4 ± 8,9)	0,64 ± 0,05 (81,0 ± 7,0)	6,45 ± 0,63 (95,4 ± 13,9)	17,8 ± 0,9 (96,7 ± 10,2)	0,94 ± 0,49 (27,2 ± 14,2)	204 ± 6 (92,3 ± 3,2)
Alface	0,01 ± 0,00 (12,5 ± 3,1)	0,32 ± 0,02 (60,4 ± 5,9)	0,68 ± 0,03 (97,0 ± 7,0)	12,5 ± 0,9 (90,6 ± 10,2)	371 ± 8 (101 ± 3)	1,51 ± 0,36 (4,66 ± 1,17)	2093 ± 48 (102 ± 3)
Arroz (cru)	0,11 ± 0,02 (19,3 ± 0,4)	0,15 ± 0,07 (60,0 ± 2,8)	0,38 ± 0,05 (44,7 ± 0,6)	10,3 ± 1,3 (43,8 ± 0,6)	1,05 ± 0,8 (35,7 ± 2,7)	0,85 ± 0,11 (26,1 ± 0,4)	53,6 ± 3,7 (47,8 ± 0,3)
Arroz (cozido)	0,09 ± 0,01 (29,0 ± 3,7)	0,17 ± 0,01 (100 ± 8)	0,33 ± 0,01 (97,0 ± 9,0)	7,23 ± 0,44 (102 ± 9)	2,42 ± 0,31 (91,7 ± 13,8)	1,38 ± 0,30 (41,7 ± 10,0)	68,5 ± 4,1 (95,3 ± 7,7)
Milho (cru)	0,24 ± 0,00 (55,8 ± 7,8)	0,26 ± 0,00 (63,4 ± 3,1)	1,26 ± 0,05 (103 ± 5)	55,3 ± 0,6 (98,0 ± 1,3)	0,07 ± 0,01 (1,32 ± 0,20)	1,11 ± 0,77 (38,7 ± 27,8)	692 ± 9 (98,0 ± 1,5)
Milho (cozido)	0,28 ± 0,03 (90,3 ± 1,3)	0,31 ± 0,02 (96,9 ± 1,4)	0,57 ± 0,19 (103 ± 4)	10,5 ± 0,11 (94,6 ± 0,4)	3,80 ± 0,10 (76,8 ± 0,4)	2,32 ± 0,13 (87,5 ± 1,0)	539 ± 7 (98,0 ± 0,1)
<i>Menos conhecidos</i>							
Cupuaçu	0,13 ± 0,02 (108 ± 19)	0,79 ± 0,02 (106 ± 9)	1,15 ± 0,07 (96,6 ± 7,6)	18,8 ± 0,8 (102 ± 24)	28,7 ± 1,1 (94,4 ± 3,9)	0,44 ± 0,12 (10,3 ± 3,3)	668 ± 6 (101 ± 1)
Graviola	0,07 ± 0,02 (87,5 ± 3,32)	0,27 ± 0,01 (57,4 ± 4,2)	0,47 ± 0,02 (97,9 ± 5,8)	19,3 ± 2,3 (84,3 ± 11,5)	48,8 ± 5,1 (76,4 ± 8,4)	0,45 ± 0,23 (1,67 ± 0,86)	1722 ± 46 (85,3 ± 2,9)
Alfavaca	0,09 ± 0,01 (69,2 ± 9,4)	0,18 ± 0,01 (25,0 ± 1,4)	0,79 ± 0,09 (64,2 ± 7,6)	60,5 ± 1,1 (96,5 ± 2,1)	822 ± 17 (44,1 ± 1,0)	0,77 ± 0,01 (3,76 ± 0,06)	991 ± 8 (93,3 ± 0,8)
Amaranto (cru)	0,07 ± 0,01 (6,03 ± 0,94)	0,26 ± 0,01 (42,6 ± 1,8)	2,64 ± 0,37 (16,7 ± 2,4)	29,9 ± 1,2 (11,5 ± 0,6)	12,6 ± 2,2 (7,32 ± 1,28)	0,37 ± 0,02 (11,3 ± 0,8)	600 ± 8 (67,3 ± 1,5)
Amaranto (cozido)	0,35 ± 0,09 (77,7 ± 2,0)	0,10 ± 0,03 (83,3 ± 3,2)	4,52 ± 0,62 (80,6 ± 1,3)	141 ± 7 (80,6 ± 0,5)	96,4 ± 8,4 (87,6 ± 0,8)	0,89 ± 0,02 (31,3 ± 0,2)	610 ± 11 (93,8 ± 0,2)
Quinoa (crua)	0,12 ± 0,01 (3,57 ± 0,51)	0,18 ± 0,02 (32,7 ± 3,8)	3,49 ± 0,12 (66,7 ± 9,1)	22,5 ± 3,6 (11,1 ± 1,9)	11,1 ± 0,8 (46,2 ± 3,5)	1,46 ± 0,58 (18,1 ± 7,4)	487 ± 21 (77,4 ± 3,6)
Quinoa (cozida)	0,81 ± 0,09 (50,6 ± 0,8)	0,20 ± 0,08 (71,4 ± 3,5)	2,21 ± 0,13 (97,8 ± 1,9)	85,2 ± 6,1 (56,4 ± 0,5)	17,5 ± 2,3 (92,1 ± 1,3)	3,98 ± 0,12 (55,4 ± 0,4)	574 ± 13 (99,0 ± 0,3)

Os valores entre parênteses e em negrito são as porcentagens de bioacessibilidade (% B).

4.5. Conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados

O conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados foi determinado conforme descrito na seção 3.9. Tal determinação foi realizada com todos os alimentos, inclusive as amostras cozidas dos cereais (arroz, milho, amaranto e quinoa). A tabela a seguir mostra os resultados obtidos na forma de uma média com sua correspondente incerteza (desvio padrão), uma vez que a determinação de ácido fítico foi realizada em triplicata para cada amostra alimentar.

Tabela 16. Conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados (g de ácido fítico/100 g de amostra alimentar seca)

Alimento	Ácido fítico (g/100 g de amostra alimentar seca)
Arroz (cru)	0,11 ± 0,03
Arroz (cozido)	0,09 ± 0,01
Milho (cru)	1,02 ± 0,08
Milho (cozido)	0,70 ± 0,05
Amaranto (cru)	0,63 ± 0,03
Amaranto (cozido)	0,22 ± 0,05
Quinoa (crua)	1,12 ± 0,17
Quinoa (cozida)	0,83 ± 0,10
Maçã	0,07 ± 0,04
Banana	0,08 ± 0,01
Cupuaçu	0,03 ± 0,00
Graviola	0,06 ± 0,02
Alface	0,05 ± 0,02
Alfavaca	0,07 ± 0,01

Pelos dados da Tabela 16, evidencia-se que o processo de cozimento dos cereais analisados promove uma diminuição do conteúdo de ácido fítico dos mesmos, em virtude da remoção do ácido fítico e fitatos pela água; no amaranto essa diminuição foi a maior, chegando a cerca de 65 %. Pela Tabela 16 constata-se ainda que os cereais, de modo geral, são os alimentos com os maiores, e as frutas e hortaliças com os menores, conteúdos de ácido fítico.

4.6. Discussão dos resultados obtidos

Esta seção destina-se a discussão de todos os resultados apresentados nas seções anteriores (seções de 4.1 a 4.5), buscando-se evidenciar as informações e as correlações obtidas por meio deles.

4.6.1 Comparação entre as quantidades dos elementos nos cereais crus e cozidos

As quantidades totais e bioacessíveis dos macro e microelementos estudados nos *cereais* foram obtidas com amostras cruas e cozidas dos mesmos. Pelos dados da Tabela 14, evidencia-se que o processo de cozimento promove uma perda dos micro e macroelementos em todos os cereais analisados. Assim, considerando a quantidade total

dos elementos (soma das quantidades totais dos 7 elementos químicos determinados), aproximadamente 40 % desta é perdida no arroz durante o processo de cozimento, 26 % no milho, 30 % no amaranto e 13 % na quinoa. A perda de nutrientes durante o cozimento é devida à remoção dos mesmos pela água. Durante o cozimento, as moléculas de água entram no interior da matriz dos grãos dos cereais, dissolvendo uma parcela das quantidades dos elementos ali presentes e carregando-a para fora do grão. Desse modo, é de se esperar que os teores de micro e macroelementos sejam menores nos cereais cozidos do que neles crus.

Observando agora a Tabela 15 no que diz respeito aos cereais, vê-se que a *porcentagem de bioacessibilidade* (% B) de qualquer um dos micro e macroelementos determinados é maior nos cereais cozidos do que neles crus. Esta constatação pode ser explicada do seguinte modo. Quando o cereal é cozido em água, a maioria das suas proteínas tornam-se desnaturadas (a desnaturação protéica é o processo pelo qual as proteínas perdem suas estruturas quaternárias e/ou terciárias originais), as fibras naturais perdem suas características próprias, e ocorre o processo de gelatinização do amido. O amido é um carboidrato constituído por longas cadeias em que moléculas de glicose estão ligadas umas as outras formando um emaranhado molecular que se apresenta, a nível microscópico, na forma de grânulos. O amido não é solúvel em água fria, porém quando o mesmo é exposto a um ambiente de água aquecida (como o é o ambiente durante a cocção de cereais em água), a água começa a penetrar nos grânulos de amido e estes, por sua vez, ficam túrgidos. Conforme a cocção vai prosseguindo, mais água penetra no interior dos grânulos e, assim, o amido perde sua estrutura original, gerando uma dispersão viscosa com a consistência de um gel (daí o nome gelatinização). Devido a todos esses processos descritos, os elementos químicos que originalmente (isto é, nos cereais crus) estavam associados às proteínas, fibras e aos grânulos de amido, ficam mais livres destas interações e, desse modo, são mais suscetíveis de serem liberados da matriz dos grãos de cereais nas condições do teste de bioacessibilidade *in vitro* (que simula a digestão gastrointestinal humana). Assim, é realmente de se esperar que a porcentagem de bioacessibilidade (% B) dos elementos químicos nos cereais cozidos seja maior do que nos cereais crus. Desse modo, o maior aproveitamento do potencial nutritivo dos cereais analisados no que diz respeito aos micro e macroelementos estudados é obtido quando os cereais estão cozidos. Esta constatação pode, de certo modo, ser generalizada para outros cereais (e para outros elementos químicos essenciais ao metabolismo humano) consumidos na dieta humana, evidenciando o fato de que o processo de cocção além de tornar os cereais mais saborosos ao consumo humano,

torna-os também mais nutritivos no que tange aos elementos químicos essenciais ao metabolismo humano.

Por fim, comparando as quantidades bioacessíveis dos elementos químicos estudados no amaranto e na quinoa cozidos em relação às mesmas quantidades dos cereais arroz e milho (cozidos), vê-se que o amaranto e a quinoa disponibilizam uma maior quantidade de elementos químicos essenciais aos humanos do que o arroz e o milho (somando as quantidades bioacessíveis dos sete elementos químicos estudados da Tabela 15, o amaranto e a quinoa fornecem juntos 1,54 g de elementos por 200 g da mistura 1:1 destes dois cereais; já o arroz e o milho fornecem 0,64 g, menos que a metade disponibilizada pelo amaranto e quinoa), evidenciando o potencial nutritivo destes cereais (amaranto e quinoa) menos conhecidos pela população brasileira em geral, e o fato de os mesmos poderem ser mais inseridos e aproveitados na cultura alimentar da população.

4.6.2 Discussão sobre as quantidades totais e bioacessíveis dos macro e microelementos

Observando os dados das tabelas 14 e 15 pode-se perceber que, de modo geral e na grande maioria dos casos, as quantidades totais e bioacessíveis dos macroelementos (Mg, Ca, Na e K) são maiores que as correspondentes quantidades dos microelementos (Fe, Cu e Zn). Este resultado mostra um relacionamento entre a quantidade de um determinado elemento químico necessária na dieta diária dos seres humanos, e a quantidade deste mesmo elemento presente nas frutas, hortaliças e cereais analisados na pesquisa de mestrado. Isto quer dizer que, como os macroelementos são elementos químicos requeridos em uma maior quantidade na dieta (seção 1.2), os mesmos também estão presentes em maior quantidade nos alimentos analisados. O mesmo raciocínio, porém realizado de forma inversa, também é válido para os microelementos.

Ainda observando os resultados presentes nas Tabelas 14 e 15, pode-se dizer que nem todo o conteúdo de um determinado elemento nutriente presente em um dado alimento é passível de ser liberado da matriz do alimento durante a digestão gastrointestinal humana, tornando-se disponível para a absorção e consequente utilização pelo organismo. Tomando como exemplo os resultados obtidos para o amaranto *cru*, vê-se que as bioacessibilidades de alguns elementos (Zn, Fe, Mg, Ca e Na) neste alimento foram baixas quando comparadas com as correspondentes bioacessibilidades para os outros alimentos estudados. Por exemplo, o ferro (Fe) é um elemento cuja importância nutricional é bem difundida perante a população.

Considerando as quantidades totais deste elemento nos alimentos em estudo, pode-se dizer que o amaranto *cru* é o mais nutritivo no que diz respeito ao Fe. No entanto, ao considerar a bioacessibilidade, evidencia-se que o amaranto *cru* não é o alimento mais eficiente no que diz respeito à disponibilização de Fe para o organismo. Este resultado (e também os outros obtidos) mostra a grande importância de se considerar e inserir as bioacessibilidades dos nutrientes em tabelas de composição de nutrientes dos alimentos (não somente os minerais considerados neste estudo, mas todos os outros nutrientes importantes), a fim de fornecer informações nutricionais mais próximas da realidade.

A Tabela 17 compara as quantidades bioacessíveis de cada um dos micro e macroelementos determinados nas duas classes de alimentos: a classe dos alimentos *menos conhecidos* e a classe dos *mais conhecidos* pela população brasileira em geral. Comparou-se essas duas classes considerando alimentos do mesmo tipo, isto é, frutas com frutas, hortaliça com hortaliça, cereais com cereais. Utilizaram-se as quantidades bioacessíveis, pois estas são mais importantes na avaliação do real valor nutritivo de um alimento. A comparação foi realizada levando em conta se a quantidade bioacessível de um elemento em um dado alimento é maior, menor ou igual que a correspondente quantidade em outro alimento do mesmo tipo que o primeiro. Para isto, o intervalo das quantidades bioacessíveis dado pela média e a correspondente incerteza foi considerado. Assim, para dois valores de concentração sobrepostos em alguma extensão, considerou-se que os mesmos são iguais; pelo contrário, um poderia ser maior ou menor que o outro. Para compreender a informação presente na Tabela 17 deve-se entender o seguinte: os sinais de MAIS (+) ou MENOS (-) mostram se a quantidade do elemento em questão é maior (indicado com o sinal de “+”) ou menor (indicado com o sinal de “-“) no alimento menos conhecido em relação ao alimento mais conhecido. O sinal de IGUAL (=) mostra que as quantidades comparadas são iguais dentro do critério supracitado. Assim, por exemplo, a quantidade de Zn bioacessível do cupuaçu é menor que a correspondente quantidade da banana, e a quantidade de Ca bioacessível da quinoa cozida é maior que a correspondente quantidade presente no arroz cozido.

Tabela 17. Comparação entre as quantidades bioacessíveis de todos os elementos determinados nos alimentos mais e menos conhecidos pela população brasileira em geral

	<i>Mais conhecidos</i>	<i>Menos conhecidos</i>	Zn	Cu	Fe	Mg	Ca	Na	K
Frutas	Banana	Cupuaçu	-	+	+	-	+	=	-
		Graviola	-	-	-	-	+	=	+
	Maçã	Cupuaçu	=	+	+	+	+	=	+
		Graviola	-	+	-	+	+	=	+
Hortaliças	Alface	Alfavaca	+	-	=	+	+	-	-
Cereais*	Arroz	Amaranto	+	-	+	+	+	-	+
		Quinoa	+	=	+	+	+	+	+
	Milho	Amaranto	=	-	+	+	+	-	+
		Quinoa	+	-	+	+	+	+	+

* Considerou-se apenas os resultados referentes à amostra cozida dos cereais, pois esta é a forma mais comum com que os mesmos são consumidos na dieta das pessoas.

Pelos dados da Tabela 17 pode-se notar que em 46 das 63 comparações feitas (isto é, em 73 % das comparações), as quantidades bioacessíveis dos elementos nos alimentos *menos conhecidos* foram maiores ou iguais que as correspondentes quantidades nos alimentos *mais conhecidos*. Isto mostra a grande relevância nutricional destes alimentos menos conhecidos, uma vez que os mesmos apresentam, de forma geral, quantidades bioacessíveis de micro e macronutrientes equiparáveis ou até maiores do que a de alimentos (dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais) mais conhecidos popularmente.

Um padrão geral que chama a atenção ao se observar os dados presentes nas Tabelas 14 e 15 é que, além de ser o mais bioacessível dentre todos os considerados, o potássio é o elemento que está presente em maior quantidade em todos os alimentos analisados. Este resultado justifica-se levando em conta que o potássio é um elemento químico essencial para o crescimento de qualquer variedade de planta, sendo um dos elementos químicos utilizados (e, portanto, absorvidos) em maior quantidade durante a vida de um vegetal. Dentre outras funções, no crescimento de plantas, o potássio (sobretudo na sua forma catiônica, K^+) atua na regulação dos estômatos, estruturas fundamentais para a transpiração que é um processo essencial para a vida de uma espécie vegetal. Uma vez que todos os alimentos analisados (frutas, hortaliças e cereais) são direta ou indiretamente provenientes de espécies vegetais, é esperado que os seus teores de potássio sejam consideravelmente maiores em relação aos dos outros elementos químicos determinados, pois tais alimentos incorporam a grande quantidade de potássio requerida para o desenvolvimento e vida das espécies vegetais das quais os mesmos são gerados.

4.6.3 Influência do conteúdo de ácido fítico nas bioacessibilidades

O efeito do conteúdo de fitatos (ácido fítico) sobre a bioacessibilidade mineral é de interesse em numerosas pesquisas e objeto de várias revisões [72, 80, 117-119]. O ácido fítico é um composto que possui a capacidade de se ligar a vários cátions (especialmente os polivalentes) de diversos elementos químicos nutricionalmente importantes para o organismo humano. O resultado da ligação é a formação de complexos insolúveis que são difíceis de serem hidrolisados durante a digestão humana, tornando os elementos químicos menos disponíveis para a absorção e aproveitamento pelo organismo [120]. Isto é, o ácido fítico atua na redução das bioacessibilidades de elementos químicos presentes em alimentos.

Os gráficos da figura abaixo mostram a relação entre o conteúdo de ácido fítico e as porcentagens de bioacessibilidade de cada um dos elementos químicos analisados nos cereais crus. Os dados referem-se às amostras cruas dos cereais, pois o processo de cozimento pode gerar outros tipos de alterações (ver seção 4.6.1) que promovem uma variação na bioacessibilidade além daquela causada pelo conteúdo de ácido fítico. Para simplificar, os gráficos foram construídos usando apenas os valores absolutos das quantidades envolvidas, não considerando, portanto, os desvios padrões.

Figura 11. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras cruas dos cereais analisados. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam o cereal correspondente ao ponto: A = Arroz, M = Milho, Am = Amaranto, e Q = Quinoa.

Nos alimentos, os elementos químicos nutrientes estão presentes principalmente na forma de cátions com diversas valências (por exemplo, Fe^{+3} , Cu^{+2} , Na^{+1} , etc.). Conforme explicado na seção 1.6, o ácido fítico, sobretudo na forma de fitatos, possui a capacidade de se ligar aos cátions dos elementos nutrientes, diminuindo, assim, a bioacessibilidade destes elementos. Logo, é de se esperar que quanto maior for o conteúdo de ácido fítico de um alimento, menor será a bioacessibilidade da maioria dos elementos nutrientes que o constituem. Levando isso em consideração, o primeiro fato a ser pontuado ao se observar os gráficos da Figura 11 é que a tendência esperada não pode ser diretamente evidenciada, pois, em todos os gráficos, nem sempre o alimento com o maior conteúdo de ácido fítico apresentava a menor porcentagem de bioacessibilidade mineral. No entanto, isto pode ser de certa forma entendido, pois os gráficos foram construídos com dados de alimentos diferentes, que possuem diferentes propriedades e características, tais como a distribuição do conteúdo de ácido fítico na massa alimentar, fato esse que pode influenciar a capacidade de ligação dos fitatos aos vários elementos químicos nutrientes presentes no alimento. Para esclarecer estes dizeres, considere as três partes principais de um grão cereal: pericarpo (um conjunto de camadas externas que formam a “casca” propriamente dita do grão), endosperma e gérmen. Dependendo do tipo de cereal, a distribuição do conteúdo total de ácido fítico e de um determinado elemento químico nutriente pode ser desigual; por exemplo, a maior parte do ácido fítico pode estar presente no pericarpo, enquanto a maior parte da quantidade total do elemento químico esteja presente no gérmen. Assim, neste cereal, a influência do ácido fítico na bioacessibilidade do elemento químico em específico seria menos acentuada, pois as duas espécies não possuem uma probabilidade favorável de ligação, uma vez que as mesmas estão separadas na constituição do alimento. Para fortalecer esta explicação, na referência **120** existe uma tabela que mostra a porcentagem de ácido fítico nas diferentes partes de alguns grãos cereais. Na tabela é possível ver que 80 % do conteúdo total de ácido fítico presente no arroz integral está contido no pericarpo, enquanto que no milho a maior porcentagem do ácido fítico (88 %) está contida no gérmen. Esta característica pode fazer com que, por exemplo, a bioacessibilidade do zinco (Zn) seja maior no milho cru do que no arroz cru, mesmo o milho tendo, no total, uma maior quantidade de ácido fítico. Isto foi, de fato, o que aconteceu com os resultados obtidos nesta pesquisa de mestrado e mostrados na Figura 11: para o Zn, mesmo o milho tendo uma maior quantidade de ácido fítico que o arroz (ambos os cereais na forma crua), a bioacessibilidade do elemento foi maior no milho do que no arroz. Isto evidencia que a maior parte do conteúdo de Zn do grão de milho se

encontra em uma região que não contém a maior parte da quantidade total de ácido fítico do grão. De fato, para a maioria dos grãos cereais, a quase totalidade dos elementos químicos nutrientes está presente no pericarpo do grão, e para o milho em especial a maior parte do conteúdo de ácido fítico se encontra no gérmen (diferentemente do que ocorre para a maioria dos outros cereais, onde a maior parte do ácido fítico está contida no pericarpo do grão) [120]. Esta característica do milho contribui para explicar a tendência por ele apresentada nos gráficos da figura 11: para seis dos sete elementos em estudo (Zn, Cu, Fe, Mg, Na e K), o milho, mesmo tendo o segundo maior teor de ácido fítico dentre os cereais analisados, apresentou a maior porcentagem de bioacessibilidade.

Além do que foi colocado no parágrafo anterior, alguns outros aspectos importantes podem ser observados com base nos gráficos da figura 11. Se a tendência para o arroz, amaranto e quinoa for observada, pode-se constatar que para os elementos Zn, Cu e Mg existe a relação de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico do alimento, menor a porcentagem de bioacessibilidade mineral. Se observarmos os dados apenas para o arroz e o amaranto, verifica-se que a relação supracitada existe para seis dos elementos estudados (Zn, Cu, Fe, Mg, Ca e Na). Assim, mesmo considerando grãos cereais com diferentes características, constata-se que o conteúdo de ácido fítico de um cereal afeta a bioacessibilidade de alguns dos elementos químicos nutrientes nele presentes.

Outras conclusões que podem ser obtidas baseadas nos gráficos da figura 11 são as seguintes. O milho cru, mesmo apresentando o segundo maior conteúdo de ácido fítico dentre os cereais analisados, apresentou a maior porcentagem de bioacessibilidade para todos os elementos estudados, exceto o cálcio (Ca). Isto mostra que no grão de milho o Ca possui uma maior propensão em se ligar ao ácido fítico do que os outros elementos (visto que a bioacessibilidade do Ca no milho foi a menor dentre os cereais), e fornece, com base em informações já obtidas [120], indícios que grande parte da quantidade total de cálcio presente no milho está inserida no gérmen do grão, que é também o local com a maior quantidade de ácido fítico. A quinoa é, dentre os analisados, o cereal que apresentou o maior conteúdo de ácido fítico; no entanto, isto não proporciona menores porcentagens de bioacessibilidade para os elementos químicos estudados nela presentes, exceção feita ao Zn, Cu e Mg. Isto também fornece indícios que o ácido fítico presente neste pseudocereal possui maior propensão de se ligar a estes três elementos em detrimento dos outros analisados (Fe, Ca, Na e K). Pelos gráficos da figura 11 é possível ver ainda que para quatro dos elementos químicos considerados

(Zn, Cu, Mg e Na) o amaranto e a quinoa foram, em conjunto, os cereais que apresentaram as menores bioacessibilidades, fato este que pode ser correlacionado ao conteúdo de ácido fítico considerável destes dois pseudocereais. Por fim, chama atenção a tendência anômala em relação às demais apresentada no gráfico correspondente ao potássio (K). Para este elemento, observou-se de modo aproximado que quanto maior a quantidade de ácido fítico do cereal, maior a porcentagem de bioacessibilidade de K. Visto que este elemento foi o único a apresentar este comportamento, isto indica que o ácido fítico possui pouca tendência em se ligar aos íons K^+ , e, desse modo, a bioacessibilidade do K não é tão influenciada pelo teor de fitatos presentes nos cereais analisados.

A tabela a seguir mostra a relação que existe entre as *variações* da média da porcentagem de bioacessibilidade dos elementos químicos estudados nos cereais e as correspondentes *variações* do conteúdo de ácido fítico, considerando as amostras cruas e cozidas. A média da porcentagem de bioacessibilidade dos elementos para um determinado cereal foi calculada somando os valores absolutos das porcentagens de bioacessibilidade (não considerando, portanto, os desvios-padrões) de todos os elementos e, em seguida, dividindo o resultado pelo número 7 (o número de elementos químicos estudados). No cálculo da variação percentual do conteúdo de ácido fítico usou-se apenas os valores absolutos das quantidades presentes na tabela 16, não considerando também os desvios-padrões.

Tabela 18. Relação entre as variações da porcentagem de bioacessibilidade média e as variações percentuais do conteúdo de ácido fítico dos cereais crus e cozidos

Cereal	Variação da porcentagem de BIOACESSIBILIDADE MÉDIA do cereal cozido em relação ao cereal cru	Variação percentual do conteúdo de ÁCIDO FÍTICO do cereal cozido em relação ao cereal cru
Arroz	Aumento de $\approx 40 \%$	Diminuição de $\approx 18 \%$
Milho	Aumento de $\approx 30 \%$	Diminuição de $\approx 31 \%$
Amaranto	Aumento de $\approx 53 \%$	Diminuição de $\approx 65 \%$
Quinoa	Aumento de $\approx 38 \%$	Diminuição de $\approx 26 \%$

Pelas informações presentes na Tabela 18 pode-se constatar que o processo de cozimento (usando apenas água Milli-Q) dos cereais analisados provocou uma diminuição nos seus conteúdos de ácido fítico. Para arroz, milho e quinoa a redução do conteúdo de ácido fítico durante o cozimento não foi muito acentuada (não ultrapassou os 50 %) como aquela apresentada pelo amaranto. O ácido fítico é estável nas

temperaturas comuns de cozimento [120], e a diminuição do seu conteúdo durante esta etapa pode ser explicada por dois mecanismos: o primeiro é a solubilização do ácido fítico na água e a sua posterior remoção quando a água de cozimento é descartada no final, e o segundo mecanismo é a hidrólise do ácido fítico (e seus fitatos) pela ação de fitases ou fosfatases endógenas (isto é, contidas no próprio alimento) que são ativadas devido às temperaturas atingidas durante o cozimento.

O fato mais importante a ser destacado com base nos dados da Tabela 18 é que, para todos os cereais considerados, a diminuição do conteúdo de ácido fítico dos cereais cozidos é acompanhada por um aumento na média da porcentagem de bioacessibilidade dos elementos estudados. Deve-se lembrar que o cozimento de um cereal provoca várias outras modificações na estrutura do grão além da diminuição do teor de fitatos (relembre a discussão da seção 4.6.1). Mesmo assim, é possível ter a evidência de que a diminuição do conteúdo de ácido fítico (e seus fitatos) em um cereal provoca um aumento na bioacessibilidade mineral (micro e macroelementos), uma vez que diminui a porcentagem dos minerais que formam complexos insolúveis (difíceis de serem hidrolisados durante a digestão gastrointestinal humana) com os fitatos.

Os gráficos das duas figuras abaixo mostram a relação entre o conteúdo de ácido fítico e as porcentagens de bioacessibilidade de cada um dos elementos químicos analisados para as frutas e as hortaliças, em separado. Assim como para os cereais, os gráficos foram construídos usando apenas os valores absolutos das quantidades envolvidas, não considerando, portanto, os desvios padrões.

Figura 12. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras das frutas. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam a fruta correspondente ao ponto: C = Cupuaçu, G = Graviola, M = Maçã, e B = Banana.

Figura 13. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico para as amostras das hortaliças. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam a hortaliça correspondente ao ponto: A = Alfaca, e V = Alfavaca.

Nos gráficos da Figura 12 (referentes às frutas) correspondentes aos elementos Zn, Cu, Fe e Mg, pode-se evidenciar a tendência de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico, menor a bioacessibilidade mineral. Para o Fe, esta tendência é visualizada com maior clareza. No entanto, nos gráficos correspondentes aos elementos Ca, Na e K ocorre o inverso: existe um padrão geral de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico, maior é a bioacessibilidade mineral. As estruturas químicas do ácido fítico e de seus fitatos proporcionam a estas espécies a capacidade de formar complexos de coordenação com diversos íons metálicos. Deve-se lembrar que quanto maior é a relação *carga/raio* do íon (do cátion em específico), maior é a tendência deste íon em formar um complexo com um ligante (em termos mais técnicos, maior é constante de formação do complexo). O padrão observado nos gráficos da Figura 12 é uma indicação de que os fitatos possuem, para as frutas analisadas, uma menor tendência em se ligar aos íons dos elementos Ca, Na e K (Ca^{+2} , Na^{+} e K^{+}) em detrimento aos íons dos elementos Zn, Cu, Fe e Mg (Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Mg^{+2}), visto que para estes quatro últimos os fitatos influenciaram as bioacessibilidades de modo concordante com suas características químicas, fato que não ocorreu para os três primeiros. Um comportamento análogo aos elementos Ca, Na e K na Figura 12 também foi obtido para o K no gráfico correspondente da Figura 11 (referente aos cereais analisados). Para esclarecer melhor a conclusão exposta, segue a descrição abaixo.

É inevitável o fato de que o ácido fítico e seus fitatos, devido à suas estruturas químicas, possuem a capacidade de formar complexos de coordenação com íons (cátions) de diversos elementos químicos nutricionalmente importantes para o organismo humano. A figura a seguir, extraída da referência **120**, exemplifica o que foi dito, mostrando a interação do íon Fe^{+2} com os fitatos e com o grupo carboxila de uma molécula de proteína.

Figura 14. Exemplo mostrando a interação simultânea do íon Fe^{+2} com um fitato e o grupo carboxila de uma molécula de proteína.

A interação do ácido fítico e seus fitatos com os cátions dos elementos se faz através dos oxigênios presentes nos grupos fosfato, sendo que a força desta interação depende da natureza do íon e de sua carga. Conforme já dito, existe a tendência de que quanto maior é a relação *carga/raio* do íon, maior é a força da interação, pois, nessas condições, pode ocorrer uma maior aproximação dos átomos de oxigênio (com seus pares de elétrons livres) com o cátion metálico, aumentando a força da interação coulômbica. Os complexos formados entre o ácido fítico e seus fitatos com os cátions metálicos possuem um efeito de “blindar” os cátions dos elementos durante a digestão gastrointestinal humana; o resultado disso é a tendência na redução da porcentagem de bioacessibilidade do elemento quanto maior for o conteúdo de ácido fítico do alimento (pois, quanto mais ácido fítico e fitatos, maior é a quantidade de elementos “blindada” durante a digestão humana). Vohra e colaboradores [121] relataram, usando dados empíricos, que os complexos formados entre os fitatos e os cátions metálicos seguem a seguinte ordem decrescente de força da interação:

Ainda de acordo com a referência 121, a ordem decrescente de estabilidade dos complexos mineral-fitatos é a seguinte:

Levando em conta essas informações, é de se esperar, independentemente das espécies de alimentos comparadas dentro de uma mesma classe (frutas, hortaliças ou cereais), que quanto maior for o conteúdo de ácido fítico do alimento, menor será a bioacessibilidade mineral. No entanto, conforme já evidenciado na Figura 11 (para o K) e na Figura 12 (para Ca, Na e K), para alguns elementos esta tendência não foi observada. Além do mais, nesses casos, foi evidenciada uma tendência oposta à esperada. Para explicar esses casos o primeiro fato a ser notado é que os íons dos elementos citados (Ca^{+2} , K^{+} e Na^{+}) possuem naturalmente uma força de interação com o ácido fítico e seus fitatos baixa, levando a formação de complexos mineral-fitatos de pequena estabilidade e que, portanto, podem facilmente ser desfeitos durante a digestão humana: desse modo, para estes elementos, os fitatos não conseguem exercer intensamente seus efeitos de “blindagem” durante a digestão gastrointestinal. Outro fato a ser considerado é que, embora exerça uma influência relevante, o conteúdo de ácido

fítico (e fitatos) não é o único fator que afeta a bioacessibilidade de um elemento químico presente em um alimento. Algumas outras características, tais como o conteúdo de fibras [122] e a natureza das proteínas [120] presentes em um alimento também podem influenciar de maneira significativa as porcentagens de bioacessibilidade mineral. Assim, uma explicação plausível para os comportamentos observados nas Figuras 11 e 12 é que o K nos cereais analisados e os elementos Ca, Na e K nas frutas analisadas possuem uma menor tendência em formar complexos de coordenação com os fitatos presentes nestes alimentos, uma vez que o conteúdo de ácido fóico destes alimentos não foi o fator principal que afetou as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos supracitados. Esta conclusão só pôde ser obtida, pois a comparação foi realizada com alimentos diferentes dentro de uma mesma classe (frutas ou cereais). Provavelmente se, hipoteticamente, fosse comparado, por exemplo, a porcentagem de bioacessibilidade do K em bananas da mesma espécie contendo diferenças consideráveis em seus conteúdos de ácido fóico (fitatos), se observaria que a banana com a maior quantidade de ácido fóico apresentaria a menor porcentagem de bioacessibilidade do K. Por fim, vale dizer ainda que todos os comportamentos observados nos gráficos das figuras 11 e 12 também estão sujeitos às outras características (exemplificadas nas descrições acima) dos alimentos que influenciam a porcentagem de bioacessibilidade dos elementos, além do conteúdo de ácido fóico.

Mesmo comparando apenas duas espécies alimentares da classe das hortaliças, cinco dos sete gráficos da Figura 13 (referentes aos elementos Cu, Fe, Ca, Na e K) também corroboram com o fato de quanto maior o conteúdo de ácido fóico do alimento, menor a porcentagem de bioacessibilidade mineral. O comportamento dos gráficos dos outros dois elementos (Zn e Mg) da Figura 13 também pode ser entendido levando em conta as discussões do parágrafo anterior, uma vez que estão em desacordo com a tendência esperada entre o conteúdo de ácido fóico e a porcentagem de bioacessibilidade mineral.

O gráfico da Figura 15 mostra a relação que existe entre a média da quantidade de ácido fóico presente nos cereais crus, nas frutas e nas hortaliças analisadas, e as correspondentes médias das porcentagens de bioacessibilidade considerando todos os micro e macroelementos estudados. Assim como já dito anteriormente, os dados referem-se às amostras cruas dos cereais, pois o processo de cozimento pode provocar outros tipos de alterações (ver seção 4.6.1) que promovem uma variação na bioacessibilidade além daquela causada pelo conteúdo de ácido fóico. Como uma simplificação, os gráficos foram construídos usando apenas os valores absolutos das

quantidades envolvidas, não considerando, portanto, os desvios padrões. Para esclarecimento, a média do conteúdo de ácido fítico de uma dada classe alimentar (cereais, frutas ou hortaliças) foi obtida somando as quantidades de ácido fítico (apenas o valor absoluto, ver a Tabela 16) de cada integrante da classe e dividindo o resultado da soma pelo número de integrantes da referida classe (por exemplo, os integrantes da classe das frutas são: maçã, banana, cupuaçu e graviola). Do mesmo modo, a média da porcentagem de bioacessibilidade mineral de cada classe foi obtida somando as porcentagens de bioacessibilidade de todos os elementos para cada integrante da classe e, em seguida, dividindo o resultado da soma pelo produto da multiplicação do número de integrantes da classe por 7 (o número de elementos químicos determinados).

Figura 15. Relação entre a porcentagem de bioacessibilidade média e o conteúdo de ácido fítico médio das três classes de alimentos analisadas: cereais (C), frutas (F) e hortaliças (H).

A Figura 15 diferencia-se das Figuras 11, 12 e 13, pois mostra a relação existente entre alimentos de diferentes classes, fato que não ocorre com os gráficos das figuras anteriores. O que deve ser ressaltado na Figura 15 é que a tendência esperada de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico de um alimento, menor a porcentagem de bioacessibilidade mineral, é observada com clareza, mesmo considerando alimentos de diferentes classes e levando em conta as médias da porcentagem de bioacessibilidade dos elementos e do conteúdo de ácido fítico. Isto fortalece os indícios de que, mesmo não atuando intensamente em alguns casos, a quantidade de ácido fítico presente em um alimento (dentro do grupo das frutas, hortaliças e cereais) influencia de maneira significativa a disponibilização (durante a digestão gastrointestinal humana) dos

elementos químicos nutrientes nele presente para o organismo humano, afetando, assim, as características nutricionais do alimento.

Para finalizar estas discussões, a tabela a seguir compara o conteúdo de ácido fítico presente nas classes dos alimentos *mais* e *menos* conhecidos pela população brasileira em geral. Assim como na Tabela 17, as duas classes foram comparadas considerando alimentos do mesmo tipo, isto é, frutas com frutas, hortaliça com hortaliça, cereais com cereais. A comparação foi realizada levando em conta se o conteúdo de ácido fítico (em g de ácido fítico/100 g de amostra alimentar seca) de um dado alimento é maior, menor ou igual que o mesmo conteúdo de outro alimento do mesmo tipo que o primeiro. Para isto, o intervalo das quantidades de ácido fítico dado pela média e a correspondente incerteza foi considerado. Assim, para dois valores sobrepostos em alguma extensão, considerou-se que os mesmos são iguais; pelo contrário, um poderia ser maior ou menor que o outro. Na Tabela 19 a comparação é realizada por meio das inscrições “Maior”, “Menor” ou “Igual”, levando em conta se o conteúdo de ácido fítico do alimento *menos conhecido* é maior, menor ou igual em relação ao mesmo conteúdo presente no alimento *mais conhecido*.

Tabela 19. Comparação entre o conteúdo de ácido fítico presente nos alimentos mais e menos conhecidos pela população brasileira em geral

	<i>Mais conhecidos</i>	<i>Menos conhecidos</i>	Comparação
Frutas	Banana	Cupuaçu	Menor
		Graviola	Igual
	Maçã	Cupuaçu	Igual
		Graviola	Igual
Hortaliças	Alface	Alfavaca	Igual
Cereais*	Arroz	Amaranto	Maior
		Quinoa	Maior
	Milho	Amaranto	Menor
		Quinoa	Igual

* Assim como na Tabela 17, considerou-se apenas os resultados referentes à amostra cozida dos cereais, pois esta é a forma mais comum com que os mesmos são consumidos na dieta das pessoas.

Na Tabela 19, sete (7) das nove (9) comparações feitas (isto é, em aproximadamente 78 % das comparações) mostraram que o conteúdo de ácido fítico dos alimentos menos conhecidos é *maior ou igual*, e *menor ou igual* ao mesmo conteúdo presente em alimentos mais conhecidos do mesmo tipo. Isto mostra que, em média, os alimentos menos conhecidos analisados possuem teores de ácido fítico semelhantes quando comparados com os alimentos mais conhecidos. Assim, era de se esperar que esta característica proporcionasse aos alimentos menos conhecidos uma limitação na

disponibilização dos micro e macroelementos (durante a digestão gastrointestinal humana) de certo modo também semelhante a dos alimentos mais conhecidos. No entanto, lembrando a informação presente na Tabela 17, vê-se que em 38 das 63 comparações feitas (isto é, em aproximadamente 60 % das comparações) a quantidade bioacessível (determinada por meio do teste de bioacessibilidade *in vitro*) dos micro e macroelementos em análise foi maior para os alimentos menos conhecidos do que para os mais conhecidos. Assim, isto evidencia que, mesmo tendo conteúdos de ácido fítico comparáveis aos alimentos mais conhecidos, nos alimentos menos conhecidos esse conteúdo exerce uma influência menor sobre a bioacessibilidade mineral (levando em conta os elementos químicos analisados na pesquisa desta dissertação de mestrado) de modo geral, mostrando que os alimentos menos conhecidos estudados possuem um valor nutricional no que tange aos micro e macroelementos comparável e, em alguns casos, até maior do que os alimentos menos conhecidos. Deste modo, estes dados empíricos comprovam que os alimentos menos conhecidos analisados (cupuaçu, graviola, alfavaca, amaranto e quinoa) possuem um bom valor nutritivo com relação aos micro e macroelementos estudados, viabilizando suas inserções na cultura alimentar da população brasileira, e incentivando futuras pesquisas com o mesmo enfoque.

4.6.4 Importância nutricional dos fitatos

Nas seções 1.6 (Introdução) e 4.6.3 (a seção anterior) foi ressaltado e evidenciado que o consumo elevado de ácido fítico tem efeitos adversos sobre a absorção mineral (elementos químicos) durante a digestão gastrointestinal humana. Recentemente, entretanto, alguns novos efeitos metabólicos dos fitatos ou de seus produtos de degradação estão sendo reconhecidos [123]. O ácido fítico (ou seus fitatos) ingerido na dieta pode gerar vários efeitos benéficos para a saúde, tais como a prevenção de formação de pedras nos rins [124], proteção contra a diabetes mellitus [125], a cárie [126], aterosclerose, e doença coronariana [127], bem como uma variedade de cânceres [128]. Assim, considerando o enfoque da pesquisa de mestrado descrita nesta dissertação, os alimentos que apresentam uma boa bioacessibilidade mineral (referente, sobretudo, aos micro e macroelementos estudados) mesmo contendo um conteúdo significativo de ácido fítico (fitatos), possuem uma grande importância para a nutrição e saúde humana, pois combinam a disponibilização satisfatória de elementos químicos essenciais para o organismo humano aos efeitos benéficos que o ácido fítico (e seus fitatos) pode gerar.

Pela Tabela 16 pode-se evidenciar que os cereais são, de modo geral, os alimentos com os maiores conteúdos de ácido fítico, bem maiores do que os presentes nas frutas e hortaliças. No entanto, os que mais se destacam são o amaranto e a quinoa, dois pseudocereais que tem ganhado muito enfoque nas pesquisas científicas. Pode-se ver, relembrando a comparação presente na Tabela 17 e os dados da Tabela 15, que para a maioria dos elementos químicos estudados as quantidades bioacessíveis estimadas por meio do teste *in vitro* são maiores no amaranto e na quinoa em relação aos cereais mais conhecidos analisados (arroz e milho), e também em relação a todos os outros alimentos contemplados nesta pesquisa. Isto mostra que o amaranto e a quinoa são dois cereais (pseudocereais) que combinam as duas características citadas no parágrafo anterior (boa quantidade bioacessível dos elementos químicos nutrientes e alto conteúdo de ácido fítico), ressaltando seus potenciais nutritivos para a dieta humana e a necessidade de uma maior divulgação e inserção destes grãos na culinária diária da sociedade brasileira.

4.6.5 Discussão geral sobre as bioacessibilidades

Uma descrição geral sobre o resultado das bioacessibilidades estimadas para cada elemento do estudo é apresentada a seguir.

4.6.5.1. Zinco (Zn)

O zinco é um dos elementos mais amplamente estudados no que diz respeito ao seu conteúdo total em amostras alimentares [129, 130], e no que tange a sua bioacessibilidade em alimentos vegetais [54, 131]. As concentrações total e bioacessível de Zn variam de acordo com a espécie alimentar [56]. Na pesquisa descrita nesta dissertação de mestrado, para as frutas banana, cupuaçu e graviola, pode-se dizer (evidenciando os dados da Tabela 15) que o elemento Zn é praticamente 100 % bioacessível; isto indica que estes alimentos são fontes importantes de Zn, uma vez que todo o conteúdo deste elemento neles presente é liberado no trato gastrointestinal humano durante a digestão, tornando-se disponível para uma possível absorção pelo organismo. É importante destacar ainda as baixas bioacessibilidades de zinco para o amaranto cru e a quinoa crua. Este resultado demonstra a importância de se considerar a bioacessibilidade na avaliação nutricional de um alimento: na Tabela 14 vê-se que o amaranto cru e a quinoa crua (pseudocereais) são os alimentos (dentre os analisados) que apresentam as maiores concentrações totais de Zn. Mesmo assim, isto não garante a eles um bom valor nutritivo no que tange o micromineral Zn, uma vez que a bioacessibilidade deste elemento nos alimentos citados é baixa.

4.6.5.2. Cobre (Cu)

Os resultados presentes na Tabela 15 evidenciam que o cobre possui uma bioacessibilidade considerável (maior que 50 %) na maioria dos alimentos analisados. Destaca-se que no arroz e no cupuaçu a bioacessibilidade deste elemento é praticamente 100 %. Sobretudo no arroz, que é um alimento mais popular na dieta diária da população brasileira (e de outras localidades do mundo), o resultado obtido demonstra a grande importância que este cereal apresenta no que diz respeito ao fornecimento das necessidades diárias de Cu. A deficiência de Cu gera efeitos danosos em diferentes tecidos do organismo humano, incluindo os sistemas hematopoiético, cardiovascular e o SNC (sistema nervoso central) [132], fato que ressalta a importância deste elemento na dieta.

4.6.5.3. Ferro (Fe)

O ferro, assim como o zinco, é um dos alimentos mais estudados no que diz respeito a sua bioacessibilidade através de métodos *in vivo* e *in vitro* [133, 134]. Observa-se que para todos os alimentos estudados (exceção feita ao amaranto cru), a bioacessibilidade de Fe ultrapassa os 50 %, chegando a praticamente 100 % em alimentos mais conhecidos pela população brasileira (alface, arroz e milho), e também em alimentos menos conhecidos (cupuaçu e graviola). Para o amaranto cru a bioacessibilidade de Fe é muito baixa, apesar de a concentração total deste elemento neste pseudocereal ser a maior dentre todos os alimentos analisados (constatação semelhante à feita para o caso do elemento Zn). Conforme discutido na seção 4.6.3, este fato pode ter relação, principalmente, com o significativo conteúdo de ácido fítico presente no amaranto.

4.6.5.4. Magnésio (Mg)

Para todos os alimentos considerados nesta pesquisa de mestrado, a bioacessibilidade estimada para o Mg foi alta, atingindo valores bem próximos de 100 % (levando em conta as incertezas experimentais). Destaca-se que tal tendência ocorreu para todos os alimentos classificados (neste estudo) como mais conhecidos pela população brasileira em geral, mostrando suas importâncias no que diz respeito ao fornecimento do macroelemento Mg para a dieta diária dos seres humanos. Além disso, esta mesma colocação se aplica para os alimentos menos conhecidos, exceção feita ao amaranto cru e a quinoa crua. Para estes dois pseudocereais (crus) a bioacessibilidade

do Mg foi baixa (11 % - 13 %), indicando também (assim como já foi dito para o caso do ferro) que suas composições químicas podem interferir na liberação dos minerais (elementos químicos) durante a digestão no trato gastrointestinal humano. A esse respeito, sobretudo no que tange ao amaranto cru, a baixa bioacessibilidade do Mg é indicada em alguns estudos na literatura [119, 135] como sendo atribuída ao conteúdo considerável de fitatos (provenientes do ácido fítico) presente neste grão (amaranto). Os fitatos podem se ligar aos íons magnésio, formando complexos de coordenação que impedem a liberação do Mg (nas condições do trato gastrointestinal humano) presente no grão. Esta influência do ácido fítico na bioacessibilidade do magnésio foi, de fato, comprovada na pesquisa desta dissertação, conforme consta nas discussões da seção 4.6.3.

4.6.5.5. Cálcio (Ca)

Alguns estudos que avaliam a bioacessibilidade do cálcio em espécies alimentares já foram publicados [136, 137], mostrando a relevância destas análises, não somente para o Ca, mas para todos os elementos investigados nesta pesquisa de mestrado. Por meio dos resultados presentes na Tabela 15, pode-se observar que para os alimentos mais conhecidos a bioacessibilidade do Ca chega a praticamente 100 % para todos os alimentos (considerando as incertezas), exceto o milho cru; neste último, a bioacessibilidade do Ca foi muito baixa (não ultrapassando 2 %), e este fato pode estar correlacionado ao conteúdo considerável de ácido fítico presente no milho. Para os alimentos menos conhecidos, obteve-se bioacessibilidades do Ca de certo modo consideráveis, tendo o amaranto cru a menor de todas. No que diz respeito ao amaranto, estudos [138, 139] já demonstraram que a bioacessibilidade do Ca em alimentos do gênero *Amaranthus* é muito baixa, tendo isso relação com os conteúdos consideráveis de fitatos e oxalatos (que possuem capacidade complexante) presentes neste gênero de espécies alimentares. No entanto, os dados de bioacessibilidade presentes nestes estudos diziam respeito ao grão cru de amaranto, não considerando a forma cozida do grão que foi analisada na presente pesquisa de mestrado descrita nesta dissertação. Conforme se vê na Tabela 15, na forma cozida do amaranto a bioacessibilidade do Ca é alta (87,6 %), mostrando que, mesmo tendo uma perda inerente de elementos químicos durante o cozimento, o consumo do grão de amaranto cozido é nutricionalmente mais relevante no que diz respeito ao Ca (e, de forma geral, a todos os outros elementos químicos nutrientes presentes no grão) do que a sua forma crua.

Vale ressaltar ainda, com base nos resultados da Tabela 15, que as hortaliças analisadas apresentaram quantidades bioacessíveis de Ca muito maiores do que as dos outros alimentos considerados (alface: 371 ± 8 ; alfavaca: 822 ± 17 ; valores em mg de Ca/100 g de amostra alimentar seca), evidenciando a importância de se consumir hortaliças (como as que foram estudadas neste trabalho) na dieta para suprir as necessidades diárias de Ca.

4.6.5.6. Sódio (Na)

Observando os dados da Tabela 15, evidencia-se que as bioacessibilidades do sódio são, de forma geral, as menores quando comparamos com as bioacessibilidades de todos os outros elementos considerados neste estudo. Este resultado está em concordância com conclusões já expostas na literatura [140]. A bioacessibilidade de sódio é menor para os alimentos provenientes de fontes vegetais, como o são todas as frutas, hortaliças e cereais analisados nesta pesquisa de mestrado. De acordo com WHO [140], a baixa bioacessibilidade de Na pode ser atribuída à presença de outros íons (sobretudo os íons monovalentes, como o K^+) que concorrem com os íons sódio para serem liberados da matriz dos alimentos nas condições do trato gastrointestinal humano.

Dentre os alimentos mais conhecidos, o alface é que apresenta a menor bioacessibilidade de Na; dentre os menos conhecidos, a graviola é que apresenta tal característica. Também é possível evidenciar que, de modo geral, os alimentos menos conhecidos apresentam bioacessibilidades de sódio menores que os mais conhecidos pela população brasileira.

4.6.5.7. Potássio (K)

O potássio é um elemento presente em concentrações consideráveis em praticamente todas as variedades alimentares, mas a sua bioacessibilidade é pouco estudada [56]. Pelos resultados da Tabela 15, pode-se ver que o potássio, ao contrário do sódio, é o elemento químico (dentre todos os elementos considerados neste estudo) que apresentou a maior bioacessibilidade nos alimentos estudados. No trabalho de Reddy et al. (2007) [56], a bioacessibilidade do K também foi a maior dentre os elementos considerados, indicando que o resultado obtido nesta pesquisa de mestrado corrobora com outros estudos de mesmo enfoque. Para os alimentos mais conhecidos, a bioacessibilidade do potássio foi bem próxima de 100 % para todos os alimentos. Para os menos conhecidos, a bioacessibilidade do K também foi alta, mas os valores não chegaram tão próximos a 100 % (considerando as incertezas) como no caso dos

alimentos mais conhecidos, com exceção do cupuaçu e alfavaca. Ressalta-se ainda que a quinoa crua e o amaranto cru são os alimentos (dentre os estudados) cuja bioacessibilidade de K foi a menor.

5. Conclusões

As informações obtidas por meio desta pesquisa de mestrado permitiram a obtenção de muitas conclusões importantes. Evidenciou-se, por meio da composição centesimal dos alimentos, que o amaranto e a quinoa podem ser usados na dieta humana como fontes importantes de proteínas (proteínas vegetais). Considerando as análises realizadas com os cereais, foi possível verificar que o processo de cozimento promove, de modo geral, uma perda apreciável no conteúdo de elementos químicos nutrientes neles presentes; em contrapartida, a porcentagem de bioacessibilidade de qualquer um dos micro e macroelementos estudados nesta pesquisa foi maior nos cereais cozidos do que neles crus, mostrando que o maior aproveitamento do potencial nutritivo dos cereais (no que tange aos elementos químicos contemplados neste estudo) se dá nas suas formas cozidas, que também são mais atraentes ao paladar humano. Ainda sobre os cereais, os resultados da pesquisa indicaram que o amaranto e a quinoa tem a capacidade de fornecer quantidades de micro e macroelementos consideravelmente maiores do que o arroz e o milho (alimentos mais populares na cultura alimentar dos brasileiros), mostrando a viabilidade e a necessidade de uma maior inserção dos cereais menos conhecidos (amaranto e quinoa) na dieta diária da população.

Uma conclusão e constatação importante é que as quantidades totais e bioacessíveis dos macroelementos (Mg, Ca, Na e K) são maiores que as correspondentes quantidades dos microelementos (Fe, Cu e Zn), mostrando que existe um relacionamento entre a quantidade de um determinado elemento químico necessária na dieta diária dos seres humanos, e a quantidade deste mesmo elemento presente nas frutas, hortaliças e cereais analisados na pesquisa de mestrado. Outra constatação obtida com os resultados foi que o macroelemento potássio (K), além de apresentar a maior bioacessibilidade dentre os elementos estudados, está presente em grande quantidade em todos os alimentos analisados, corroborando com os fatos de este elemento ser fundamental no crescimento de qualquer espécie vegetal, e de que todos os alimentos analisados são provenientes direta ou indiretamente de espécies vegetais. Pelos valores da bioacessibilidade, concluí-se ainda que as hortaliças analisadas (alface e alfavaca) são fontes importantes de cálcio para a dieta, possuindo quantidades deste elemento bem maiores do que os outros alimentos considerados. Ao se comparar tipo a tipo os alimentos analisados verificou-se que, na grande maioria dos casos, a quantidade bioacessível dos elementos nos alimentos menos conhecidos é maior ou igual em

relação às correspondentes quantidades presentes nos alimentos mais conhecidos pela população brasileira em geral. Este fato demonstra o potencial nutritivo das frutas, hortaliça e cereais menos conhecidos analisados, abrindo opções para o desenvolvimento de dietas mais saudáveis e que atendam as necessidades nutricionais diárias.

Com respeito a relação existente entre o conteúdo de ácido fítico e as porcentagens de bioacessibilidade mineral, algumas conclusões interessantes puderam ser obtidas. Evidenciou-se, tanto considerando os cereais, as frutas e as hortaliças isoladamente (Figuras 11, 12 e 13), quanto comparando estes tipos de alimentos simultaneamente (Figura 15), e mesmo comparando alimentos diferentes dentro destes tipos, que existe a tendência de que quanto maior o conteúdo de ácido fítico de um alimento, menor a porcentagem de bioacessibilidade mineral (micro e macroelementos). Para os cereais observaram-se algumas contradições a esta tendência, que possibilitaram concluir que a influência do ácido fítico (e seus fitatos) na bioacessibilidade mineral depende das partes dos grãos cereais (pericarpo, endosperma ou gérmen) que alojam as maiores porcentagens do conteúdo total tanto de ácido fítico, quanto dos elementos químicos nutrientes. Pelos gráficos das Figuras 12 e 13 (referentes às frutas e às hortaliças, respectivamente) pôde-se concluir que os fitatos possuem diferentes intensidades de ligação com os cátions dos elementos nutrientes presentes nas frutas e hortaliças; desse modo, a influência dos fitatos na bioacessibilidade é maior para alguns elementos e menor para outros, dependendo da estabilidade dos complexos mineral-fitatos. Comparando tipo a tipo os alimentos menos conhecidos e os mais conhecidos pela população brasileira em geral, constatou-se que mesmo tendo conteúdos de ácido fítico comparáveis aos alimentos mais conhecidos, nos alimentos menos conhecidos esse conteúdo exerce uma influência menor sobre a bioacessibilidade mineral de forma geral, mostrando que os alimentos menos conhecidos estudados possuem um valor nutricional no que tange aos micro e macroelementos comparável e, em alguns casos, até maior do que os alimentos menos conhecidos. Levando em conta que o ácido fítico (e seus fitatos) também pode apresentar benefícios para a saúde, os resultados permitiram concluir que o amaranto e a quinoa são alimentos com notáveis propriedades nutricionais, pois combinam um significativo conteúdo de ácido fítico com boas quantidades bioacessíveis dos micro e macroelementos determinados.

6. Referências

- [1] Nelson, D. L., Cox, M. M., *Lehninger - Princípios de Bioquímica*, 3ª Edição, 2002.
- [2] Mahan, L. K., Escott-Stump, S., *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*, 11ª Edição, 2005.
- [3] Vaitsman, D. S., Dutra, P. B., Afonso, J. C., *Para que servem os elementos químicos*, 2001.
- [4] Wood, R. J., Zheng, J. J., High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1803-1809, 1997.
- [5] Iseri, L. T., French, J. H., Magnesium – nature's physiologic calcium blocker, *American Heart Journal*, 108, 188, 1984.
- [6] Cohn, J. N., Kowey, P. R., Whelton, P. K., Prisant, L. M., New guidelines for potassium replacement in clinical practice - A contemporary review by the national council on potassium in clinical practice, *Archives of Internal Medicine*, 160, 2429-2436, 2000.
- [7] Tucker, K. L., Hannan, M. T., Chen, H. L., Cupples, L. A., Wilson, P. W. F., Kiel, D. P., Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 727-736, 1999.
- [8] Uauy, R., Olivares, M., Gonzalez, M., Essentiality of copper in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 952S-959S, 1998.
- [9] Prasad, A. S., Farid, Z., Sandstead, H. H., Miale, A., Schuler, A. R., *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 537, 1963.
- [10] Claro, R. M., *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 41, nº 4, 12-20, 2007.
- [11] Melo, L. H., *Importância das frutas e hortaliças na promoção da Saúde*, 2007. Disponível na internet em: <http://www.artigonal.com/nutricao-artigos/importancia-das-frutas-e-hortalicas-na-promocao-da-saude-1551323.html>, acesso em 12/07/2010, 16h13min.
- [12] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Banana>, acesso em 21/07/2010, 15h05min.
- [13] <http://www.brasilecola.com/biologia/frutos-pseudofruto.htm>, acesso em 22/07/2010, 20h21min.
- [14] <http://www.suapesquisa.com/frutas/maca.htm>, acesso em 22/07/2010, 20h47min.
- [15] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Alface>, acesso em 24/07/2010, 09h27min.
- [16] http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm, acesso em 24/07/2010, 09h52min.
- [17] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Arroz>, acesso em 24/07/2010, 10h26min.
- [18] Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – UNICAMP, *Tabela brasileira de composição de alimentos*, Versão II, 2ª Ed., 2006.
- [19] <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>, acesso em 24/07/2010, 11h23min.
- [20] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Milho>, acesso em 25/07/2010, 10h47min.

- [21] Venturieri, G. A., Ronchi-Telles, B., Ferraz, I. D. K., Lourde, M., Hamada, N., *Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento*, 108, 1993.
- [22] Rocha Neto, O. G., Oliveira Júnior, R. C., Carvalho, J. E. U., Lameira, O. A., Souza, A. R., Maradiaga J. B. G., *Cupuaçu. Em: Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Centro Nacional de Desenvolvimento Sustentado das Populações Tradicionais, 24-40, 1999.
- [23] Homma, A. K. O., *Cupuaçu: potencialidades e mercado, algumas especulações*, 1996.
- [24] <http://www.amazonlink.org/biopirataria/cupuacu.htm>, acesso em 27/07/2010, 17h18min.
- [25] Souza Gondim, T. M., Thomazini, M. J., Barbosa Cavalcante, M. J., Leite de Souza, J. M., *Aspectos da Produção do Cupuaçu*, Embrapa, 2001.
- [26] Pinto, A. C. Q., Silva, E. M., *A cultura da graviola*, Embrapa, 1995.
- [27] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Graviola>, acesso em 02/08/2010, 20h51min.
- [28] http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/valor_alim.htm, acesso em 02/08/2010, 21h14min.
- [29] <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/manjericao.PDF>, acesso em 03/08/2010, 8h35min.
- [30] <http://www.caras.com.br/edicoes/734/textos/alfavaca/>, acesso em 03/08/2010, 9h01min.
- [31] Escudero, N. L., Arellano, M. L., Luco, J. M., Gimenez, M. S., Mucciarelli, S. I., Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate, *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 15–21, 2004.
- [32] Spehar, C. R., Teixeira, D. L., *Diferenças entre o Pseudocereal Amarantho e Espécies de Planta Daninha, Amaranthaceae*, Comunicado Técnico – Embrapa, 2002.
- [33] Spehar, C. R., *Amaranto: opções para diversificar a agricultura e os alimentos*, Embrapa, 2007.
- [34] <http://g1.globo.com/jornal-hoje/noticia/2010/08/conheca-os-beneficios-do-amaranto.html>, acesso em 04/08/2010, 19h29min.
- [35] <http://www.rugbyspirit.com.br/blogs/blog1.php/2010/02/24/nutricao-amaranto>, acesso em 04/08/2010, 21h25min.
- [36] http://www.fiec.org.br/porta1v2/sites/novidades/home.php?st=inicio&start_date=2009-10-27, acesso em 05/08/2010, 8h21min.
- [37] Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lerida, I., Perez-Galvez, A., In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutrition Research*, 29, 751–760, 2009.
- [38] Fairweather-Tait, S. J., *Bioavailability of nutrients*. Em: Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J., editores. *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London: Academic Press; p. 384-388, 1993.
- [39] Benito, P., Miller, D., Iron absorption and bioavailability: An updated review, *Nutrition Research*, 18, 581-603, 1998.

- [40] Blenford, D., Food and health. The regulatory position, *International Food Ingredients*, 1, 35-38, 1995.
- [41] Schumann, K., Classen, H. G., Hages, M., Prinz-Langenhol, R., Pietrzik, K., Biesalski, H. K., Bioavailability of oral vitamins, minerals, and trace elements in perspective, *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 47, 369-380, 1997.
- [42] Vaisberg, E. A., Lenzi, D., Hansen, R. L., Keon, B. H., Finer, J. T., *Measuring Biological Responses with Automated Microscopy. Methods in Enzymology*, 414, 484-512, 2006.
- [43] Weber, P., Flühmann, B., Eggersdorfer, M., Development of bioactive substances for functional foods to improve health—scientific and other aspects, Em: Heinrich, M., Müller, W., Galli, C., editores, *Local Mediterranean food plants and nutraceuticals*, 59, 171-81, 2006.
- [44] Hamaker, B. R., Rivera, K., Morales, E., Graham, G. G., Measurement of fecal carbohydrate in human metabolic balance studies: Calculated versus determined, *Nutrition Research*, 15, 1095-1098, 1995.
- [45] García-Casal, M. N., Layrisse, M., Peña-Rosas, J. P., Ramírez, J., Leets, I., Matus, P., Iron absorption from elemental iron-fortified Corn Flakes in humans. Role of vitamins A and C1-3, *Nutrition Research*, 23, 451-463, 2003.
- [46] Setchell, K. D. R., Cassidy, A., Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health, *Journal of Nutrition*, 129, 758S-767S, 1999.
- [47] Parker, R. S., Swanson, J. E., You, C.S., Edwards, A. J., Huang T., Bioavailability of carotenoids in human subjects, *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 155-162, 1999.
- [48] Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S, 2000.
- [49] Vatassery, G. T., Krezowski, A. M., Eckfeldt, J. H., Vitamin-E concentrations in human-blood plasma and platelets, *American Journal of Clinical Nutrition*, 37, 1020-1024, 1983.
- [50] Pingali, A., Trumbo, P., Relative bioavailability of B-6 vitamers from cooked ground-beef in humans, *Nutrition Research*, 15, 659-668, 1995.
- [51] Cossack, Z. T., Prasad, A. S., Effect of protein-source on the bioavailability of zinc in human-subjects, *Nutrition Research*, 3, 23-31, 1983.
- [52] Hallberg, L., Bioavailability of dietary iron in man, *Annual review of nutrition*, 1, 123-147, 1981.
- [53] Wittsiepe, J., Schrey, P., Hack, A., Selenka, F., Wilhelm, M., Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag 'Kieselrot', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 263-273, 2001.
- [54] Hunt, J. R., Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets, *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 633S–639S, 2003.

- [55] Barberá, R., Clemente, G., Amaro, M. A., Cámara, F., Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods, *Food Chemistry*, 92, 481-489, 2005.
- [56] Reddy, A. V. R., Rajurkar, N. S., Acharya, R., Kulkarni, S. D., Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method, *Food Chemistry*, 103, 681-688, 2007.
- [57] Camará, F., Amara, M. A., Barberá, R., Lagarda, M. J., Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus, *European Food Research and Technology*, 221, 768-773, 2005.
- [58] Barberá, R., Cilla, A., García-Nebot, M. J., Perales, S., Lagarda, M. J., Farre, R., In vitro bioaccessibility of iron and zinc in fortified fruit beverages, *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1088-1092, 2009.
- [59] Bremner, I., Beattie, J. H., Copper and zinc-metabolism in health and disease-speciation and interactions, *Proceedings of the Nutrition Society*, 54, 489-499, 1995.
- [60] Brigide, P., Canniatti-Brazaca, S. G., Antinutrients and "in vitro" availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*), *Food Chemistry*, 98, 85-89, 2006.
- [61] Vitali, D., Vedrina Dragojević, I., Šebečić, B., Vujić, L., Impact of modifying tea-biscuit composition on phytate levels and iron content and availability, *Food Chemistry*, 102, 82-89, 2007.
- [62] Lönnerdal, B., Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 749-758, 2002.
- [63] Lestienne, I., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., The effects of soaking of whole, dehulled and ground millet and soybean seeds on phytate degradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios, *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 391-399, 2005.
- [64] Lazzari, E. N., *Análise de ácido fítico e minerais nos processos de maceração e cocção de soja*. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Londrina – PR, Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- [65] Raboy, V., Noaman, M. M., Taylor, G. A., Pickett, S.G., Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter-wheat, *Crop Science*, 31, 631-635, 1991.
- [66] Almeida, M. V., Silva, A. D., de Souza, M. V. N., Benício, A. A. A., The phosphoinositide cascade, *Química Nova*, 26(1), 105-111, 2003.
- [67] Lei, X. G., Stahl, C. H., Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 474-481, 2001.
- [68] Raboy, V., myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, *Phytochemistry*, 64, 1033-1043, 2003.

- [69] Sandberg, A.S., Bioavailability of minerals in legumes, *British Journal of Nutrition*, 88, 281-285, 2002.
- [70] O'Toole, D.K., Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production - A review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 363-371, 1999.
- [71] Cheryan, M., Phytic Acid interactions in food systems, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13(4), 297-335, 1980.
- [72] Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K., Salunkle, D. K., *Phytates in cereals and legumes*, CRC Press, 1989.
- [73] Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., Becker, K., Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review, *Food Chemistry*, 120, 945-959, 2010.
- [74] Brune, M., Rossander-Hulthén, L., Hallberg, L., Gleerup, A., Sandberg, A. S., Iron-absorption from bread in humans - inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups, *Journal of Nutrition*, 122, 442-449, 1992.
- [75] Luo, Y., Xie, W., Cui, Q., Effects of phytases and dehulling treatments on in vitro iron and zinc bioavailability in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Flour and Legume Fractions, *Journal of Food Science*, 75(2), 191-198, 2010.
- [76] Liang, J., Han, B.-Z., Nout, M. J. R., Hamer, R. J., In vitro solubility of calcium, iron and zinc in relation to phytic acid levels in rice-based consumer products in China, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 40-51, 2010.
- [77] Arruda, S. F., Marin, A. M. F., Siqueira, E. M. A., Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 177-187, 2009.
- [78] Saha, P. R., Weaver, C. M., Mason, A. C., Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat-flour of various phytate levels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2531-2535, 1994.
- [79] Ellis, R., Reynolds, R. D., Morris, E. R., Moser, P. B., Frazier, C. W., Kelsay, J. L., Phytate-zinc and phytate x calcium-zinc millimolar ratios in self-selected diets of americans, asian indians, and nepalese, *Journal of the American Dietetic Association*, 87, 1043-1047, 1987.
- [80] Harland, B. F., Morris, E. R., Phytate - a good or a bad food component, *Nutrition Research*, 15, 733-754, 1995.
- [81] Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidai-Valverde, C., Tenorio, E., Porres, J., The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56, 283-294, 2000.
- [82] Zhou, J. R., Erdman, J. W., Phytic acid in health and disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 495-508, 1995.

- [83] Morris, E. R., in: Graf, E. (Ed). *Phytic Acid, Chemistry and Applications*, Pilatus Press, Minneapolis, 57-76, 1986.
- [84] Cosgrove, D. J., Chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates, *Reviews of Pure and Applied Chemistry*, 16, 209-215, 1966.
- [85] Couzy, F., Mansourian, R., Labate, A., Guinchard, S., Montagne, D. H., Dirren, H., Effect of dietary phytic acid on zinc absorption in the healthy elderly, as assessed by serum concentration curve tests, *British Journal of Nutrition*, 80, 177-182, 1998.
- [86] Hansen, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells, *Pediatric Research*, 40, 547-552, 1996.
- [87] Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L., Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 240-246, 1999.
- [88] Zhou, J. R., Fordyce, E. J., Raboy, V., Dickinson, D. B., Wong, M. S., Burns, R. A., Erdman, J. W., Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats, *Journal of Nutrition*, 122, 2466-2473, 1992.
- [89] Heubner, W., Stadler, H., A titration method for the determination of phytin, *Biochemische Zeitschrift*, 64, 422-437, 1914.
- [90] Thompson, D. B., Erdman, J. W., Phytic Acid Determination in Soybeans, *Journal of Food Science*, 47, 513-517, 1982.
- [91] Haug, W., Lantzsch, H. J., Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal and products, *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 34, 1423-1426, 1983.
- [92] Fennema, O. R., Parkin, K. L., Damodaran, S., *Química de Alimentos de Fennema*, 4ª edição, Artmed, 2010.
- [93] Instituto Adolfo Lutz, *Métodos físico-químicos para a análise de alimentos*, 4ª Edição, 2005.
- [94] Lombardi-Boccia, G., Aguzzi, M. A., Cappelloni, G. D. L., Content of some trace elements and minerals in the italian total-diet, *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 525-527, 2000.
- [95] Pokorn, D., Stibilj, V., Gregorič, B., Dermelj, M., Štupar, J., Elemental composition (Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Zn, Se, and I) of daily diet samples from some old people's homes in Slovenia, *Journal of Food Composition and Analysis*, 11, 47-53, 1998.
- [96] Miller-Ihli, N. J., Atomic Absorption and Atomic Emission Spectrometry for the determination of the trace element content of selected fruits consumed in the United States, *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 301-311, 1996.
- [97] Plessi, M., Bertellia, D., Monzania, A., Simonettib, M. S., Nerib, A., Damianib, P., Dietary Fiber and Some Elements in Nuts and Wheat Brans, *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 91-96, 1999.

- [98] Tahán, J. E., Sanchez, J. M., Granadillo, V. A., Cubillan, H. S., Romero, R. A., Concentration of total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb, and Zn in commercial canned seafood determined by atomic spectrometric means after mineralization by microwave-heating, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 910-915, 1995.
- [99] Voegborlo, R. B., El-Methnani, A. M., Abedin, M. Z., Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish, *Food Chemistry*, 67, 341-345, 1999.
- [100] Phuong, T. D., Van Chuong, P., Khiem, D. T., Kokot, S., Elemental content of Vietnamese rice - Part 1. Sampling, analysis and comparison with previous studies, *Analyst*, 124, 553-560, 1999.
- [101] Anderson, K. A., *Analytical Techniques for Inorganic Contaminants*, AOAC International, Gaithersburg, Cap. 2, 1999.
- [102] Jackson, K. W., *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, Wiley, Chichester, 1999.
- [103] Tsalev, D. L., Vapor generation or electrothermal atomic absorption spectrometry? Both!, *Spectrochimica Acta, Part B- Atomic Spectroscopy*, 55, 917-933, 2000.
- [104] Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa*, LTC, 6ª edição, 2005.
- [105] Tinggi, U., Reilly, C., Petterson, C., Determination of manganese and chromium in foods by atomic absorption spectrometry after wet digestion, *Food Chemistry*, 60, 123-128, 1997.
- [106] Tripathi, R. M., Mahapatra, S., Raghunath, R., Kumar, A. V., Sadasivan, S., Daily intake of aluminium by adult population of Mumbai, India, *Science of the Total Environment*, 299, 73-77, 2002.
- [107] Larsen, E. H., Andersen, N. L., Moller, A., Petersen, A., Mortensen, G. K., Petersen, J., Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark, *Food Additives and Contaminants*, 19, 33-46, 2002.
- [108] de Togores, M. R., Farré, R., Frigola, A. M., Cadmium and lead in infant cereals - electrothermal-atomic absorption spectroscopic determination, *Science of the Total Environment*, 234, 197-201, 1999.
- [109] <http://pt.foodlexicon.org/p0000190.php>, acesso em 24/09/2011, 10h30min.
- [110] Capar, S. G., & Szefer, P., Determination and Speciation of Trace Elements in Foods. Em S. Ötleş (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (Cap. 6). CRC, 2005.
- [111] Ho Yu, C., Yiin, L.-M., Liou, P. J., The Bioaccessibility of Lead (Pb) from Vacuumed House Dust on Carpets in Urban Residences, *Risk Analysis*, 26(1), 125-134, 2006.
- [112] Gomes, J. C., Silva, M. H. L., Oliveira, C., *Análise de alimentos*, UFV, DTA: FUNARBE, 2003.
- [113] Bressani, R., Amaranth. The nutritive value and potential uses of the grain and by-products, *Food and Nutrition Bulletin*, 10(2), 49-59, 1988.
- [114] Breene, W. M., Food uses of grain amaranth, *Cereal Foods World*, 36(5), 426-429, 1991.

- [115] Teutonico, R. A., Knorr D., Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered crop, *Food Technology*, 39(4), 49-59, 1985.
- [116] <http://www.docstoc.com/docs/38105018/QUINUA---O-Alimento-do-Momento>, acesso em 21/11/201, 13h02min.
- [117] Harland, B. F., Dietary fibre and mineral bioavailability, *Nutrition Research Reviews*, 2, 133-147, 1989.
- [118] Plaami, S., Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effect in nutrition, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 633-647, 1997.
- [119] Paullauf, J., Pietsch, M., Reimbach, G., Dietary phytate reduces magnesium bioavailability in growing rats, *Nutrition Research*, 18, 1029-1037, 1998.
- [120] Reddy, N. R., Sathe, S. K. (Editores), *Food Phytates*, CRC Press, 2002.
- [121] Vohra, P., Gray, G. A., Kratzer, F.H., Phytic acid-metal complexes, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 120(2), 447-454, 1965.
- [122] Widdowson, E. M., McCance, R. A., Mineral metabolism of healthy adults on White and brown bread dietaries, *Journal of Physiology-London*, 101(1), 44-85, 1942.
- [123] Greiner, R., Konietzny, U., Jany K.-D., Phytate - an undesirable constituent of plant-based foods?, *Journal für Ernährungsmedizin*, 8(3), 18-28, 2006.
- [124] Grases, F., March, J. G., Prieto, R. M., Simonet, B. M., Costa-Bauzá, A., García-Raja, A., Conte, A., Urinary phytate in calcium oxalate stones formers and healthy people, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 34, 162-164, 2000.
- [125] Thompson, L. U., Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods, *Food Research International*, 26, 131-149, 1993.
- [126] Kaufman, H. W., Kleinberg, I., Effect of pH on calcium binding by phytic acid and its inositol phosphoric acid derivatives and on the solubility of their calcium salts, *Archives of Oral Biology*, 16, 445-460, 1971.
- [127] Jariwalla, R. J., Sabin, R., Lawson, S., Herman, Z. S., Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate, *Journal of Applied Nutrition*, 42, 18-28, 1990.
- [128] Vucenik, I., Shamsuddin, A. M., Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic., *Journal of Nutrition*, 133, 3778S-3784S, 2003.
- [129] Balaji, T., Acharya, R. N., Nair, A. G. C., Reddy, A. V. R., Rao, K. S., Naidu, G. R. K., Manohar, S. B., Multielement analysis in cereals and pulses by k_0 instrumental neutron activation analysis, *Science of the Total Environment*, 253, 75-79, 2000.
- [130] Rajurkar, N. S., Shah, N. P., Purushottam, J., Simultaneous determination of mineral nutrients in different varieties of wheat and bengalgram in India by INAA, *Applied Radiation and Isotope*, 41, 579-584, 1990.
- [131] House, W. A., Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc, *Field Crop Research*, 60, 115-141, 1999.

- [132] Baker, D. H., Ammerman, C. B., Copper Bioavailability. In C. B. Ammerman, D. H. Baker, A. J. Lewis (Eds.), *Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins* (127-156). New York: Academic Press, 1995.
- [133] Mamatha, K., Gupta, S., Lakshmi, A. J., Prakash, J., Iron bioavailability in green leafy vegetables cooked in different utensils, *Food Chemistry*, 86, 217-222, 2004.
- [134] Tuntawiroon, M., Sritongkul, N., Pleehachinda, R., Suwanik, R., Estimation of available dietary iron, in vitro and in vivo comparisons, *Thai Nuclear Medicine Newsletter*, 4, 46-51, 1998.
- [135] Reimbach, G., Paullauf, J., Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 37-45, 1999.
- [136] Puwastien, P., Kamchan, A., Sirichakwal P. P., Kongkachuichai, R., In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 311-320, 2004.
- [137] Vitali, D., Dragojević, I. V., Šebečić, B., Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: Impact of proteins, phytic acid and polyphenols, *Food Chemistry*, 110, 62-68, 2008.
- [138] Heaney, R. P., Weaver, C. M., Recket, R. R., Calcium absorption from spinach, *American Journal of Clinical Nutrition*, 47, 707-709, 1988.
- [139] Weaver, C. M., Heaney, R. P., Nickel, K. P., Packard, P.I., Calcium bioavailability from high oxalate vegetables: Chinese vegetables, sweet potatoes and rhubarb, *Journal of Food Science*, 62(3), 524-525, 1997.
- [140] World Health Organization (WHO), Trace elements in human nutrition and health, Geneva, 1996.