UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-graduação em Química

MELINA BORGES TEIXEIRA

“Avaliação e especiação do ferro bioacessível em alimentos”

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

MELINA BORGES TEIXEIRA

“Avaliação e especiação do ferro bioacessível em alimentos”

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

Teixeira, Melina Borges.

Avaliação e especiação do ferro bioacessível em alimentos. Ribeirão Preto, 2014.

Número de fl. 84: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: da Veiga, Márcia Andreia Mesquita Silva.

1. Especiação. 2. Ferro . 3. Bioacessibilidade. 4. Alimentos.

Melina Borges Teixeira. **Avaliação e especiação do ferro bioacessível em alimentos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____ **Instituição:**_____

Julgamento:_____ **Assinatura:**_____

Prof.Dr._____ **Instituição:** _____

Julgamento:_____ **Assinatura:**_____

Prof.Dr._____ **Instituição:** _____

Julgamento:_____ **Assinatura:**_____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, em especial, aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo da minha vida acadêmica, onde nesta jornada sempre me ensinaram a lutar pelos meus objetivos e a nunca desistir nos obstáculos da vida; e ao meu namorado Lucas, pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram para que esta etapa pudesse ser concluída, em especial:

- À Deus, pela vida, saúde e fé que me concedeu nestes anos e por ter iluminado meu caminho nos momentos difíceis;
- À minha família (mãe, pai e irmãos) por me ensinarem a ter garra, força e dedicação na minha formação;
- À minha orientadora Prof^a Dra Márcia Andreia Mesquita Silva da Veiga, por ter me orientado durante esses anos. Agradeço pela amizade, por toda ajuda, compreensão e contribuições que tem feito à minha formação acadêmica;
- Ao Lucas, meu namorado e futuro marido, pelo amor, carinho, companheirismo e pela compreensão em todos os momentos de estresse e nervosismo. Te amo muito!
- À Prof.^a Dra Delia Rita Tapia Blácido por fornecer suporte para a realização de algumas análises feitas nesta dissertação;
- À Bianca, por me auxiliar na realização deste trabalho de mestrado;
- À todos os meus colegas de laboratório (Lilian, Natália, Fernanda, Xicó, Inara, Brian, Du, Brenda, Taís, Laís, Aline, Jéssica, Roxane) pelos inúmeros momentos de descontração, pela amizade, troca de conhecimento e sugestões para o trabalho;
- Ao Programa de Pós-graduação da FFCLRP, ao departamento de Química pela oportunidade;
- À Fapesp, processo nº 2012/10518-4, pela bolsa de mestrado concedida.

Muito obrigada.

*“Por vezes sentimos que aquilo fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma
gota.”*

(Madre Teresa de Calcuta)

Lista de tabelas

Tabela 1. Programa de temperatura utilizado para determinação de Cu por ET AAS..	24
Tabela 2. Composição centesimal dos alimentos analisados	34
Tabela 3. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por ET AAS e F AAS na matriz resultante do procedimento de digestão ácida das amostras analisadas	36
Tabela 4. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por ET AAS e F AAS na matriz resultante do ensaio de bioacessibilidade das amostras analisadas	36
Tabela 5. Parâmetros de mérito para o Fe quantificado por F AAS na matriz resultante da digestão ácida do ensaio de bioacessibilidade	37
Tabela 6. Comparação entre os valores experimentais e certificados das quantidades totais dos elementos no material de referência certificado (LUTS-1 – Non-Defatted Lobster Hepatopancreas)	37
Tabela 7. Valores de $t_{\text{calculado}}$ para o teste t.....	38
Tabela 8. Melhores temperaturas de pirólise e atomização para determinação de Cu nas matrizes de digestão total e teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i> empregando a mistura Pd+Mg como modificador químico.....	39
Tabela 9. Quantidades totais e bioacessíveis de ferro determinado nos alimentos analisados	41
Tabela 10. Quantidades totais dos micro e macroelementos determinados nos alimentos analisados	42
Tabela 11. Concentrações bioacessíveis dos macro e micronutrientes obtidas pelo teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i> dos alimentos analisados	43
Tabela 12. Conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados (g de ácido fítico/100 g de amostra alimentar seca)	44
Tabela 13. Concentrações de ferro total, ferro heme (HFe) e porcentagem de ferro heme (%HFe) presentes em amostras de fígado bovino	57

Lista de figuras

- Figura 1.** Estrutura do ferro heme, um ferro quelado encontrado em muitas proteínas como hemoglobina, mioglobina, citocromos e peroxidases (FENNEMA, 2010). 6
- Figura 2.** Estrutura química do ácido fítico: mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato (FENNEMA, 2010). 10
- Figura 3.** Projeção de Haworth mostrando a estrutura possível de um fitato que contém magnésio, zinco, cálcio e ferro quelados. As fitases catalisam a hidrólise dos grupos fosfatos, gerando uma mistura de inositol, fosfatos de inositol, fosfato inorgânico e cátions metálicos livres, alguns dos quais devem permanecer ligados ao ácido fítico parcialmente hidrolisado. Adaptado de (LEI e STAHL, 2001). 11
- Figura 4.** Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução de fonte contínua (HR-CSAAS). No esquema tem-se: (1) lâmpada de arco curto de xenônio; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle; (9) detector CCD (BORGES *et al.*, 2005). ... 17
- Figura 5.** Esquema da técnica da Espectroscopia UV-Vis. (DE FARIAS, 2005) 19
- Figura 6.** Representação esquemática da digestão gastro-intestinal de amostras alimentares para avaliação de bioacessibilidade de elementos químicos. Adaptado de (KULKARNI *et al.*, 2007). 31
- Figura 7.** Curvas de pirólise e atomização para uma solução de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de Cu na matriz de digestão ácida ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$) e do teste de bioacessibilidade *in vitro* (suco gástrico + fluido intestinal). A temperatura de atomização para a curva de pirólise foi de 2100 °C; já a temperatura de pirólise para as curvas de atomização foi de 1200 °C, em ambas utilizou-se o modificador e Pd e Mg. 39
- Figura 8.** Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam o alimento correspondente. A = Feijão, B = Espinafre cru, C = Espinafre cozido, D = Brócolis cru, E = Brócolis cozido, F = Açaí, G = Cupuaçu, H = Caju, I = Melado, J = Beterraba crua, K = Beterraba cozida. 46
- Figura 9.** Concentração total e bioacessível de ferro nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido). 50
- Figura 10.** Concentração total e bioacessível de cálcio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F:

Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido. 53

Figura 11. Concentração total e bioacessível de magnésio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido. 54

Figura 12. Concentração total e bioacessível de potássio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido. 55

Figura 13. Concentração total e bioacessível de cobre nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido. 56

Sumário

1. Introdução	1
1.1) A importância dos nutrientes no metabolismo humano	1
1.1.1) Cálcio (Ca)	2
1.1.2) Potássio (K)	2
1.1.3) Magnésio (Mg)	3
1.1.4) Cobre (Cu)	3
1.1.5) Ferro (Fe)	4
1.2) As diferentes espécies de ferro nos alimentos	6
1.3) Formas de avaliar a bioacessibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos	7
1.4) Fatores antinutricionais em alimentos de origem vegetal	9
1.5) Composição centesimal de alimentos	12
1.6) Espectrometria de absorção atômica	14
1.6.1) Espectrometria de Absorção Atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CSAAS)	16
1.7) Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-vis)	19
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1) Obtenção dos alimentos para as análises	22
3.2) Reagentes e equipamentos	22
3.3) Instrumentação	23
3.4) Preparação das amostras para análises	24
3.5) Determinação da composição centesimal	25

3.5.1) Determinação de umidade	26
3.5.2) Determinação do conteúdo de proteínas	26
3.5.3) Determinação do conteúdo de cinzas.....	27
3.5.4) Determinação de conteúdo de lipídios.....	28
3.5.5) Determinação do conteúdo de carboidratos	29
3.6) Determinação de conteúdo de Ácido Fítico	29
3.7) Digestão ácida das amostras alimentares	29
3.8) Material de referência certificado	31
3.9) Teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>	31
3.10) Determinação de ferro heme	32
3.11) Análise estatística dos resultados	33
4) Resultados e discussão	34
4.1) Composição centesimal dos alimentos.....	34
4.2) Figuras de mérito e exatidão da metodologia de digestão ácida (mineralização) das amostras alimentares.....	36
4.3) Temperaturas ótimas de pirólise e atomização: determinação de Cu por ET AAS	38
4.4) Quantidades totais e bioacessíveis de ferro presentes nos alimentos.....	40
4.5) Quantidades totais dos demais macro e micronutrientes determinados nos alimentos	41
4.6) Quantidades bioacessíveis dos demais macro e micronutrientes determinados nos alimentos.....	42
4.7) Conteúdo de ácido fólico nos alimentos analisados.....	44
4.8) Discussão dos resultados obtidos	45
4.8.1) Influência do conteúdo de ácido fólico nas bioacessibilidades	45
4.8.2) Discussão geral sobre as concentrações totais e bioacessíveis dos nutrientes	49
4.8.2.1) Ferro	49
4.8.2.2) Cálcio.....	52

4.8.2.3) Magnésio	53
4.8.2.4) Potássio.....	54
4.8.2.5) Cobre	55
4.9) Determinação de ferro heme nas amostras de fígado bovino.....	57
5) Conclusões	59
6) Referências Bibliográficas.....	61

RESUMO

O ferro é um nutriente essencial para quase todas as espécies vivas e desempenha muitos papéis essenciais nos sistemas biológicos, como transporte de oxigênio, respiração, metabolismo energético, destruição de peróxidos e síntese de DNA. A deficiência de ferro no organismo pode acarretar diversas desordens fisiológicas, como por exemplo, a anemia ferropriva, que está relacionada com os níveis de hemoglobinas no sangue. Uma das maneiras de se obter as necessidades diárias desse nutriente e, dessa forma evitar as desordens fisiológicas ocasionadas pela deficiência do mesmo, é o consumo de frutas, hortaliças e carnes na dieta, uma vez que esses alimentos são ricos nesse elemento. Dessa forma, foram feitas determinações para avaliar as quantidades totais e a bioacessibilidade (através de métodos *in vitro*) de ferro, e de outros macro e micronutrientes, em diferentes tipos de alimentos. Além disso, visando buscar correlações com os resultados obtidos, a composição centesimal e o conteúdo de ácido fítico dos alimentos analisados também foram determinados. A concentração de ferro heme foi determinada para as amostras de fígado bovino. As quantidades totais e bioacessíveis dos elementos permitiram constatar que dentre todos os alimentos analisados, o espinafre foi o alimento que apresentou a maior quantidade de ferro total, porém verificou-se que a bioacessibilidade deste nutriente é muito baixa, sendo inferior a 20%. Isto pode estar relacionado ao elevado teor de oxalatos e fitatos (que possuem capacidade complexante) presente neste tipo de alimento. Ainda com relação a bioacessibilidade deste nutriente, o fígado bovino cru foi o alimento que apresentou a maior quantidade de ferro bioacessível. Porém, quando o mesmo é submetido ao processo de cocção, o valor da bioacessibilidade deste nutriente diminui consideravelmente, o que está correlacionado com a quebra do complexo de ferro heme presente em maior parte neste alimento, transformando-se em ferro iônico, que possui uma menor biodisponibilidade no organismo humano, pois é absorvido de forma menos eficaz que o ferro heme. Além disso, com relação aos alimentos de origem vegetal, os resultados mostraram que o potássio (K) possui as maiores quantidades totais e bioacessíveis para os alimentos analisados, resultado que se encontra em concordância com o fato deste elemento ser fundamental no crescimento de qualquer espécie vegetal. A determinação do conteúdo de ácido fítico (fitatos) permitiu evidenciar que os mesmos possuem diferentes intensidades de ligação com os cátions dos nutrientes presentes nos alimentos avaliados, e desse modo a influência dos fitatos na bioacessibilidade dos

elementos analisados é maior para alguns e menor para outros, dependendo da estabilidade dos complexos formados entre os minerais e os fitatos. As concentrações de ferro heme obtidas para as amostras de fígado bovino demonstraram que o aquecimento provoca uma diminuição considerável na porcentagem de ferro heme presentes nas amostras, variando entre 33 e 43 %. Esta diminuição está relacionada à clivagem oxidativa do anel porfirínico em que o Fe está coordenado, e essa redução é relativamente alta uma vez que a liberação do ferro do complexo heme só ocorre em temperaturas elevadas, de 85 a 100 °C.

Palavras chave: alimentos, ferro, bioacessibilidade, especiação.

ABSTRACT

Iron is an essential nutrient for almost all living species and plays essential roles in many biological systems, such as oxygen transport, respiration, energy metabolism, destruction of peroxides, and DNA synthesis. Iron deficiency in the body may cause various physiological disorders, such as anemia, which is related to hemoglobin levels in blood. One way to obtain the daily requirement of this nutrient and thus avoid the physiological disorders caused by its deficiency is to ingest fruits, vegetables, and meat, because they are rich in this element. This work evaluated the bioaccessibility (by *in vitro* methods) and the total amounts of iron and other macro and micronutrients in different types of food. Seeking correlations with the results, the percent composition and phytic acid content of the analyzed foods were also determined, and the concentration of heme iron in samples of bovine liver was analyzed. The total and bioaccessible amounts of elements allowed to observe that among all foods, spinach contained the highest amount of total iron, but the bioaccessibility of this nutrient was low, below 20%, probably due to the high levels of oxalates and phytates (which have complexing capacity) in this type of food. Still regarding the bioaccessibility of this nutrient, bovine liver was the food with the highest amount of bioaccessible iron. However, cooking considerably reduced bioaccessibility of this nutrient. This decrease is correlated with the breakdown of the heme iron complex present in bovine liver, which generated the less bioavailable and the less efficiently absorbed ionic iron. Concerning plant species, the results showed that potassium (K) had the highest total and bioaccessible amounts for the analyzed foods, a result that agreed with the fact that this element is essential for the growth of any kind of vegetable. Determination of phytic acid (phytates) content showed that they correlated with the cations of the nutrients in the tasted foods differently; i. e., phytates affected the bioaccessibility of the analyzed elements to different degrees, depending on the stability of the complexes formed between the minerals present in a given food and phytic acid. The heme iron

concentrations in bovine liver samples revealed that heating significantly lowered the percentage of heme iron present in the samples, which ranged from 33 to 43%. This decrease was related to the oxidative cleavage of the porphyrin ring. The reduction in heme iron was relatively large, since the release of heme iron complex only occurs at elevated temperatures from 85 to 100 ° C.

Keywords: food, iron, bioaccessibility, speciation.

1. Introdução

1.1) A importância dos nutrientes no metabolismo humano

O metabolismo pode ser definido como uma atividade celular altamente coordenada na qual diversos sistemas multienzimáticos atuam conjuntamente visando a algumas funções básicas, necessárias à manutenção da vida (LEHNINGER *et al.*, 2005). No metabolismo os elementos químicos consumidos na dieta humana são de especial importância, estando envolvidos como cofatores de enzimas, equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas, biossinalização, constituintes de biomoléculas importantes para o organismo, dentre outros.

Os minerais ingeridos na dieta podem ser classificados como macrominerais e microminerais. Os macrominerais são aqueles que precisam estar em quantidades consideráveis no organismo humano para ter uma vida saudável, neste grupo inserem-se o cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+), potássio (K^+) e magnésio (Mg^{2+}). Os micronutrientes, também conhecidos como elementos traço, são requeridos em menor quantidade que os macronutrientes, porém possuem grande importância para o organismo humano. Dentre eles pode-se citar o ferro ($\text{Fe}^{2+/3+}$), cobre (Cu^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}).

Um dos exemplos mais típicos do emprego do macronutrientes no equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas é a bomba de sódio e potássio. Em toda célula animal, 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 ATPase Na^+K^+ . Desse modo, para manter esse sistema de transporte primário ativo funcionando corretamente é fundamental manter os níveis de Na^+ e K^+ adequados no organismo humano.

A importância dos micronutrientes para o organismo humano está relacionada com as proteínas conjugadas conhecidas como metaloproteínas. Esse tipo de proteína possui como grupo prostético um ou mais íons metálicos ligados na sua estrutura, seja diretamente ligado à cadeia polipeptídica, seja inseridos numa molécula não proteica covalentemente ligada à cadeia polipeptídica. Como exemplo de metaloproteína é a álcool desidrogenase, cujo grupo prostético é o cátion do elemento Zn. A hemoglobina, proteína carreadora do oxigênio do plasma sanguíneo, é um exemplo de uma hemoproteína que tem como grupo prostético o grupo Heme, uma estrutura porfirínica

contendo um íon Fe^{2+} . 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 (LEHNINGER *et al.*, 2005).

A seguir descrevem-se mais detalhadamente as características de cada macro e micronutrientes analisados nesta dissertação de mestrado, dando ênfase na atuação dos mesmos no metabolismo humano, bem como as fontes alimentares nas quais eles podem ser adquiridos na dieta.

1.1.1) Cálcio (Ca)

Além da sua função estrutural, o cálcio desempenha importantes funções reguladoras em numerosos processos bioquímicos e fisiológicos de plantas e animais. Por exemplo, o cálcio está envolvido em fotossíntese, fosforilação oxidativa, coagulação sanguínea, contração muscular, divisão celular, transmissão de impulsos nervosos, atividade enzimática, função da membrana celular, adesão intercelular e secreção hormonal. Seus diversos papéis em células vivas estão relacionados à sua capacidade de formar complexos com proteínas, carboidratos e lipídeos.

Os níveis de ingestão adequada de cálcio variam de 210 mg/dia para lactentes a 1300 mg/dia para adolescentes, mulheres grávidas e lactantes. As baixas ingestões de cálcio contribuem para a ocorrência de várias doenças crônicas, incluindo osteoporose, hipertensão e algumas formas de câncer (FENNEMA, 2010).

No que se diz respeito às fontes alimentares de cálcio, o leite e outros produtos lácteos são fontes excelentes deste nutriente. No entanto, em alguns países, o consumo de leite é limitado devido aos efeitos indesejados da intolerância à lactose. Com isso, folhas verdes como a couve, folhas de mostarda e brócolis, além de algumas sementes e legumes são considerados fontes alternativas de cálcio (KAMCHAN *et al.*, 2004).

1.1.2) Potássio (K)

O potássio é o terceiro mineral mais abundante no corpo humano sendo um nutriente essencial na dieta. O seu cátion, K^+ , é o principal componente do fluido

intracelular, e está presente em pequenas quantidades no fluido extracelular. Esta situação é mantida pelas bombas sódio-potássio localizadas na membrana plasmática das células humanas.

As funções desse mineral no corpo humano incluem a regulação da pressão osmótica, manutenção do equilíbrio hídrico e equilíbrio ácido-base, condução do impulso nervoso, contração muscular e reações enzimáticas (MILLER, 1995).

As principais fontes de potássio na alimentação humana são as frutas, hortaliças, carnes frescas e produtos de laticínio. As necessidades mínimas deste nutriente para adultos estão entre 1600 a 2000 mg por dia. A deficiência de potássio é rara, pois as ingestões diárias são quase sempre maiores que as necessidades do corpo humano (FENNEMA, 2010).

1.1.3) Magnésio (Mg)

O magnésio está envolvido em uma ampla variedade de reações biológicas fundamentais. Este nutriente é essencial para a fosforilação oxidativa, metabolismo de nutrientes e contração muscular. O magnésio desempenha um papel importantíssimo na transmissão e atividade neuromuscular, além disso, o cátion magnésio (Mg^{2+}) é um cofator para mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo de componentes alimentares.

No organismo humano, aproximadamente 60 % do magnésio presente está localizado nos ossos, 26 % nos músculos e o restante nos tecidos moles e fluidos corporais (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2008).

Excelentes fontes de magnésio para a dieta humana incluem as nozes, sementes, os legumes e grãos não moídos, assim como hortaliças de folhas verde-escuras, uma vez que o magnésio é um constituinte essencial da clorofila. Mesmo sendo muito rara, a deficiência grave de magnésio gera sintomas como tremores, espasmos musculares, náusea, vômito, salivagem excessiva e convulsões (HENRY e BENZ, 1995).

1.1.4) Cobre (Cu)

O cobre é um metal de transição que possui três estados de oxidação: Cu^0 , Cu^+ , Cu^{2+} , sendo esta última a forma mais encontrada em sistemas biológicos (UAUY *et al.*,

1998). Este nutriente participa de vários processos metabólicos, sendo um constituinte de diversas enzimas do organismo. As mais conhecidas são: a superóxido dismutase (SOD) que auxilia o organismo na defesa contra os radicais livres, a tirosinase e a dopamina β hidroxilase. Além disso, o cobre é indispensável na absorção de ferro, na síntese da hemoglobina, na manutenção da saúde óssea e do sistema nervoso central. Estes exemplos evidenciam que o cobre no organismo humano está, em sua maioria, associado a proteínas que desempenham diversas funções.

As principais fontes alimentícias deste nutriente incluem os frutos do mar, vísceras (fígado, rim), carne de músculos, chocolate, nozes, grãos de cereais, leguminosas e frutas secas.

A deficiência de cobre pode ocasionar os seguintes distúrbios e doenças no organismo: anemia microcítica hipocrômica (hemácias pequenas e descoradas), edema, defeitos na estrutura óssea e despigmentação do cabelo e pele. O excesso de cobre pode se acumular no sangue e causar oxidação da vitamina A, diminuição da vitamina C, causar dores musculares e nas juntas, distúrbios no aprendizado, depressão e fadiga.

1.1.5) Ferro (Fe)

Dentre os elementos essenciais ao organismo encontra-se o ferro, que desempenha um papel ativo no metabolismo, como transporte de oxigênio, respiração e metabolismo energético, destruição de peróxido de hidrogênio e síntese de DNA. O metabolismo do ferro é complexo porque este elemento está envolvido em muitos aspectos da vida, inclusive na função das hemácias e na atividade da mioglobina. O ferro possui um papel importante na respiração humana, auxiliando o transporte de oxigênio e dióxido de carbono no sangue. É um componente ativo dos citocromos envolvidos no processo de respiração celular e geração de energia (ATP).

O envolvimento do ferro em muitas dessas reações metabólicas depende de sua capacidade de aceitar ou doar elétrons. Sabe-se que o ferro na forma livre pode ser tóxico para células vivas devido à geração de espécies de oxigênio ativado, que podem provocar oxidação lipídica ou ataque as proteínas ou moléculas de DNA. Para evitar as consequências tóxicas do ferro, as células vivas têm um mecanismo de armazenamento

extra de ferro intracelular, em uma forma não tóxica. Neste caso, o ferro é capturado no interior de uma proteína globular oca chamada de apoferritina (FENNEMA, 2010).

Apesar de sua abundância no ambiente, a deficiência de ferro em seres humanos, alguns animais e plantas cultivadas em certos solos é um problema em grande escala. Essa alta prevalência da deficiência nutricional de um nutriente presente em abundância no ambiente pode ser explicada pelo comportamento do ferro em soluções aquosas. Seu estado de oxidação é +2 (ferroso) e +3 (férico) e em soluções aquosas, sob condições redutoras, a forma predominante é a de ferroso, que é bastante solúvel em água, em pHs fisiológicos. Na presença de oxigênio molecular, no entanto, o Fe^{2+} aquoso pode reagir com o oxigênio molecular, formando Fe^{3+} e o ânion superóxido:

O Fe^{3+} hidratado então passará por hidrólise progressiva, a fim de gerar o aumento de espécies de hidróxido férrico:

Como esta reação de hidrólise ocorre com facilidade, exceto em pHs muito baixos, a concentração de íons férricos livres não ligados a sistemas aquosos é mínima. A predominância da baixa solubilidade das formas de ferro explica sua pouca disposição (FENNEMA, 2010).

As principais fontes de ferro para o organismo humano são as carnes vermelhas, principalmente o fígado bovino, seguido por frutos do mar e aves. As leguminosas e as hortaliças são as melhores fontes vegetais. Alguns outros alimentos que fornecem ferro são gemas de ovos, frutas e cereais.

Devido a participação do ferro em variados processos e funções no organismo humano, sua deficiência gera desordens e disfunções como, por exemplo, anemias e processos similares que já aparecem como problema nutricional mais frequente do mundo, afetando em torno de 24% da população (RÍOS-CASTILLO *et al.*, 2014). Estudos recentes da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, WHO), mostram que em países em desenvolvimento, 47% das mulheres em idade reprodutiva são pelo menos ligeiramente anêmicas. Os principais sintomas do indivíduo anêmico são: fraqueza, indisposição, fadiga generalizada, falta de apetite e palidez da pele.

1.2) As diferentes espécies de ferro nos alimentos

A “International Union for Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) definiu *especação* como sendo a ocorrência de um elemento em diferentes formas em um sistema, onde a soma dessas diferentes formas físico-químicas será igual a concentração total desse elemento (MOREIRA e MOREIRA, 2004). A bioacessibilidade, toxicidade e mobilidade dos íons metálicos estão diretamente ligadas a sua especificação.

A ingestão total de ferro, a composição da dieta e o estado do ferro consumido desempenham um papel determinante na quantidade deste nutriente que será absorvida. As espécies de ferro nos alimentos podem ser agrupadas tanto como heme como não heme. O ferro heme encontra-se coordenado ao centro de um anel de porfirina (Figura 1), não se dissociando desse ligante até que seja absorvido por células epiteliais intestinais (FENNEMA, 2010).

Figura 1. Estrutura do ferro heme, um ferro quelado encontrado em muitas proteínas como hemoglobina, mioglobina, citocromos e peroxidases (FENNEMA, 2010).

O ferro heme ocorre na maioria das vezes com hemoglobina ou mioglobina e quanto ao estado de oxidação deste íon de ferro pode-se ter dois tipos de hemoglobina: a ferro-hemoglobina (que contém o íon ferroso, Fe^{+2}) e a ferri-hemoglobina (que contém o íon férrico, Fe^{+3}). Somente a ferro-hemoglobina (Fe^{+2}) possui a capacidade de se ligar ao oxigênio, promovendo seu transporte pela corrente sanguínea (FENNEMA, 2010).

A biodisponibilidade do ferro heme é relativamente inalterada pela composição da dieta, sendo muito maior que a do ferro não heme. Dentre as fontes alimentícias de ferro heme destacam-se as carnes, aves e peixes. Os processos térmicos que as carnes são submetidas representam um importante fator que aumenta a variabilidade do ferro heme contido na carne. O ferro heme é convertido, em diferentes graus, em ferro não heme, e essas mudanças na razão ferro heme/não heme podem determinar as mudanças na biodisponibilidade de ferro da dieta (LOMBARDI-BOCCIA, G. *et al.*, 2002).

A maior parte do teor do ferro nos alimentos vegetais e cerca de 40-60 % do ferro nos tecidos animais encontra-se na forma de ferro não heme. Essa forma de ferro está ligada a proteínas, mas também pode ser complexado com citrato, fitato, oxalato, polifenóis e outros ligantes. O ferro não heme pode ser encontrado nos alimentos na forma de Fe (II) ou Fe (III), sendo a disponibilidade da primeira forma maior do que a de Fe (III), pois este é menos solúvel no lúmen intestinal.

Ao contrário do ferro heme, a absorção do ferro não heme pode ser afetada por compostos lançados a partir de alimentos durante a digestão, que agem como potencializadores, como por exemplo, a carne bovina, aves, peixes, ácido ascórbico e EDTA, ou como inibidores, que é o caso dos polifenóis (taninos, leguminosas, sorgo), fitatos, algumas proteínas vegetais e fosfatos (FENNEMA, 2010).

Diversos trabalhos encontrados na literatura mostram que o cozimento, congelamento, armazenamento e o ciclo de congelamento e descongelamento dos alimentos diminuem consideravelmente o conteúdo de ferro heme e aumentam a quantidade de ferro não heme (SCHRICKER e MILLER, 1983; CHEN *et al.*, 1984; GOMEZ-BASAURI e REGENSTEIN, 1992a; b; HAN *et al.*, 1993; BENJAKUL e BAUER, 2001; LOMBARDI-BOCCIA, G. *et al.*, 2002).

1.3) Formas de avaliar a bioacessibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos

Para a caracterização das propriedades nutricionais dos alimentos, no que diz respeito aos micro e macroelementos, normalmente as informações encontradas refere-se às concentrações totais destes nutrientes (KHOUZAM *et al.*, 2011) e com isso, muitas vezes é negligenciado o fato de que nem toda a quantidade de um determinado nutriente presente em um alimento é liberado para uma possível absorção no intestino humano. Apenas uma parcela dos nutrientes do alimento é aproveitada pelo metabolismo, sendo o restante liberado nas excretas (urina e fezes). Para se entender o

motivo de tal fato é necessária a introdução dos conceitos de biodisponibilidade e bioacessibilidade.

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 (FAIRWEATHER-TAIT, 1993). Isto é, somente certas quantidades de todos os nutrientes de um alimento serão usadas efetivamente pelo organismo em processos metabólicos. 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 (BENITO e MILLER, 1998).

A bioacessibilidade refere-se à quantidade de um determinado nutriente presente em um alimento 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. 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.

A bioacessibilidade de um nutriente em um determinado alimento pode ser estimada basicamente de dois modos: usando testes *in vivo*, ou usando testes *in vitro*. Os testes *in vivo* consistem em administrar a uma cobaia (por exemplo, um rato) certa quantidade do elemento mineral (ou dos elementos) em estudo e monitorar, depois de decorrido o tempo da digestão, a quantidade de tal elemento no sangue (AMMERMAN, 1995). Os testes *in vivo*, pelas suas características, requerem infraestrutura e pessoal especializado, demandam tempo e são caros. Para superar essas limitações, vários ensaios de bioacessibilidade ou testes *in vitro*, executados em condições que tentam simular as condições físico-químicas do trato gastrointestinal humano foram propostos.

Os testes de bioacessibilidade *in vitro* baseiam-se na fisiologia do trato gastrointestinal e simulam as condições da digestão humana (INTAWONGSE e DEAN, 2006). Nesta técnica, um método gastrointestinal *in vitro* é aplicado sobre a amostra alimentar, imitando as condições fisiológicas que ocorrem durante a digestão humana. No lugar da saliva e dos sucos gástricos e duodenal naturais, são usadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos,

principalmente a ação enzimática na boca, no estômago e no intestino, e condições de temperatura e pH. Após esta simulação, a solução resultante é destinada à quantificação do nutriente de interesse, permitindo assim avaliar a sua bioacessibilidade.

Dessa forma, a fim de se aprofundar na caracterização nutricional de diversos tipos de alimentos no que diz respeito a quantidade dos macro e micronutrientes, é necessário, além da determinação das quantidades totais destes nutrientes, estudos de bioacessibilidade para se estimar a quantidade deste 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.

Estudos recentes mostraram o potencial nutritivo, a funcionalidade e a bioacessibilidade de minerais como Ca, Fe, e Zn em diferentes componentes de sementes de melão (JYOTHI LAKSHMI e KAUL, 2011). Em outro trabalho de 2011, os autores avaliaram a bioacessibilidade *in vitro* de cinco diferentes nutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn e Mo) em alimentos da dieta libanesa, incluindo pães, frutas, vegetais e queijo branco, visando avaliar a contribuição destes nutrientes na dose diária recomendada dos elementos para o organismo humano (KHOUZAM *et al.*, 2011).

Em um trabalho publicado em 2012 os autores determinaram através da simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, a quantidade de Se, Cu, Zn, Mn e Fe em diferentes cortes de carnes antes e depois da maturação, com o intuito de demonstrar o potencial biológico de cada um desses minerais contidos em alimentos como a carne (RAMOS *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou o potencial nutritivo de amêijoas como fonte de ferro para o organismo humano através da determinação de ferro total, ferro heme e biodisponibilidade de ferro utilizando testes *in vitro* (LAI *et al.*, 2012). Para abordar a importância das informações nutricionais sobre os alimentos infantis no Brasil, outro estudo avaliou a fração bioacessível de Fe, Zn, Cu e Mn em comida de bebê (DO NASCIMENTO DA SILVA *et al.*, 2013).

1.4) Fatores antinutricionais em alimentos de origem vegetal

A biodisponibilidade de nutrientes minerais varia entre menos de 1 % para algumas formas de ferro e mais de 90 % para sódio e potássio. As razões da extensão dessa faixa são variadas e complexas, pois muitos fatores interagem a fim de determinar a biodisponibilidade final dos nutrientes. Um dos fatores mais importantes é a

solubilidade do mineral no conteúdo do intestino delgado, uma vez que compostos insolúveis não podem difundir-se para as membranas dos enterócitos e, conseqüentemente, não podem ser absorvidos. Por esse motivo, muitos dos fatores que melhoram e inibem a biodisponibilidade parecem operar por meio de efeitos sobre a solubilidade dos minerais.

Dentre os inibidores da biodisponibilidade dos minerais, destacam-se o ácido fítico, os compostos polifenólicos, ácido oxálico e os taninos, dentre os quais, o ácido fítico tem papel de destaque.

Na classe dos fitatos, o ácido fítico está entre os fatores mais importantes da dieta, limitando a biodisponibilidade de minerais (HURRELL, 2004). O ácido fítico e seus complexos de minerais (fitatos) são as principais formas de armazenamento de fósforo em sementes. O ácido fítico *mi*oinositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato (Figura 2) contém seis grupos fosfatos esterificados para o inositol, e é o único que apresenta atividade metabólica no organismo humano, sendo um importante constituinte celular atuando em diferentes processos químicos (RABOY *et al.*, 1991).

Figura 2. Estrutura química do ácido fítico: *mi*oinositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato (FENNEMA, 2010).

Esses grupos fosfatos são ionizados rapidamente em pH fisiológico, por isso, o ácido fítico é um potente quelante de cátions, em especial minerais di- e trivalentes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} (LEI e STAHL, 2001). Os minerais ligados a esses

quelatos têm baixa biodisponibilidade, por isso, os fitatos costumam ser reconhecidos como fatores antinutricionais.

Além disso, para a sua função já bem estabelecida de armazenamento de fósforo nas células vegetais, o ácido fítico e seus derivados atuam em diversas funções metabólicas, incluindo transdução de sinais, e possivelmente, ATP, exportação de RNA, reparação e recombinação de DNA (RABOY, 2003). O ácido fítico é hidrolisado com rapidez por enzimas conhecidas como fitases. A hidrólise parcial gera uma mistura de fosfatos de inositol, dependendo do número de grupos fosfatos liberados (Figura 3). O ácido fítico e seus vários produtos de hidrólise são chamados de IP6, IP5, IP4 e assim por diante, indicando-se o número de grupos fosfatos esterificados ao agrupamento inositol. O efeito inibitório do ácido fítico sobre a absorção mineral é reduzido pela hidrólise, mas evidências sugerem que IP5, IP4 e IP3, bem como IP6, podem inibir a absorção de ferro (SANDBERG, 2002). Além disso, a fitase está presente somente em plantas e microorganismos (KUMAR *et al.*, 2010) o que ressalta a relevância antinutricional que os fitatos desempenham, sobretudo, no que se diz respeito à bioacessibilidade dos elementos químicos.

Figura 3. Projeção de Haworth mostrando a estrutura possível de um fitato que contém magnésio, zinco, cálcio e ferro quelados. As fitases catalisam a hidrólise dos grupos fosfatos, gerando uma mistura de inositol, fosfatos de inositol, fosfato inorgânico e cátions metálicos livres, alguns dos quais devem permanecer ligados ao ácido fítico parcialmente hidrolisado. Adaptado de (LEI e STAHL, 2001).

Em virtude da existência de muitas evidências consistentes que sustentam a hipótese de que o ácido fítico reduz a biodisponibilidade de diversos minerais essenciais, é razoável deduzir que a redução das concentrações de fitato em alimentos melhorará a biodisponibilidade mineral. Isso tem motivado esforços de agricultores em selecionar variedades com baixo teor de fitato para cultura de cereais e leguminosas como uma estratégia para a redução da prevalência de traços de má nutrição mineral (RABOY, 2001).

Muitos trabalhos descreveram o efeito negativo dos fitatos sobre a bioacessibilidade (e biodisponibilidade) de elementos químicos essenciais em alimentos. Dentre eles, estudos em humanos mostraram que os fitatos possuem um forte efeito inibitório na absorção de ferro não heme (BRUNE *et al.*, 1992). Já foi demonstrado que os fitatos reduzem a absorção de Ca^{2+} , porém essa inibição é menos pronunciada que a redução de Zn^{2+} e $\text{Fe}^{2+/3+}$ no organismo humano (LOPEZ *et al.*, 2002).

Os estudos que relacionam o pH das soluções com a estabilidade e a solubilidade dos complexos são muito importantes pois as mesmas são dependentes dos valores de pH do meio, do cátion individual, da razão molar entre os fitatos e os cátions e a presença de outros componentes na solução (OBERLEAS, 1983). O pH é um fator importante que influencia a solubilidade dos fitatos, onde o mesmo é mais solúvel em pHs menores do que em pHs maiores (TORRE *et al.*, 1991). Os complexos de Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , e Zn^{2+} tendem a ser mais solúveis em pHs menores que 4,0 – 5,0, enquanto o complexo Mg-fitato é solúvel em meio ácido com pH até 7,5 (BROWN *et al.*, 1961). Em contraste, o fitato férrico é insolúvel em uma faixa de pH que varia entre 1,0 – 3,5, quando a relação entre Fe^{3+} e fitato é equimolar, sendo que a solubilidade aumenta em pHs maiores que 4,0 (ASKAR *et al.*, 1983).

1.5) Composição centesimal de alimentos

A composição centesimal de um alimento está relacionada com a porcentagem em massa de seus componentes principais, que são: água, proteínas, cinzas, lipídios e carboidratos; sendo que ela é determinada considerando que o alimento é constituído apenas por estes componentes e, dessa forma, a soma das porcentagens dos mesmos totaliza 100%.

Dentre os componentes principais de um alimento, a água é considerada um componente fundamental, pois é nela que ocorrem os processos metabólicos do organismo humano (FENNEMA, 2010). Na composição centesimal de um alimento a quantidade de água presente no mesmo é referida como o teor de umidade, que pode ser classificada em umidade de superfície, que se refere a água livre ou presente na superfície externa do alimento e é facilmente evaporada, e a umidade adsorvida, referente a água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo (LUTZ, 2005). A umidade pode ser determinada secando o alimento de estudo e em seguida medindo indiretamente a massa de água perdida durante este processo.

As proteínas são polímeros complexos, compostos por 21 aminoácidos distintos e diferem-se de acordo com os tipos, quantidades e modos de encadeamento dos mesmos (FENNEMA, 2010). Nos alimentos, as propriedades funcionais das proteínas estão relacionadas às suas características estruturais e físico-químicas, logo elas se tornam nutricionalmente importantes, pois são fontes de aminoácidos essenciais. A determinação de proteína em um alimento baseia-se na medida do teor de nitrogênio que é feita, geralmente, pelo processo de digestão Kjeldahl.

As cinzas de um determinado alimento é o nome dado ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, entre 550 - 570°C, a qual é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, assim sendo, a cinza de um material é o ponto de partida para a análise de minerais específicos, pois fornece uma indicação da quantidade total de elementos químicos presentes em um dado alimento. É importante ressaltar que nem sempre o resíduo inorgânico 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 (LUTZ, 2005)

Os lipídios desempenham um papel importante na qualidade dos alimentos, pois contribuem com vários atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica (FENNEMA, 2010). 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 e solúveis em solventes orgânicos, tais como éter, clorofórmio, acetona, dentre outros. No caso de alimentos, nem sempre é possível extrair diretamente a gordura. Se a amostra for úmida é necessário realizar uma secagem, pois a água impede a penetração total do solvente. Quando os lipídeos se encontram ligados a proteínas ou açúcares, faz-se necessário uma

hidrólise prévia, como no método de Gerber. Em alguns casos, em vez de combinação de hidrólise e extração, é suficiente tratar a amostra com uma mistura de clorofórmio e metanol (Método de Bligh-Dyer). Para amostras que podem ser extraídas diretamente são usados equipamentos que realizam a extração por solvente como o aparelho de Soxhlet (extração intermitente). O extrato obtido diretamente sem tratamento prévio pode conter, além da gordura, quantidades pequenas de ceras, resinas, esteróis e carotenoides. A escolha do método para extração de lipídeos depende do material a ser analisado e da natureza das subsequentes análises a serem feitas neste extrato lipídico (BLIGH e DYER, 1959).

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza, são formados por carbono, hidrogênio e oxigênio, com fórmula geral de $[C(H_2O)]_n$ daí o nome “carboidrato”, ou “hidratos de carbono”. São moléculas que desempenham uma ampla variedade de funções, dentre elas, fonte de energia, reserva de energia e estrutural. Nos alimentos, os carboidratos apresentam-se na forma de diferentes substâncias, tais como glicose, sacarose, frutose, lactose, dentre outros (FENNEMA, 2010). Existem procedimentos específicos para determinação de alguns desses carboidratos, no entanto, para fins de determinação centesimal de alimentos, o teor de carboidratos é geralmente obtido pela diferença, subtraindo de 100%, a soma das porcentagens de umidade, proteínas, cinzas e lipídios.

1.6) Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) é uma técnica em que o princípio fundamental consiste na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação, por átomos gasosos no estado fundamental (SKOOG *et al.*, 2007).

Para que o analito seja convertido na forma gasosa e fundamental são utilizados os atomizadores. Existem dois meios de se obter esta condição: térmica ou quimicamente, sendo a primeira a mais utilizada. A atomização, neste caso, se dá ao aplicar altas temperaturas (por chama ou aquecimento eletrotérmico) em seu analito de forma a volatilizá-lo, sem ionizá-lo, para que então a nuvem atômica formada absorva a radiação que por ela incide, de forma que a diferença da radiação incidente e da radiação absorvida é proporcional a concentração do analito (WELZ e SPERLING, 2008).

Na técnica da espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) ocorrem basicamente os seguintes eventos: uma solução da amostra é nebulizada por um fluxo de oxidante gasoso, mistura-se com um combustível gasoso e é levada à chama, onde ocorre um conjunto complexo de processos inter-relacionados que resultam na atomização. O primeiro processo é a dessolvatação, na qual o solvente evapora produzindo um aerossol molecular de partículas sólidas pequenas. A dissociação da maior parte dessas moléculas resulta em átomos no estado gasoso e alguns desses átomos assim formados ionizam gerando cátions e elétrons. Também são produzidos outros átomos e moléculas na chama como resultado das interações do combustível com o oxidante e com as várias espécies presentes nas amostras (SKOOG *et al.*, 2007).

A F AAS é uma das mais bem-sucedidas técnicas analíticas implementadas, apresentando como principais vantagens a versatilidade e o baixo custo para aquisição e operação, em comparação com outras técnicas analíticas (DIONÍSIO *et al.*, 2011). Por outro lado, possui desvantagens no que se refere à eficiência de amostragem, já que apenas 5 a 10 % da amostra aspirada são introduzidas na chama, e o restante descartado. Além disso, apresenta problemas relacionados à sensibilidade, pois é empregada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} (SKOOG *et al.*, 2007).

A técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica foi desenvolvida por L'vov em 1959. Através do efeito Joule, um tubo de grafite é aquecido por resistência à passagem de uma alta corrente elétrica aplicada através do tubo. A técnica de ET AAS permite a introdução de poucos microlitros ou de poucos miligramas da amostra no interior do tubo de grafite. A amostra é sujeita a um programa de temperaturas no tubo com o intuito de separar os contaminantes. Os programas mais comuns de temperaturas incluem etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza do atomizador (WELZ e SPERLING, 2008).

As temperaturas empregadas na etapa de pirólise e atomização dependem da característica do elemento de interesse. Assim, para garantir o melhor desempenho desta duas etapas, suas temperaturas são selecionadas através da construção de curvas de pirólise e atomização que consistem em avaliar o sinal analítico (absorvância integrada) em função da temperatura.

A técnica de ET AAS oferece limites de detecção de duas a três ordens de grandeza melhores que a F AAS, portanto a determinação de elementos traço torna-se viável em concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$. Os melhores limites de detecção devem-se ao maior tempo de residência do analito no volume de absorção e a maior porcentagem de

atomização da amostra introduzida, virtualmente 100 % para ET AAS (WELZ e SPERLING, 2008).

1.6.1) Espectrometria de Absorção Atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CSAAS)

A busca por determinações multi-elementares utilizando AAS teve início cedo, se comparada com a apresentação desta técnica por Walsh, a começar pelos trabalhos de Butler e Strasheim, em 1965, e de Sullivan e Walsh em 1967. Durante todo o desenvolvimento histórico, as determinações multi-elementares por AAS foram realizadas unicamente de forma simultânea. Apenas 50 anos após a implementação da AAS como técnica analítica, determinações multi-elementares realizadas de forma sequencial vieram a ser realizadas (FÁBIO ALAN CARQUEIJA *et al.*). Várias tentativas foram realizadas para construir um espectrômetro de absorção atômica multi-elementar, utilizando um arranjo de lâmpadas de catodo oco ou de descarga sem eletrodo, mono ou policromadores, atomizadores de chama e detectores convencionais. Estes instrumentos foram caracterizados pela baixa sensibilidade, pobres razões sinal/ruído e inflexibilidade quanto os elementos a serem determinados (WELZ *et al.*, 2003).

A procura de uma solução que implicasse em um conceito mais flexível fez com que as atenções dos pesquisadores se voltassem, mais uma vez, para as fontes de radiação contínua. Embora a fonte contínua possa operar nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, a largura de banda isolada com monocromadores de média resolução, comumente empregados na AAS convencional, ainda é muito maior que as obtidas com fontes de linha. Outros problemas observados quando se utilizam fontes contínuas são linhas de base com muito ruído e limites de detecção relativamente mais elevados, que são relacionados com a instabilidade das fontes contínuas mais intensas, a exemplo das lâmpadas de arco do xenônio. Além disso, a intensidade das fontes contínuas diminui consideravelmente em comprimentos de onda abaixo de 280 nm, portanto, não se podia simplesmente substituir as lâmpadas de catodo oco por fonte de radiação contínua sem adaptações no restante do instrumento (FÁBIO ALAN CARQUEIJA *et al.*).

Foi somente na década de 1990 que as dificuldades associadas ao uso de fontes contínuas em AAS foram superadas e o primeiro modelo comercial de um instrumento deste tipo foi lançado em 2004. A configuração atual é esquematicamente mostrada na figura 4:

Figura 4: Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução de fonte contínua (HR-CSAAS). No esquema tem-se: (1) lâmpada de arco curto de xenônio; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle; (9) detector CCD (BORGES *et al.*, 2005).

O equipamento esquematizado na figura 1 consta com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, operando em modo *hot spot* cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. A lâmpada é operada a uma potência de 300W, e é constituída por dois eletrodos de tungstênio com uma distância de 1mm entre eles. A intensidade de emissão, desta forma, excede a de uma lâmpada de cátodo oco em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude. Embora os arcos sejam instáveis, seu posicionamento é ativamente corrigido por um sistema controlado por computador que move um espelho, garantindo que o feixe de radiação esteja constantemente incidindo no centro do atomizador e, portanto, na fenda de entrada do monocromador.

A radiação incidente, após passagem pelo volume de absorção, é dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (Double-Echelle Monochromator), onde incidirá em um prisma e em uma rede de difração echelle, em arranjo Littrow. O prisma desempenha o papel de pré-dispersor, selecionando a parte do

espectro de interesse, ao passo que o monocromador echelle fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, que é melhor que 2pm por pixel (unidade fotossensível do detector) em 200nm. O comprimento de onda de interesse é, desta forma, selecionado pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas, através de motores de passos sobre os quais estes componentes estão fixados. Todos os elementos do monocromador estão combinados em um módulo estável e compacto. Um sistema ativo de estabilização de comprimentos de onda foi desenvolvido, utilizando uma lâmpada de neônio interna posicionada em frente à fenda intermediária, emitindo várias linhas relativamente estreitas. As linhas são separadas pela rede echelle em várias ordens sobrepostas, o que implica no fato de que para cada posição da rede há ao menos uma linha de Ne que irá atingir o detector. Estas linhas são então atribuídas a um pixel correspondente no detector e este sistema é utilizado para estabilização, de maneira que a precisão é limitada apenas pelo motor de passos, que ajusta a posição da rede.

Por fim, a radiação emitida e transmitida, após o processo de separação, atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), similar aos dispositivos utilizados em câmeras fotográficas digitais, sensível na região do UV. Cada pixel é equipado com um amplificador individual, de maneira que o instrumento opera de fato com 512 detectores completamente independentes, 200 dos quais são normalmente utilizados para propósitos analíticos. Isto significa que todo o ambiente espectral a $\pm 200\text{pm}$ ao redor da linha analítica na região do ultra-violeta e até $\pm 500\text{pm}$ na região visível do espectro torna-se “visível”, fornecendo uma série de informações indisponíveis em instrumentos convencionais. Com isso, é possível avaliar uma terceira dimensão do fenômeno que ocorre no atomizador (BORGES *et al.*, 2005).

Assim como as lâmpadas de catodo oco, o sistema composto de fonte contínua, monocromadores de alta resolução e detectores de estado sólido marcaram a história da espectrometria de absorção atômica. Os avanços obtidos com este sistema, dentre eles o alto poder de resolução, a melhoria da razão sinal/ruído e o uso de apenas uma fonte de radiação cobrindo toda a faixa espectral de uso na AAS convencional e mais outras linhas do espectro necessárias à determinação de elementos cujas fontes de linhas não tinham ainda sido confeccionadas, fazem da HR-CS AAS uma excelente ferramenta para desenvolvimento de métodos analíticos.

1.7) Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

O espectro de UV-Vis é feito por meio da comparação da intensidade de um feixe luminoso que atravessa uma amostra e um feixe luminoso de referência que não atravessa a amostra. Assim, as diferenças encontradas entre as intensidades dos feixes devem-se às absorções realizadas pela amostra. As absorções das amostras são dependentes do comprimento de onda (sistema quantizado). A resolução típica de um espectro UV-Vis é de um nanômetro e o comprimento de onda dos feixes luminosos monocromáticos ($< 1 \text{ nm}$) são variados de 190 até 780 nm ou mais (DE FARIAS, 2005).

Figura 5. Esquema da técnica da Espectroscopia UV-Vis. (DE FARIAS, 2005)

A figura 5 mostra o esquema da técnica da espectroscopia UV-Vis. Para um dado comprimento de onda λ , pode-se calcular a fração da intensidade inicial I_0 que chega ao detector. Essa fração é chamada de transmitância e decai exponencialmente em função do caminho ótico percorrido. Ao se aplicar a função logaritmo nessa grandeza os valores serão negativos (valores de T entre 0 e 1), por isso inverte-se o valor da transmitância para se obter o mesmo valor positivo e linear. Essa nova grandeza é proporcional à absorção da luz incidente e é chamada de Absorvância. Ela é diretamente proporcional ao caminho ótico e ao número de centros absorvedores, ou

seja, à concentração molar desses centros, conforme representado pela equação 1, a qual é uma representação matemática da Lei de Beer (DE FARIAS, 2005).

$$A = -\log T = \log \frac{I_{0,\lambda}}{I_\lambda} = \epsilon bc \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: A = absorvância, T = transmitância, $I_{0,\lambda}$ = radiação incidente, I_λ = radiação transmitida, ϵ = absortividade molar, b = caminho ótico e c = concentração do analito absorvente.

Medidas de absorção da radiação ultravioleta e visível têm ampla aplicação na identificação e determinação quantitativa de uma grande variedade de espécies inorgânicas, orgânicas e bioquímicas (SKOOG *et al.*, 2007). Além disso, a técnica apresenta vantagens para a determinação de elementos em concentrações em nível traços devido à boa sensibilidade, boa reprodutibilidade, facilidade de operação e seletividade para diferentes estados de oxidação de um mesmo elemento (SKOOG *et al.*, 2006).

2. Objetivos

O objetivo principal desse projeto de pesquisa foi quantificar e avaliar a bioacessibilidade (através de testes *in vitro*) do ferro presentes nos alimentos que fazem parte da dieta do brasileiro e outros que não são tradicionais, como algumas frutas típicas das regiões norte e nordeste.

Além disso, outros objetivos desse projeto de pesquisa incluem (1) Quantificação da fração total e bioacessível de outros macro e micronutrientes, como o Ca, Mg, K e Cu, presentes nos alimentos analisados; (2) Determinação da composição centesimal (porcentagem de proteínas, cinzas, umidade, lipídios, e carboidratos) dos alimentos analisados para fortalecimento da pesquisa e eventuais correlações com os resultados obtidos; (3) Determinação do conteúdo de ácido fítico nos alimentos analisados para correlação com os dados das concentrações bioacessíveis; (4) Avaliar a influência da temperatura de cocção na concentração de ferro heme presente nas amostras de fígado bovino.

3. Materiais e Métodos

3.1) Obtenção dos alimentos para as análises

Os alimentos analisados 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 feijão (*Phaseolus Vulgaris*), espinafre (*Spinacia Oleracea*), brócolis (*Brassica Oleracea*), beterraba (*Beta vulgaris L.*), melado e fígado de boi, e no segundo grupo inserem-se cupuaçu (*Theobroma grandifolium Schum*), açaí *in natura* (*Euterpe cleracea*) e caju (*Anacardium occidentale*).

A maioria dos alimentos analisados foram adquiridos em supermercados e varejões da cidade de Ribeirão Preto (SP). Os alimentos estavam expostos à venda nas prateleiras destes estabelecimentos, e foram selecionados aleatoriamente para a realização das análises. Apenas as amostras de Açaí e Cupuaçu foram adquiridas em Manaus na forma de polpa, a qual foi extraída da fruta no momento da sua obtenção, e em seguida a mesma foi congelada.

3.2) Reagentes e equipamentos

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de pureza analítica (p.a) utilizando água de alta resistividade (18,2 MΩ) obtida de um sistema Milli-Q da Millipore. Todos os materiais foram descontaminados em banho de HNO₃ 30 % v/v por 24 h e, em seguida, lavados com água Milli-Q e secos a temperatura ambiente. Na secagem das amostras de fígado bovino utilizou-se um liofilizador (Enterprise I - TERRONI) e para as demais amostras utilizou-se uma estufa de secagem e esterilização (Tecnal, TE 393/2). Ácido nítrico concentrado (Merck), peróxido de hidrogênio (Carlo Erba) e um bloco digestor (Marconi, modelo MA4025) foram usados na mineralização das amostras. Para os testes de bioacessibilidade *in vitro* utilizou-se uma solução de pepsina (Pepsin, from Porcine gastric mucosa, Sigma Aldrich), solução de pancreatina (Pancreatin from Porcine Pancreas, Sigma Aldrich) e sais biliares (Bile Salts, Fluka Analytical), solução saturada de NH₄CO₃ (Sigma Aldrich) para ajuste de pH, e um banho de água com temperatura e agitação controladas (Marconi, Banho metabólico Dubnoff, MA – 095/CF). Para determinação da quantidade de ácido fítico nos alimentos

usou-se solução de FeCl_3 (Merck), HCl (JT Baker), solução de biperidina (Vetec) e ácido tioglicólico (Vetec), mesa agitadora (Tecnal, TE-1401), banho de água com temperatura controlada (Marconi, Banho Maria-MA127), e uma centrífuga (Hermle, Z326K). Para determinação da umidade utilizou-se a estufa de secagem e esterilização já descrita. Na determinação do conteúdo de lipídios nas amostras utilizou-se metanol (Panreac), Clorofórmio (Merck), solução de sulfato de sódio (Sigma Aldrich) e centrífuga (Hermle, Z326K). Para determinação do teor de proteínas usou-se um sistema de destilação Kjeldahl (Quimis, Q328S21), o mesmo bloco digestor já descrito anteriormente, H_2SO_4 concentrado (Synth), Solução de NaOH (Synth), Solução de H_3BO_3 (JT Baker), solução de vermelho de metila 1% (m/v), solução de HCl (JT Baker), e mistura catalítica (TiO_2 , CuSO_4 anidro e K_2SO_4 (todos da Sigma Aldrich). Na determinação do conteúdo de cinzas usaram-se cadinhos de porcelana e forno mufla (Tecnal, 3000-10P). Para determinação de ferro heme utilizou-se acetona (Merck) e HCl (JT Baker). Uma solução contendo $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ em 17% HNO_3) e $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ em 15% HNO_3), ambos da Merck, foram empregados para a preparação de modificadores químicos em solução.

3.3) Instrumentação

Todas as determinações de Fe, Ca, Mg e K realizadas nas amostras alimentares foram utilizando o Espectrômetro de Absorção Atômica de alta resolução com fonte contínua ContrAA 700 (Analytikjena) operando no modo F AAS, utilizando uma lâmpada de xenônio como fonte de radiação com uma corrente 13A. Diferentes linhas analíticas foram escolhidas para a determinação dos macro e micronutrientes; para o Fe a linha escolhida foi de 248,327 nm, para o Cálcio foi de 422,6728 nm, para o Mg foi de 285,2125 nm e para o K foi de 766,4908 nm. Para as medições de Fe, Mg e K a chama era composta de uma mistura de acetileno (White Martins, São Paulo) e ar comprimido, obtido por um compressor, na razão igual a 0,130 respectivamente. Para determinação de Ca utilizou-se a chama composta pela mistura de acetileno e óxido nitroso (ambos da White Martins, São Paulo) na razão igual a 0,584 respectivamente.

As determinações de Cu foram feitas utilizando o Espectrômetro de Absorção Atômica AAnalyst 800 (PerkinElmer, Norwalk, EUA) operando no modo ET AAS. Uma HCL Lumina Lamp (PerkinElmer) para cobre foi utilizada como fonte de radiação

para a determinação deste elemento, operada com corrente de 30 mA. A linha analítica utilizada para as determinações foi a de 324,8 nm. Como gás inerte de proteção e purga, argônio com pureza de 99,999% (White Martins, São Paulo) foi utilizado.

Para a determinação de Cu pela técnica de ET AAS, alguns parâmetros foram estabelecidos no equipamento com o intuito de melhorar seu desempenho. Na tabela abaixo encontra-se o programa de tempo-temperatura utilizado durante a análise.

Tabela 1. Programa de temperatura utilizado para determinação de Cu por ET AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento (s)	Tempo de permanência (s)	Vazão de gás (mL min ⁻¹)
Secagem 1	110	10	15	250
Secagem 2	130	15	15	250
Pirólise	1200 ^{a,b}	10	20	250
Atomização	2000 ^a , 2200 ^b	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

Sobrescritos: a: digestão total, b: ensaio de bioacessibilidade.

Sabendo que a eficiência das etapas de pirólise e atomização é diretamente dependente das características do elemento sob análise, bem como da matriz em que se está inserido, é imprescindível determinar a temperatura de pirólise e atomização para melhorar o desempenho da técnica de ET AAS.

Para determinação de Ferro heme e da concentração de ácido fítico presente nas amostras utilizou-se um espectrofotômetro de UV-vis Hewlett-Packard 8453, em uma cela de quartzo de 1,0 e 0,2 cm de espessura respectivamente.

3.4) Preparação das amostras para análises

Com a finalidade de conservação das amostras alimentares adquiridas para as análises, realizou-se a secagem das mesmas, seguindo as indicações do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2005). 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. Desse modo, ao se remover a água de um determinado

alimento, impede-se a proliferação desses microorganismos, favorecendo suas mortes e contribuindo significativamente para a conservação da amostra alimentar.

Para a secagem dos alimentos, os mesmos foram picados em pequenos pedaços e estes foram espalhados sobre bandejas de alumínio e levados a uma estufa mantendo-se a temperatura da mesma em 50 °C. O sistema foi mantido nessa condição por no mínimo 72 horas, deixando um tempo posterior caso a amostra não estivesse totalmente seca. A secagem das amostras de fígado bovino foi feita em um liofilizador, onde as amostras permaneceram no aparelho por 48 horas.

Após a secagem, as amostras de alimentos foram maceradas e homogeneizadas com auxílio de um almofariz e pistilo, e em seguida, as amostras eram armazenadas em recipientes plásticos devidamente identificados e colocadas dentro de um dessecador contendo, sílica como agente secante para prevenir que as amostras absorvessem umidade.

A seguir são descritas o estado em que cada um dos alimentos analisados foi conduzido à secagem:

Feijão: A amostra foi deixada de molho por 40 minutos em água Milli-Q e em seguida foi cozida em panela de pressão sem óleo nem temperos. Adotou-se tal procedimento, pois esta leguminosa é consumida na forma cozida.

Brócolis, Espinafre, Beterraba: as amostras originais foram lavadas em água Milli-Q para remoção de possíveis sujeiras. Uma parte de cada uma das amostras foi submetida ao processo de secagem descrito acima. A outra parte dos alimentos foi cozida. A amostra de beterraba foi cozida em água Milli-Q em panela de pressão por 20 minutos, enquanto que as amostras de brócolis e espinafre foram cozidas no vapor.

Frutas: as análises foram feitas com as frutas *in natura*, sendo que apenas as polpas das mesmas foram submetidas ao processo de secagem.

Fígado bovino: para avaliar o efeito da cocção nas análises realizadas procedeu-se com a secagem de parte das amostras na forma crua, enquanto que a outra parte foi grelhada em diferentes temperaturas, sendo que em todas elas as amostras permaneceram sob aquecimento por 10 minutos.

3.5) Determinação da composição centesimal

A seguir serão descritas as metodologias empregadas para determinação de cada componente da composição centesimal dos alimentos analisados. Os procedimentos

foram realizados em triplicata para cada amostra. Para determinação do teor de umidade, utilizaram-se as amostras úmidas enquanto que na determinação dos demais teores a amostra utilizada estava seca e homogeneizada.

3.5.1) Determinação de umidade

O teor de umidade das amostras alimentares foi determinado de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2005). Para realização da determinação de umidade, aproximadamente 1 g da amostra foi transferida para uma placa de Petri (previamente seca e com a sua massa registrada) e, em seguida, levada para a estufa a uma temperatura de 105 °C por 24 horas. Ao término deste período, após o resfriamento em dessecador contendo 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 como segue:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{M \text{ água (g)}}{M \text{ amostra úmida (g)}} \cdot 100 \quad \textbf{(Equação 2)}$$

Onde M água é a diferença entre a massa do sistema “placa de Petri/amostra alimentar” antes e depois da secagem, e M amostra úmida é a massa inicial de amostra transferida para a placa de Petri.

3.5.2) Determinação do conteúdo de proteínas

Na determinação de proteínas das amostras alimentares foi usado o método de Kjeldahl (LUTZ, 2005). Este método é dividido em três etapas: digestão, destilação e titulação. Inicialmente, a matéria orgânica da amostra é decomposta (digestão) transformando o nitrogênio para a forma de sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na destilação, este nitrogênio amoniacal é transformado em amônia, NH_3 , onde se adiciona NaOH concentrado em aquecimento para a liberação da mesma dentro do volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio, que é dosado com uma solução de ácido clorídrico padronizada para formação de NH_4Cl na presença de indicador ácido-base. 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 proteína.

Para realizar esta análise primeiramente pesaram-se 100 mg da amostra seca e homogeneizada no tubo de digestão, e então adicionou-se uma espátula da mistura digestora (TiO_2 , CuSO_4 e K_2SO_4 anidros, na proporção 0,3:0,3:6,0, respectivamente) e 10 mL de H_2SO_4 concentrado. O tubo foi levado para o bloco digestor e submetido a um aumento de temperatura gradual de 50°C a cada 30 minutos até atingir 350°C , permanecendo nesta temperatura até completar a digestão, caracterizada pela formação de um líquido incolor ou levemente amarelado. Em seguida, esfriou-se a amostra digerida e transferiu-se a mesma para o destilador. Colocou-se 25 mL de solução de ácido bórico $0,033 \text{ mol L}^{-1}$ com indicador (solução alcoólica de vermelho de metila 1% m/v) em um erlenmeyer de 250 mL de forma que a saída do destilador mergulhasse na solução. Adicionou-se 25 mL de solução de NaOH 40 % no tubo de destilação e então iniciou-se o aquecimento do destilador. A amostra foi destilada até que o volume da solução de ácido bórico com indicador passasse a aproximadamente três vezes mais do volume inicial. O sal formado, borato de amônio, após a destilação, foi titulado com solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até ponto de viragem do indicador. Anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de proteínas na amostra analisada é calculada como segue:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{V \cdot 0,14 \cdot f}{m} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde V é o volume de HCl gasto na titulação (mL), f é o fator de conversão de nitrogênio em proteínas (igual a 6,25) e m é a massa da amostra (g).

3.5.3) Determinação do conteúdo de cinzas

Na determinação do teor de cinzas, empregou-se o procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2005). A massa de um cadinho de porcelana foi medida em uma balança analítica. Em seguida, aproximadamente 0,5 g da amostra alimentar seca foi transferida para o cadinho, e a massa do sistema cadinho-amostra foi medida. Então, a amostra alimentar contida no cadinho foi carbonizada em chapa aquecedora (temperatura baixa) e, em seguida, incinerada em mufla a 550°C por 4 horas, tornando as cinzas brancas. Posteriormente, o cadinho contendo as cinzas foi resfriado em

dessecador até a temperatura ambiente, e a massa do sistema cadinho-amostra foi medida. A porcentagem de cinzas na amostra alimentar é dada pela expressão:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{M \text{ cinzas (g)}}{M \text{ amostra (g)}} \cdot 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde M cinzas é a massa de 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.

3.5.4) Determinação de conteúdo de lipídios

Na determinação de lipídios, foi usado um procedimento que envolve extração a frio com solventes, conhecido como método de Bligh e Dyer (BLIGH e DYER, 1959). Inicialmente, foi pesada uma massa entre 3,0 e 3,5 g da amostra alimentar seca e homogeneizada. A amostra pesada foi então transferida para um erlenmeyer de 100 mL e os seguintes volumes de solventes foram adicionados: 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. O erlenmeyer foi fechado hermeticamente e colocado em um agitador rotativo por 30 minutos a 120 rpm. Após esta etapa, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio 1,5 % (m/v). Logo, tampou-se o erlenmeyer e agitou-se por mais 2 minutos. Terminado este processo, as camadas que aparecem foram deixadas separando de forma natural em um funil de decantação. Em seguida, descartou-se a camada superior e retirou-se cerca de 15 mL da camada inferior (clorofórmio), colocando este volume em um tubo de 50 mL. Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro neste tubo, tampando e agitando para remover traços de água que são arrastados na pipetagem da camada inferior. A solução deste tubo foi então filtrada em um funil pequeno com papel de filtro, tornando-se límpida. Por fim, retirou-se 5 mL do filtrado despejando o conteúdo em um béquer de 50 mL previamente tarado. Este foi colocado em estufa a 80 °C até evaporar o solvente (entre 15 e 20 minutos). Após o resfriamento deste erlenmeyer em dessecador, ele foi pesado em uma balança analítica. A porcentagem de lipídios na amostra analisada é calculada como abaixo:

$$\% \text{ lipídios totais} = \frac{p \cdot 4}{g} \cdot 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde p é o peso dos lipídios (g) contido em 5 mL, e g é o peso da amostra (g).

3.5.5) Determinação do conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença, após a determinação da porcentagem de cada um dos constituintes obtida utilizando a amostra seca dos alimentos analisados, ou seja, somaram-se as porcentagens de lipídios, cinzas e proteínas e calculou-se a porcentagem de carboidratos nas amostras pela seguinte operação:

$$\% \text{ de carboidratos} = 100\% - \sum \% \text{ de lipídios, proteínas e cinzas} \text{ (Equação 6)}$$

3.6) Determinação de conteúdo de Ácido Fítico

O ácido fítico foi extraído segundo o método descrito por Haug e Lantzsch (HAUG e LANTZSCH, 1983). Inicialmente, transferiu-se 100 mg de cada amostra alimentar para tubos de polipropileno e adicionou-se 1,5 mL de HCl 0,2 mol L⁻¹ para extração do conteúdo de ácido fítico. Em seguida, os tubos foram agitados em mesa agitadora a 150 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente e logo após centrifugados a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 1 mL de solução ácida de FeCl₃ (0,11 g de cloreto férrico foram dissolvidas em 100 mL de HCl 0,2 mol L⁻¹ e o volume foi completado para 1000 mL) e em seguida, a mistura foi aquecida por 30 minutos a 100 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 3000 x g durante 15 minutos a 25 °C. O sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 0,75 mL de solução de bipyridina (10g de bipyridina, 10 mL de ácido tioglicólico em 1000 mL de água). Feito isso, realizou-se a leitura da absorvância em 519 nm. A concentração de ácido fítico foi expressa em g/ 100g.

3.7) Digestão ácida das amostras alimentares

Para a determinação das quantidades totais dos macro e micronutrientes nas amostras procedeu-se com a digestão total (mineralização) das mesmas. A mineralização de uma amostra alimentar é a destruição de sua matéria orgânica, restando apenas sua parte mineral. É conseguida, usualmente, por meio de uma digestão

por via úmida, usando agentes oxidantes juntamente com uma fonte de aquecimento, que pode ser uma chapa aquecedora, um bloco digestor ou um aparelho de microondas.

O procedimento usado foi adaptado de um dos métodos padrão para a digestão de amostras alimentares, que trata de uma série de métodos e procedimentos para a análise de várias substâncias presentes em alimentos (CAPAR e SZEFER, 2005).

Para a digestão (realizada em triplicata para cada alimento), pesou-se entre 0,5 g e 1 g das amostras e em seguida, as mesmas foram transferidas para o interior de três tubos adequados para serem acoplados ao bloco digestor. Em todos os tubos contendo a amostra a ser digerida, adicionou-se 7 mL de ácido nítrico concentrado de tal modo que o volume do ácido cobrisse totalmente a amostra. Logo após, os tubos foram alocados nas entradas do bloco digestor e a temperatura deste regulada para que atingisse 65 °C. Manteve-se o sistema nesta 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 H₂O₂ à solução dos tubos. Feito isso, os tubos foram novamente colocados no bloco digestor, e a temperatura deste foi elevada e mantida a 95 °C. Os tubos foram parcialmente tampados com filme plástico protetor e manteve-se o sistema nesta situação durante 24 horas. Decorrido o tempo de digestão, transferiu-se a solução resultante da digestão de cada tubo para um frasco de polipropileno, acondicionando-se este em geladeira para a posterior quantificação de ferro.

A digestão das amostras de fígado bovino foi realizada de maneira similar, porém, neste caso, utilizou-se o forno de microondas para promover de maneira eficaz a mineralização de toda matéria orgânica presente na amostra. Para realizar a digestão da amostra, utilizou-se o procedimento proposto pelo manual do equipamento, e para isso adicionou-se aos frascos próprios do microondas, aproximadamente 0,5 g da amostra alimentar, 8 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ 30% (v/v). A temperatura ajustada foi de 200 °C por 30 minutos (15 minutos para alcançar a temperatura de 200 °C e 15 minutos permanecendo nesta temperatura) sob uma potência de 700 W. Após este período, as soluções resultantes da digestão ácida foram armazenadas em tubos Falcon e alocadas na geladeira para posterior quantificação dos elementos.

3.8) Material de referência certificado

Para verificar a exatidão da metodologia de digestão total das amostras alimentares na determinação da quantidade dos macro e micronutrientes em estudo (Fe, Ca, Cu, Mg e K) presentes nas amostras utilizou-se o material de referência certificado (sigla inglesa CRM) LUTS-1 – Non-Defatted Lobster Hepatopancreas. Para realização do experimento, procedeu-se com a digestão (em triplicata) de massas conhecidas deste CRM da mesma forma que foram feitas as digestões das amostras alimentares de fígado bovino, devido a similaridade dessas amostras (seção 3.6).

3.9) Teste de bioacessibilidade *in vitro*

O teste de bioacessibilidade *in vitro* empregado foi um método adaptado do usado por Kulkarni e colaboradores (KULKARNI *et al.*, 2007). O método consiste de duas etapas consecutivas de digestão: a primeira é uma digestão gástrica utilizando solução de pepsina em meio ácido (pH=1,75), e a segunda etapa consiste em uma digestão intestinal usando uma solução de pancreatina e sais biliares em meio neutro (pH= ~7,0). O esquema a seguir resume as etapas principais do método:

Figura 6. Representação esquemática da digestão gastrointestinal de amostras alimentares para avaliação de bioacessibilidade de elementos químicos. Adaptado de (KULKARNI *et al.*, 2007).

Para a realização do teste, aproximadamente 5 g da amostra alimentar seca e homogeneizada foi misturada com 100 mL da solução gástrica de pepsina 6% m/v

(obtida dissolvendo 6 g de pepsina em 100 mL de solução de HCl 0,03 mol.L⁻¹, pH = 1,75) em um erlenmeyer, cujo pH do meio era de aproximadamente 1,75, simulando o valor encontrado no trato gástrico humano. Em seguida, com auxílio de um bastão de vidro, a solução resultante foi agitada. Posteriormente, o erlenmeyer foi tampado e deixado em banho de água termostatizado a 37 °C por 3 horas e 90 rpm. Feito isso, retirou-se o erlenmeyer do banho metabólico e elevou-se o pH do meio resultante até aproximadamente pH = 7 com algumas gotas de solução saturada de bicarbonato de amônio. Em seguida, adicionou-se ao erlenmeyer 75 mL da solução de pancreatina e sais biliares (obtida dissolvendo 0,5 g de pancreatina em 100 mL de água deionizada contendo 0,25 g de sais biliares) e a solução foi novamente agitada com auxílio de um bastão de vidro e levada ao banho termostatizado mantendo a temperatura em 37 °C e a agitação em 90 rpm, durante 4 horas. Ao final deste período, o banho termostatizado foi desligado e o erlenmeyer retirado. Após a digestão pancreática, a mistura resultante foi transferida para um tubo de polipropileno e este levado à centrifugação a 5000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante da solução foi filtrado em filtro Millipore de 0,42 µm (Whatman®). Para melhorar a conservação das amostras antes das determinações dos macro e micronutrientes adicionou-se a cada um delas 3 mL de HNO₃ concentrado.

A medida do teor de ferro bioacessível na amostra alimentar de caju foi realizada pela digestão ácida do extrato da bioacessibilidade. Esta digestão foi realizada adicionando aos frascos do microondas 5 mL do sobrenadante obtido após o teste de bioacessibilidade *in vitro*, 2 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ 30% (v/v). Tais frascos foram devidamente fechados e submetidos a uma temperatura de 200 °C por 30 minutos (15 minutos para alcançar a temperatura de 200°C e 15 minutos nesta temperatura), sob potência de 700 W.

3.10) Determinação de ferro heme

A concentração de ferro heme presente nas amostras de fígado bovino foi determinada seguindo as condições analíticas propostas por Boccia e colaboradores (LOMBARDI-BOCCIA, GINEVRA *et al.*, 2002). Esta metodologia faz uso das otimizações de alguns parâmetros de um procedimento padrão utilizado na determinação da concentração de ferro heme em carnes (HORNSEY, 1956). A metodologia baseia-se na extração do pigmento usando uma solução de acetona

acidificada. Para a realização do experimento na amostra crua, primeiramente pesou-se (em triplicata), 1,54 g da amostra em tubos de 50 mL recobertos com papel alumínio e adicionou-se 20 mL da solução extratora composta de acetona/ H₂O/ HCl (0,38M) na proporção 80:18:2. A mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos e permaneceu no escuro por 1 hora sendo agitada ocasionalmente durante esse período. Os extratos obtidos foram centrifugados a 2200 rpm por 10 minutos. Feito isso, mediu-se a absorbância dos sobrenadantes em 640 nm utilizando a Hematina (Sigma Aldrich) como um reagente padrão para a preparação da curva de calibração. A metodologia usada para as amostras grelhadas foi feita de maneira similar, porém a massa pesada das amostras foi 1,14 g e a solução extratora era composta de acetona/ H₂O/ HCl (0,31M) na proporção 80:18:2.

A concentração de ferro heme (HFe) nas amostras foi calculada através de uma curva de calibração como se segue:

$$\text{HFe } (\mu\text{g/ g}) = \text{conteúdo de hematina } (\mu\text{g/ g}) \times \frac{AW}{MW} \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde AW é igual à massa atômica do ferro e MW o peso molecular da hematina. A relação entre o ferro presente na hematina é considerado como 0,0882 $\mu\text{g HFe/ } \mu\text{g de hematina}$.

3.11) Análise estatística dos resultados

Para comprovar que a metodologia analítica usada na digestão total das amostras através de um procedimento de validação utilizando um material de referência certificado é adequada para tal propósito, utilizou-se o teste *t* em um intervalo de confiança de 95%. A fim de comparar os valores médios obtidos da composição centesimal, concentração de ácido fítico e concentração total e bioacessíveis dos macro e micronutrientes presentes nas diferentes amostras analisadas foi realizado o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa Statistica 6.0: *Basic Statistics and Tables*.

4) Resultados e discussão

4.1) Composição centesimal dos alimentos

A tabela a seguir mostra os resultados da determinação da composição centesimal das amostras alimentares analisadas considerando apenas a parte comestível dos mesmos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata das medidas.

Tabela 2. Composição centesimal dos alimentos analisados

Alimentos	Umidade (%) (base úmida)	Proteínas (%) (base seca)	Lipídios (%) (base seca)	Cinzas (%) (base seca)	Carboidratos (%) (base seca)
Feijão cozido	66,3 ± 0,9 ^a	22,2 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,2 ^{a,e}	3,1 ± 0,1 ^a	72,30 ± 1,0 ^a
Espinafre cru*	93,4 ± 0,2 ^{b,c}	35,6 ± 1,1 ^{b,c}	10,4 ± 0,9 ^b	18,3 ± 0,6 ^b	35,7 ± 1,5 ^b
Espinafre cozido*	92,3 ± 0,5 ^c	32,6 ± 2,3 ^b	9,7 ± 0,5 ^b	17,6 ± 0,3 ^b	39,70 ± 2,4 ^b
Brócolis cru*	87,4 ± 0,8 ^d	36,9 ± 1,3 ^c	19,6 ± 2,4 ^c	7,2 ± 1,1 ^c	36,3 ± 2,9 ^b
Brócolis cozido*	88,5 ± 1,0 ^{d,c}	23,1 ± 1,4 ^a	8,2 ± 1,1 ^b	5,7 ± 0,3 ^d	63,10 ± 2,1 ^c
Açaí	96,7 ± 0,1 ^b	8,9 ± 1,1 ^{d,f}	31,5 ± 0,9 ^d	3,0 ± 0,1 ^{a,e}	56,60 ± 1,4 ^d
Cupuaçu	87,7 ± 0,7 ^d	5,8 ± 0,4 ^{d,e}	4,0 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,2 ^{a,f}	86,40 ± 0,9 ^e
Caju	86,7 ± 2,9 ^d	7,5 ± 0,5 ^d	2,9 ± 0,2 ^{a,e}	2,6 ± 0,1 ^{a,e}	87,00 ± 3,0 ^e
Melado	24,9 ± 1,4 ^e	1,9 ± 0,5 ^e	1,2 ± 0,1 ^e	1,9 ± 0,1 ^e	95,00 ± 1,5 ^f
Beterraba crua	85,2 ± 1,4 ^d	12,6 ± 1,3 ^f	1,6 ± 0,3 ^{a,e}	5,2 ± 0,3 ^d	80,6 ± 1,4 ^g
Beterraba cozida	85,7 ± 2,4 ^d	7,9 ± 0,6 ^d	1,4 ± 0,1 ^{a,e}	5,2 ± 0,4 ^d	85,5 ± 0,7 ^{e,g}
Fígado Bovino cru*	72,2 ± 0,8 ^f	59,3 ± 1,5 ^g	15,7 ± 0,9 ^f	4,6 ± 0,1 ^{d,f}	20,40 ± 1,9 ^h
Fígado Bovino grelhado*	57,2 ± 0,4 ^g	63,7 ± 2,5 ^h	17,3 ± 0,6 ^{c,f}	4,7 ± 0,1 ^{d,f}	14,30 ± 2,6 ⁱ

*as amostras adquiridas para análise são diferentes entre si.

a,b,c,d,e,f,g,h,i: letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Observando os dados mostrados na Tabela 2, nota-se que dentre o grupo das frutas (Açaí, Cupuaçu e Caju), o Açaí se destaca devido à alta quantidade de lipídios, sendo superior a 30%, o que confere a este alimento um alto valor energético (PENA *et al.*, 2010), além disso, esta fruta típica da região amazônica apresenta uma elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008), demonstrando o potencial nutritivo deste alimento. Com relação à umidade deste grupo das frutas, o Açaí apresenta o maior valor de todos. Isto pode ser associado ao processo de obtenção da polpa deste fruto, no qual o mesmo é inicialmente embebido em água para posterior extração da polpa, sendo que a quantidade de água utilizada neste processo pode variar, e por isso os valores de umidade são altos, superiores a 95%.

Com relação à quantidade de proteína nos alimentos analisados, nota-se ainda pela Tabela 2 que o fígado bovino, tanto cru quanto grelhado, foi o alimento que apresentou a maior porcentagem. O teor em proteína com alto valor biológico é uma característica positiva da carne, sendo que este valor biológico está determinado pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais. O espinafre e o brócolis cru também apresentaram uma elevada porcentagem de proteína, porém as proteínas de origem animal possuem, devido à sua composição em aminoácidos, um valor biológico mais elevado que as proteínas de origem vegetal.

Comparando-se os valores dos alimentos crus e cozidos, nota-se que não existem diferenças significativas entre a composição centesimal do espinafre. Para o fígado bovino a maior diferença dos valores está na umidade, visto que durante o processo de cocção o alimento perde parte da água contida em seu interior, por isso o valor da umidade torna-se menor. Para a beterraba e o brócolis a diferença na porcentagem de proteínas pode estar associada ao aquecimento no qual os alimentos são submetidos para a cocção, uma vez que sob temperaturas elevadas é comum ocorrer a desnaturação de parte das proteínas presentes nos alimentos, e com isso a porcentagem da mesma torna-se menor.

Com relação ao melado, nota-se que a porcentagem de carboidratos foi superior a 90%, o que está relacionado a composição deste alimento, uma vez que o mesmo é um produto natural extraído da cana de açúcar e por isso é rico em açúcares, como a sacarose. Desta forma, este alimento é considerado uma boa fonte de energia para os seres vivos.

4.2) Figuras de mérito e exatidão da metodologia de digestão ácida (mineralização) das amostras alimentares.

Para estimar a viabilidade da utilização da técnica de F AAS e ET AAS para a determinação de todos os macros e micronutrientes nos alimentos analisados, as figuras de mérito obtidas para a análise de digestão total, ensaio de bioacessibilidade e digestão ácida do extrato de bioacessibilidade são encontrados nas tabelas abaixo:

Tabela 3. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por ET AAS e F AAS na matriz resultante do procedimento de digestão ácida das amostras analisadas

F AAS						
Elementos	RSD (%)	Concentração Característica, ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ** ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de concentração (mg L^{-1})	Coef. Corr. Linear
Ca	3,1	0,54	1,0	3,4	0,5 - 3,0	0,996
K	2,4	0,22	0,065	0,22	0,5 - 2,0	0,995
Mg	2	0,086	0,0028	0,0094	0,1 - 0,5	0,997
Fe	1,7	28	0,52	1,7	0,5 - 3,0	0,999
ET AAS						
Elementos	RSD (%)	Massa Característica (pg)	LOD* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ** ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coef. Corr. Linear
Cu	3,5	32,9	0,035	0,12	5 - 25	0,998

*LOD = limite de detecção

**LOQ = limite de quantificação

Tabela 4. Parâmetros de mérito para os elementos quantificados por ET AAS e F AAS na matriz resultante do ensaio de bioacessibilidade das amostras analisadas

F AAS						
Elementos	RSD (%)	Concentração Característica, ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ** ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de concentração (mg L^{-1})	Coef. Corr. Linear
Ca	4,6	0,88	0,81	2,7	0,5 - 3,0	0,997
K	2,3	0,34	0,31	1,0	0,5 - 2,0	0,998
Mg	3,8	0,15	0,098	0,33	0,1 - 0,5	0,995
Fe	3,5	1,1	2,2	4,2	0,5 - 3,0	0,999
ET AAS						
Elementos	RSD (%)	Massa Característica (pg)	LOD* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ** ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coef. Corr. Linear
Cu	1,2	35,8	0,04	0,15	5 - 25	0,995

*LOD = limite de detecção

**LOQ = limite de quantificação

Tabela 5. Parâmetros de mérito para o Fe quantificado por F AAS na matriz resultante da digestão ácida do ensaio de bioacessibilidade

F AAS						
Elemento	RSD (%)	Concentração Característica ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ** ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de concentração (mg L^{-1})	Coef. Corr. Linear
Fe	0,8	2,11	0,14	0,47	0,5 - 3,0	0,999

*LOD = limite de detecção

**LOQ = limite de quantificação

Para validar o método aplicado neste trabalho, o material certificado LUTS-1 foi submetido às mesmas metodologias utilizadas na determinação da quantidade total dos macro e micronutrientes nos alimentos analisados. Para comparação entre os valores obtidos experimentalmente e os certificados, foram determinados os intervalos de confiança de cada resultado, com base no intervalo de 95 % de confiança. Os resultados obtidos, com seus respectivos intervalos de confiança encontram-se na Tabela 6. Uma vez que os valores experimentais e os certificados se sobrepõem, quando os intervalos de confiança são considerados, conta-se a exatidão do método de digestão ácida para as determinações das quantidades dos macro e micronutrientes.

Tabela 6. Comparação entre os valores experimentais e certificados das quantidades totais dos elementos no material de referência certificado (LUTS-1 – Non-Defatted Lobster Hepatopancreas)

Elementos	LUTS-1: Non-Defatted Lobster Hepatopancreas (mg /Kg)	
	Valor medido*	Valor certificado*
Fe	12,6 $\pm$ 3,60	11,6 $\pm$ 0,9
Ca	233 $\pm$ 35	203 $\pm$ 33
Cu	16,8 $\pm$ 2,26	15,9 $\pm$ 1,2
Mg	95,6 $\pm$ 7,11	89,5 $\pm$ 4,1
K	935 $\pm$ 111	948 $\pm$ 72

* Intervalo de confiança de 95%

Com o intuito de comparar os métodos, realizou-se o teste *t* de Student utilizando um nível de confiança de 95%. Uma vez que o experimento de digestão total do material certificado foi realizado em triplicata (*n*=3), tem-se 2 graus de liberdade e nessas condições $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. Aplicando-se o teste *t* para quantidade de ferro, tem-se que o valor de $t_{\text{calculado}}$ será dado pela seguinte expressão:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x} - \text{valor conhecido}|}{s} \times \sqrt{n} \quad (\text{Equação 8})$$

A tabela a seguir mostra os valores de $t_{\text{calculado}}$ para cada um dos elementos:

Tabela 7. Valores de $t_{\text{calculado}}$ para o teste t

Elementos	$t_{\text{calculado}}$
Fe	1,206
Ca	3,657
Mg	3,725
K	0,506
Cu	1,751

Observando a tabela acima, nota-se que para todos os elementos $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, dessa forma os dois valores comparados são significativamente equivalentes, e isto demonstra a exatidão do método empregado pela digestão total das amostras alimentares.

4.3) Temperaturas ótimas de pirólise e atomização: determinação de Cu por ET AAS

Como foi descrito na seção 1.6, a otimização do processo de pirólise e atomização foi realizada para as soluções da digestão ácida e do ensaio de bioacessibilidade. As curvas de pirólise e atomização do cobre estão representadas na Figura 7. Para a pirólise, a temperatura ótima é a anterior que começa a queda de absorvância; enquanto para a atomização é a que apresenta melhor relação entre: maior absorvância e melhor sinal transiente (WELZ e SPERLING, 2008).

Figura 7. Curvas de pirólise e atomização para uma solução de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de Cu na matriz de digestão ácida ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$) e do teste de bioacessibilidade *in vitro* (suco gástrico + fluido intestinal). A temperatura de atomização para a curva de pirólise foi de 2100°C ; já a temperatura de pirólise para as curvas de atomização foi de 1200°C , em ambas utilizou-se o modificador e Pd e Mg.

Portanto, as temperaturas de pirólise e atomização selecionadas durante o processo de otimização das condições operacionais do ET AAS para determinação de Cu nas duas matrizes estão sumarizadas na Tabela 8.

Tabela 8. Melhores temperaturas de pirólise e atomização para determinação de Cu nas matrizes de digestão total e teste de bioacessibilidade *in vitro* empregando a mistura Pd+Mg como modificador químico

Matriz	T pirólise ($^\circ\text{C}$)	T atomização ($^\circ\text{C}$)
Digestão total	1200	2000
Teste de bioacessibilidade	1200	2200

Dessa forma, as determinações de cobre ocorreram de acordo com esses parâmetros de temperatura.

4.4) Quantidades totais e bioacessíveis de ferro presentes nos alimentos

As quantidades totais de ferro presente nos alimentos foram determinadas por meio da digestão total das amostras (conforme seção 3.7) e posteriormente as soluções resultantes da digestão foram analisadas por F AAS. As quantidades bioacessíveis de ferro foram determinadas usando o teste de bioacessibilidade *in vitro* descrito na seção 3.9. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata das medidas.

Os valores de porcentagem de bioacessibilidade foram calculados usando a seguinte expressão matemática:

$$\% B = \frac{[TB]}{[T]} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde [TB] é a concentração de ferro obtida pelo teste de bioacessibilidade *in vitro*, e [T] é a concentração total de ferro no alimento analisado, obtida pela digestão total do mesmo. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Quantidades totais e bioacessíveis de ferro determinado nos alimentos analisados

Alimentos	Digestão total (mg/100g)	Ensaio de bioacessibilidade (mg/100g)	Porcentagem de bioacessibilidade (%)
Feijão cozido	8,04 ± 1,11 ^a	2,82 ± 0,39 ^{a,c}	39,2 ± 2,8 ^{a,d}
Espinafre cru*	27,4 ± 2,5 ^b	4,68 ± 0,60 ^b	17,2 ± 3,3 ^{b,c}
Espinafre cozido*	31,03 ± 1,34 ^b	5,39 ± 0,26 ^b	17,4 ± 0,8 ^{b,c}
Brócolis cru*	11,82 ± 0,12 ^c	3,36 ± 0,52 ^c	28,4 ± 4,5 ^{a,b}
Brócolis cozido*	8,14 ± 1,86 ^a	3,11 ± 0,10 ^a	38,2 ± 2,8 ^a
Açaí	6,61 ± 0,86 ^{a,c}	2,12 ± 0,10 ^{a,c}	32,4 ± 3,4 ^{a,d}
Cupuaçu	2,66 ± 0,32 ^d	0,68 ± 0,17 ^d	30,1 ± 0,9 ^a
Caju	1,36 ± 0,15 ^d	0,25 ± 0,05 ^d	18,6 ± 3,2 ^{b,e}
Melado	2,14 ± 0,20 ^d	0,77 ± 0,08 ^d	36,0 ± 4,9 ^{a,d}
Beterraba crua	1,95 ± 0,10 ^d	0,19 ± 0,1 ^d	9,6 ± 2,0 ^c
Beterraba cozida	1,30 ± 0,30 ^d	0,55 ± 0,10 ^d	43,9 ± 9,0 ^d
Fígado bovino cru*	16,44 ± 0,26 ^e	15,36 ± 0,1 ^e	93,3 ± 2,1 ^e
Fígado bovino grelhado*	15,75 ± 2,60 ^e	6,88 ± 0,19 ^f	43,7 ± 1,6 ^d

*as amostras adquiridas para análise são diferentes entre si.

a,b,c,d,e,f: letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.5) Quantidades totais dos demais macro e micronutrientes determinados nos alimentos

As quantidades totais dos macro e micronutrientes, como o Ca, Mg, K e Cu, foram determinados por meio da digestão total das amostras, conforme seção 3.7. A tabela a seguir mostra a quantidade dos minerais determinados em todos os alimentos. Uma vez que os experimentos de digestão foram realizados em triplicata, os valores são apresentados como a média e o correspondente desvio padrão da triplicata das medidas.

Tabela 10. Quantidades totais dos micro e macroelementos determinados nos alimentos analisados

Alimentos	Elementos (mg do elemento/100 g de amostra alimentar seca)			
	K	Ca	Mg	Cu
Feijão cozido	1501 ± 41 ^a	350 ± 111 ^{a,d}	190 ± 4 ^{a,d}	1,47 ± 0,20 ^a
Espinafre cru*	5081 ± 128 ^b	2158 ± 32 ^b	849 ± 22 ^b	1,47 ± 0,06 ^a
Espinafre cozido*	6155 ± 323 ^c	2015 ± 130 ^b	805 ± 68 ^b	1,36 ± 0,11 ^a
Brócolis cru*	2894 ± 107 ^d	1284 ± 195 ^c	340 ± 6 ^c	0,58 ± 0,07 ^a
Brócolis cozido*	3161 ± 122 ^d	367 ± 37 ^{a,d}	156 ± 8 ^{s,d}	0,33 ± 0,02 ^a
Açaí	1084 ± 92 ^{e,g}	483 ± 13 ^d	129 ± 11 ^{a,e}	1,29 ± 0,12 ^a
Cupuaçu	1999 ± 98 ^f	68 ± 22 ^e	75 ± 2 ^{e,f}	1,55 ± 0,24 ^a
Caju	1354 ± 30 ^{a,e}	12 ± 2 ^e	80 ± 2 ^{e,f}	1,47 ± 0,23 ^a
Melado	735 ± 4 ^{g,i}	84 ± 10 ^e	63 ± 4 ^{e,f}	4,19 ± 0,24 ^a
Beterraba crua	3650 ± 112 ^h	198 ± 22 ^{a,e}	209 ± 3 ^d	0,72 ± 0,08 ^a
Beterraba cozida	2925 ± 132 ^d	185 ± 12 ^{a,e}	211 ± 32 ^d	1,42 ± 0,58 ^a
Fígado bovino cru*	1084 ± 1 ^{e,g}	25 ± 9 ^e	72 ± 9 ^{e,f}	109,1 ± 7,2 ^b
Fígado bovino grelhado*	612 ± 7,0 ⁱ	18 ± 0,4 ^e	42 ± 1,0 ^f	49,6 ± 3,9 ^c

*as amostras adquiridas para análise são diferentes entre si.

a,b,c,d,e,f,g,h,i: letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre a concentração total das amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.6) Quantidades bioacessíveis dos demais macro e micronutrientes determinados nos alimentos

As quantidades bioacessíveis de Ca, Mg, K e Cu foram determinadas utilizando o teste de bioacessibilidade *in vitro* de acordo com a seção 3.9. A tabela a seguir mostra os resultados obtidos. Os valores são apresentados como a média e desvio padrão da triplicata das medidas. Os valores em negrito e entre parênteses na tabela são as porcentagens de bioacessibilidade utilizando a Equação 9.

Tabela 11. Concentrações bioacessíveis dos macro e micronutrientes obtidas pelo teste de bioacessibilidade *in vitro* dos alimentos analisados

Alimentos	Elementos (mg do elemento/100 g de amostra alimentar seca)			
	K	Ca	Mg	Cu
Feijão cozido	1250 ± 92 ^A (83,3 ± 6,4)^{a,d}	53,0 ± 6,1 ^A (15,9 ± 3,9)^{a,b,c}	102 ± 16 ^{A,E} (53,7 ± 7,6)^{a,b}	1,3 ± 0,1 ^A (83,0 ± 3,4)^{a,d}
Espinafre cru*	3823 ± 385 ^B (75,1 ± 5,8)^{a,d}	7,1 ± 0,3 ^B (0,33 ± 0,01)^b	313 ± 59 ^B (36,8 ± 6,2)^{b,c}	0,6 ± 0,01 ^A (37,3 ± 1,7)^{b,c}
Espinafre cozido*	4164 ± 151 ^B (69,0 ± 1,6)^{a,d}	8,0 ± 1,6 ^{B,D} (0,40 ± 0,05)^{a,b}	201 ± 16 ^C (25,1 ± 3,3)^c	0,5 ± 0,1 ^A (33,1 ± 5,3)^c
Brócolis cru*	2722 ± 346 ^{C,D} (87,2 ± 12,4)^A	337 ± 16 ^C (26,6 ± 2,9)^c	216 ± 19 ^C (63,7 ± 5,8)^a	0,6 ± 0,04 ^A (102 ± 12)^{d,e}
Brócolis cozido*	2226 ± 212 ^D (75,7 ± 1,2)^{a,d}	61,6 ± 14,8 ^{A,E} (16,7 ± 2,5)^{a,b,c}	56 ± 5 ^{A,D} (35,7 ± 4,1)^{b,c}	0,3 ± 0,04 ^A (69,1 ± 10,0)^a
Açaí	265 ± 75 ^E (24,2 ± 5,1)^b	27,7 ± 2,8 ^{D,G} (5,7 ± 0,5)^{a,b,c}	88 ± 4 ^{A,F} (70,1 ± 3,4)^a	1,0 ± 0,2 ^A (71,2 ± 8,0)^{a,f}
Cupuaçu	2476 ± 80 ^{C,D} (124 ± 13,3)^c	62,6 ± 6,3 ^{A,E} (97,5 ± 10,5)^d	37 ± 9 ^{D,F,G} (49,6 ± 10,5)^{a,b}	1,5 ± 0,1 ^A (97,8 ± 12,5)^{d,f,g,h}
Caju	1010 ± 88 ^{A,F} (74,6 ± 6,2)^{a,d}	4,5 ± 0,8 ^B (37,1 ± 9,5)^{a,c}	21 ± 4 ^{D,G} (25,7 ± 4,7)^c	0,9 ± 0,2 ^A (74,3 ± 1,5)^{a,g}
Melado	650 ± 20 ^{A,E} (87,1 ± 1,3)^a	58,0 ± 1,2 ^{A,E} (69,5 ± 6,6)^e	36 ± 9 ^{D,F,G} (57,1 ± 10,6)^{a,b}	4,8 ± 0,3 ^A (115 ± 13)^{e,h}
Beterraba crua	2963 ± 321 ^C (81,3 ± 10,8)^{a,d}	48,6 ± 3,2 ^{A,F} (23,8 ± 0,9)^{a,b,c}	138 ± 14 ^{E,F,H} (66,7 ± 6,2)^a	0,5 ± 0,1 ^A (73,8 ± 15,6)^{a,g}
Beterraba cozida	2824 ± 412 ^{C,D} (89,8 ± 12,2)^a	74,9 ± 0,9 ^E (42,8 ± 2,8)^c	184 ± 12 ^{C,H} (91,7 ± 13)^d	0,7 ± 0,02 ^A (75,7 ± 3,4)^{a,d}
Fígado bovino cru*	683 ± 64 ^{A,E} (63,0 ± 5,8)^d	28,9 ± 0,6 ^{G,F} (102 ± 23)^d	47 ± 3 ^{A,G,I} (52,2 ± 0,4)^{a,b}	67,1 ± 0,9 ^B (61,5 ± 5,2)^{a,b}
Fígado bovino grelhado*	456 ± 14 ^{E,F} (74,6 ± 1,5)^{a,d}	16,3 ± 0,1 ^{B,G} (90,9 ± 2,0)^{d,e}	25 ± 0,4 ^{D,I} (59,7 ± 1,6)^a	35,1 ± 6,3 ^C (70,9 ± 11,9)^{a,g}

*as amostras adquiridas para análise são diferentes entre si.

os valores entre parênteses e em negrito são as porcentagens de bioacessibilidade (%B).
a,b,c,d,e,f,g,h: letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre a porcentagem de bioacessibilidade das amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

A,B,C,D,E,F,G,H,I: letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre a concentração bioacessível das amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.7) Conteúdo de ácido fítico nos alimentos analisados

O conteúdo de ácido fítico nos alimentos analisados foi determinado conforme descrito na seção 3.6. Tal determinação foi feita em todos os alimentos de origem vegetal, inclusive nas amostras cozidas. A Tabela 12 mostra os resultados obtidos na forma de média e desvio padrão da triplicata das medidas.

Tabela 12. 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)
Feijao cozido	0,42 ± 0,06 ^a
Espinafre cru*	0,08 ± 0,03 ^{b,c}
Espinafre cozido*	0,06 ± 0,01 ^{b,c}
Brócolis cru*	0,07 ± 0,02 ^{b,c}
Brócolis cozido*	0,03 ± 0,01 ^b
Açaí	0,13 ± 0,06 ^{b,c}
Cupuaçu	0,06 ± 0,02 ^{b,c}
Caju	0,12 ± 0,02 ^{b,c}
Melado	0,11 ± 0,04 ^{b,c}
Beterraba crua	0,14 ± 0,05 ^c
Beterraba cozida	0,10 ± 0,03 ^{b,c}

*as amostras adquiridas para análise são diferentes entre si.

a,b,c: letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre o conteúdo de ácido fítico das amostras analisadas segundo teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.8) Discussão dos resultados obtidos

Esta seção destina-se a discussão de todos os resultados apresentados nas seções anteriores (4.4 a 4.7), buscando evidenciar as informações e correlações obtidas por meio deles:

4.8.1) Influência do conteúdo de ácido fítico nas bioacessibilidades

O ácido fítico é um composto que possui a capacidade de se ligar a vários cátions de diversos elementos químicos nutricionalmente importantes para o organismo humano. O resultado dessa ligação é a formação de complexos insolúveis que são difíceis de serem hidrolisados durante a digestão humana, tornando os elementos menos disponíveis para a absorção e aproveitamento pelo organismo (REDDY e SATHE, 2001). Dessa forma, o ácido fítico atua na redução da bioacessibilidade dos nutrientes presentes nos 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 alimentos selecionados neste trabalho. Os gráficos foram construindo usando apenas os valores médios das porcentagens de bioacessibilidade, não considerando os desvios padrões.

Figura 8. Correlações entre as porcentagens de bioacessibilidade dos elementos e o conteúdo de ácido fítico. As letras próximas aos pontos de cada gráfico indicam o alimento correspondente. A = Feijão, B = Espinafre cu, C = Espinafre cozido, D = Brócolis cru, E = Brócolis cozido, F = Açaí, G = Cupuaçu, H = Caju, I = Melado, J = Beterraba crua, K = Beterraba cozida.

Nos alimentos, os elementos químicos nutrientes estão principalmente na forma de cátions com diversas valências. O ácido fítico, principalmente na forma de fitatos, possui a capacidade de se ligar aos cátions dos elementos nutrientes, diminuindo assim a bioacessibilidade destes nutrientes. Com isso, 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 ponto a ser destacado quando observamos os gráficos da Figura 8 é que a tendência esperada não pode ser diretamente evidenciada, pois em todos os gráficos, o feijão, que é o alimento com maior conteúdo de ácido fítico, não apresentou a menor porcentagem de bioacessibilidade mineral. No entanto, isso pode ser entendido, pois os gráficos da Figura 8 referem-se aos dados de alimentos diferentes, que possuem diferentes propriedades e características.

Com relação à porcentagem de bioacessibilidade do Ca, nota-se que os vegetais verdes (espinafre e brócolis) e o feijão apresentam uma porcentagem de bioacessibilidade deste elemento muito baixa quando comparada com os demais nutrientes, sendo que o espinafre (cru e cozido) se destaca devido à porcentagem nesse caso ser inferior a 1%. Isso mostra que nestes tipos de alimentos o cálcio possui uma maior propensão em se ligar ao ácido fítico do que os outros elementos. Além disso, sabe-se que os vegetais, principalmente o espinafre, possuem altas concentrações de ácido oxálico (WU *et al.*, 1999) que também é considerado um fator antinutricional, pois possui o efeito de formar sais com os minerais presentes nos alimentos, se ligando principalmente ao Ca para formação de cristais de oxalato de cálcio e com isso a sua precipitação no organismo, diminuindo a disponibilidade para a realização de numerosos processos fisiológicos (FABRE e TRUHAUT, 1971; MASSEY *et al.*, 1993).

Ao observarmos a porcentagem de bioacessibilidade do potássio, nota-se que as concentrações elevadas de ácido fítico não parecem influenciar a porcentagem de bioacessibilidade deste nutriente, uma vez que os alimentos que possuem a maior concentração de ácido fítico apresentam elevadas porcentagens de bioacessibilidade. Isto pode ser um indício de que o ácido fítico possui pouca tendência a se ligar ao cátion K^+ , e desse modo, a bioacessibilidade do potássio não é tão influenciada pelo teor de fitatos presentes nos alimentos analisados.

Deve-se lembrar de que quanto maior for a relação *carga/raio* do íon, maior é a tendência deste íon em formar um complexo com um ligante. 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 da sua carga. Os complexos formados entre o ácido fítico com os cátions metálicos possuem um efeito de blindar os cátions dos elementos durante a digestão gastrointestinal humana. Já foi relatado (VOHRA *et al.*, 1965) através de dados empíricos que, que os complexos formados entre os fitatos e os cátions metálicos seguem a seguinte ordem decrescente de força de interação:

E a ordem decrescente de estabilidade dos complexos mineral-fitatos é a seguinte:

Levando em consideração essas informações, pode-se esperar que o conteúdo de ácido fítico, dentre os nutrientes analisados, influencie significativamente a bioacessibilidade de Fe e Cu, pois os cátions desses elementos possuem maior força de interação com o ácido fítico quando comparado com os demais elementos. Observando os dados da Figura 8 nota-se que com o ferro, este fato é evidenciado uma vez que porcentagem de bioacessibilidade foi inferior a 50 % para todos os alimentos analisados. Para o Cu, a inibição do ácido fítico é menos evidente, pois os complexos Cu e fitato são solúveis no pH do trato gastrointestinal, em contraste dos complexos de ferro (CARBONARO *et al.*, 2001; SCHÜMANN e ELSENHANS, 2002; CÁMARA *et al.*, 2005; KHOUZAM *et al.*, 2011).

Pelas informações da Tabela 12 e da Figura 8 pode-se constatar que o processo de cozimento (usando apenas água Milli-Q) de alguns dos alimentos analisados provocou uma diminuição nos seus conteúdos de ácido fítico. Essa diminuição é maior para alimentos que foram submetidos ao aquecimento em temperaturas maiores, como por exemplo, a beterraba. O ácido fítico é estável nas temperaturas comuns de cozimento (REDDY e SATHE, 2001), 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 contidas no próprio alimento que são ativadas devido às temperaturas atingidas durante o cozimento.

Outro fato a ser considerado é que, embora exerça uma influência relevante, o conteúdo de ácido fítico não é o único fator que afeta a bioacessibilidade de um elemento químico presente em um alimento. Algumas outras características, tais como o ácido oxálico (DEL-VECHIO *et al.*, 2005) já mencionado anteriormente, o conteúdo de fibras (MCCANCE e WIDDOWSON, 1942) e a natureza das proteínas (REDDY e SATHE, 2001) presentes em um alimento também podem influenciar de maneira significativa as porcentagens de bioacessibilidade mineral.

Além do efeito inibidor sobre a bioacessibilidade dos minerais, o ácido fítico ingerido na dieta pode gerar vários efeitos benéficos para a saúde, tais como prevenção de pedras nos rins, proteção contra diabetes mellitus, doença coronariana, bem como uma variedade de cânceres (THOMPSON, 1993; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2003). Assim, os alimentos que possuem uma boa bioacessibilidade mineral dos macro e micronutrientes mesmo contendo um conteúdo significativo de ácido fítico possuem uma grande importância para a nutrição humana, pois combinam a disponibilização satisfatória dos nutrientes essenciais para o organismo humano aos efeitos benéficos que o ácido fítico (fitatos) pode gerar.

4.8.2) Discussão geral sobre as concentrações totais e bioacessíveis dos nutrientes

A seguir, descreve-se uma discussão geral sobre as concentrações totais e bioacessíveis estimadas para cada elemento nos alimentos analisados:

4.8.2.1) Ferro

Com base nos dados da Tabela 9, construiu-se a Figura abaixo para exemplificar a relação entre as concentrações totais e as concentrações bioacessíveis de ferro obtidas para os alimentos analisados:

Figura 9. Concentração total e bioacessível de ferro nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido).

Observando os resultados apresentados na Figura 9 da Tabela 9 nota-se que dentre todos os alimentos analisados, o que apresenta maior quantidade de ferro é o espinafre, tanto cru quanto cozido, com valor superior a 25 mg de Fe/100 g da amostra seca, se destacando dos demais alimentos. Ainda considerando a quantidade total de ferro, o fígado bovino, assim como o feijão, o brócolis e o açaí também apresentaram altas concentrações deste nutriente quando comparados com os demais alimentos. É importante ressaltar que o teor de um elemento químico específico, em um dado alimento, depende da variedade alimentar e das condições ambientais em que tal alimento se desenvolveu, considerando os alimentos de origem vegetal. Este último aspecto inclui fatores tais como o tipo de solo em que a planta que gera o alimento de interesse foi cultivada, as condições de irrigação, tipos e quantidade de adubação do solo, condições climáticas em geral, dentre outros.

Levando em consideração os alimentos analisados, como a maioria são derivados de espécies vegetais, com exceção do fígado bovino, a influência de todos os fatores citados torna-se ainda mais relevante, uma vez que as condições de clima e de solo influenciam diretamente as características de uma espécie vegetal. Dessa forma, a

quantidade total de um elemento químico em um determinado alimento, depende unicamente das características do alimento analisado, e não pode ser generalizada para qualquer outra amostra alimentar da mesma variedade.

Ainda com base na Figura 9, nota-se pelas concentrações bioacessíveis de ferro dos alimentos, que nem todo conteúdo de um nutriente presente em um dado alimento é passível de ser liberado da matriz do alimento durante a digestão gastrointestinal humana, tornando-se disponível para absorção e dessa forma utilizado pelo organismo.

Considerando os resultados obtidos para a quantidade total de ferro nos alimentos analisados, pode-se dizer que o espinafre é o mais nutritivo de todos, porém ao considerar a bioacessibilidade deste elemento, evidencia-se que o espinafre não é o alimento mais eficiente na disponibilização de Fe no organismo, uma vez que a concentração bioacessível deste elemento é baixa quando comparada com a concentração total do mesmo.

Vale ressaltar que a concentração de ferro bioacessível obtida para o açaí é maior que as concentrações obtidas para as demais frutas da região norte e nordeste. O valor encontrado está bem próximo ao da concentração obtida para o feijão, o que mostra que esta fruta, que não é muito conhecida pela população brasileira, é uma boa fonte de ferro na alimentação, com valores próximos ao dos alimentos conhecidos como sendo ricos neste nutriente.

Com base nas porcentagens de bioacessibilidade, nota-se que com exceção do fígado bovino, todos os alimentos analisados apresentaram bioacessibilidade de Fe inferior a 50%. Este fato pode ter relação, principalmente, com o conteúdo de ácido fítico presente nestes alimentos, uma vez que os mesmos são de origem vegetal, e com isso formam complexos insolúveis que são difíceis de serem hidrolisados durante a digestão humana, atuando na redução da bioacessibilidade dos elementos químicos, como o ferro (REDDY e SATHE, 2001).

Além disso, a biodisponibilidade de ferro em alimentos de origem vegetal é baixa devido às concentrações relativamente baixas de aminoácidos, especialmente a cisteína, e a ausência de proteínas da carne, o que normalmente aumenta a biodisponibilidade deste analito (CARBONARO *et al.*, 2001; MENG *et al.*, 2005; KHOUZAM *et al.*, 2011).

Ainda com relação aos alimentos de origem vegetal, nota-se que a porcentagem de bioacessibilidade tornou-se maior para os alimentos que foram submetidos ao processo de cozimento, como o brócolis e a beterraba. Quando os alimentos são cozidos

em água as maiores das suas proteínas tornam-se desnaturadas e as fibras naturais perdem suas características próprias, dessa forma os elementos químicos que originalmente estavam associados às proteínas e fibras ficam mais livres dessa interação e, desse modo, são mais suscetíveis a serem liberados da matriz dos alimentos nas condições do teste de bioacessibilidade *in vitro*.

Comparando-se os valores de ferro bioacessível obtidos para as duas amostras de fígado bovino, nota-se que quantidade deste nutriente na amostra crua é muito maior que na amostra de fígado bovino grelhado. Isto está relacionado ao processo de cocção do alimento, uma vez que os processos térmicos nos quais a carne é submetida representam um fator importante para bioacessibilidade deste nutriente, pois relacionam a variabilidade do conteúdo de ferro heme presente nas carnes (LOMBARDI-BOCCIA, G. *et al.*, 2002).

Visto que a maior parte do ferro contido em carnes vermelhas está na forma de ferro heme, o aquecimento deste tipo de alimento faz com que o ferro seja liberado do complexo heme, devido a desnaturação das proteínas como a hemoglobina e mioglobina, seguida por uma liberação e degradação da molécula heme, e dessa forma o ferro é convertido, em diferentes graus, em ferro iônico (KRISTENSEN e PURSLOW, 2001). Essa conversão afeta significativamente a biodisponibilidade do ferro, visto que a forma não-heme deste nutriente é absorvida de forma menos expressiva que a forma heme, e por isso a concentração do ferro no extrato bioacessível é menor em amostras que foram submetidas a processos térmicos.

4.8.2.2) Cálcio

Por meio dos resultados presentes na Figura 10, pode-se observar que o espinafre, o brócolis e o açaí apresentaram a maior concentração total de Ca, porém com relação à bioacessibilidade esses alimentos não são os mais eficientes na disponibilização deste nutriente no organismo.

Figura 10. Concentração total e bioacessível de cálcio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido).

Para o espinafre, tanto cru quanto cozido, a bioacessibilidade de Ca foi muito baixa (inferior a 1 %), e este fato pode estar relacionado ao conteúdo de ácido fítico e de ácido oxálico presentes neste alimento. No que se diz respeito ao fígado bovino, a porcentagem de bioacessibilidade deste nutriente chega a praticamente 100 %, em ambas as amostras (crua e grelhada), evidenciando a importância do fígado bovino na dieta para suprir as necessidades diárias de Ca.

4.8.2.3) Magnésio

Ao observarmos a Figura 11, nota-se que o espinafre foi o alimento que apresentou a maior concentração total deste nutriente, porém a bioacessibilidade estimada para o Mg foi baixa (25 % - 38 %), indicando que as composições química dos alimentos podem interferir na liberação dos minerais durante a digestão no trato gastrointestinal humano.

Figura 11. Concentração total e bioacessível de magnésio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido).

Como já discutido anteriormente (seção 4.8.1), a baixa concentração bioacessível do Mg pode ser atribuído ao conteúdo considerável de fatores antinutricionais presentes neste alimento.

4.8.2.4) Potássio

O potássio é o elemento que presente em concentrações elevadas em praticamente todas as variedades alimentares. Pelos resultados da Tabela 10 e 11, nota-se que quando comparado aos demais elementos, o potássio é o elemento químico que apresentou a maior concentração total e bioacessível nos alimentos analisados. Com base na Figura 12, observa-se que com exceção do açaí, a concentração bioacessível deste nutriente é bastante elevada para os demais alimentos, ficando bem próxima da concentração do total do mesmo. Dessa forma, a porcentagem da bioacessibilidade do potássio foi superior a 60 % para praticamente todos os alimentos, chegando a 100% para o Cupuaçu.

Figura 12. Concentração total e bioacessível de potássio nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido).

Com relação aos vegetais, este resultado justifica-se levando em conta que este nutriente é um elemento químico essencial para o crescimento de qualquer variedade de planta, sendo um dos elementos químicos utilizados em maior quantidade durante a vida de um vegetal. Dentre outras funções no crescimento das plantas, o potássio (principalmente na forma de K^+) atua na regulação dos estômatos, estruturas fundamentais para a transpiração, que é um processo essencial para a vida de uma espécie vegetal, e por isso é esperado que a concentrações deste elemento sejam consideravelmente maiores em relação aos demais nutrientes.

4.8.2.5) Cobre

Os resultados presentes na Figura 13 demonstram que com relação à concentração total e bioacessível de cobre, o fígado bovino, tanto cru quanto grelhado, apresentou a maior concentração de todas. Este fato é justificado, pois como dito anteriormente, as vísceras, como o fígado, são ótimas fontes alimentares deste nutriente.

Figura 13. Concentração total e bioacessível de cobre nos alimentos analisados (A: Feijão; B: Espinafre cru; C: Espinafre cozido; D: Brócolis cru; E: Brócolis cozido; F: Açaí; G: Cupuaçu; H: Caju; I: Melado; J: Beterraba crua; K: Beterraba cozida; L: Fígado bovino cru; M: Fígado bovino cozido).

Com relação aos alimentos de origem vegetal, nota-se que não existe diferença significativa entre as concentrações totais e bioacessíveis de cobre nestes alimentos. Pela Tabela 11 observa-se que a porcentagem de bioacessibilidade deste nutriente é elevada para praticamente todos os alimentos analisados, comprovando que mesmo que haja a complexação dos fitatos presentes nesses alimentos com o cobre, os mesmos são solúveis no pH do trato gastrointestinal e por isso afetam pouco a disponibilização deste nutriente para organismo humano (CARBONARO *et al.*, 2001; SCHÜMANN e ELSSENHANS, 2002; CÁMARA *et al.*, 2005).

4.9) Determinação de ferro heme nas amostras de fígado bovino

As determinações de ferro heme foram feitas em amostras de fígado bovino grelhadas em diferentes temperaturas. A tabela abaixo mostram os resultados obtidos.

Tabela 13. Concentrações de ferro total, ferro heme (HFe) e porcentagem de ferro heme (%HFe) presentes em amostras de fígado bovino

Amostra	Fe total (µg/g)	HFe (µg/g)	% HFe
Crua	164,4 ± 0,30	91,90 ± 4,20	55,94 ± 3,23
90°C	92,0 ± 2,8	34,96 ± 1,87	37,50 ± 0,92
120°C	79,6 ± 4,1	25,28 ± 1,73	32,25 ± 0,18
150°C	115 ± 2,9	36,90 ± 2,48	31,73 ± 1,32
190°C	133 ± 6,0	44,99 ± 1,11	32,83 ± 0,31

Com base na Tabela 13, nota-se que a concentração de ferro total na amostra de fígado cru é maior que as demais amostras analisadas. Este fato está relacionado ao processo de cozimento que as carnes foram submetidas. Como as amostras foram grelhadas em diferentes temperaturas, parte do sulco presente nas mesmas é liberado durante este processo, e por isso uma parcela dos nutrientes contidos na carne é liberada junto com o líquido que ela perde na cocção, dessa forma a concentração dos elementos químicos diminui, e por isso a concentração total dos mesmos torna-se menor.

Ao observarmos a porcentagem de ferro heme presente nas amostras, pode-se constatar que o aquecimento provoca uma diminuição considerável no conteúdo de ferro heme presentes na carne. A diminuição da porcentagem de ferro heme variou entre 33 % para a amostra grelhada a 90 °C a 43 % para a amostra grelhada a 150 °C.

O decréscimo no conteúdo de ferro heme presente nas carnes que são submetidas ao aquecimento está relacionado à clivagem oxidativa do anel de porfirina em que o Fe está contido (Figura 1), o que permite a liberação do ferro do complexo heme (SCHRICKER e MILLER, 1983).

Já foi demonstrado que em carnes cozidas, as hemoproteínas não liberam sua porção heme durante a desnaturação pelo aquecimento, e nesse caso a maior parte do grupo heme ainda está ligado a proteína, e que o aumento na liberação do ferro do complexo heme só ocorre em temperaturas elevadas, de 85 °C a 100 °C (HAN *et al.*, 1993). Sendo assim, uma vez que as temperaturas de cocção analisadas nesta

dissertação de mestrado foram elevadas, variando de 90 °C a 190 °C, a diminuição da porcentagem de ferro heme nas amostras de fígado bovino também foi alta, sendo superior a 40 % na maioria dos casos.

Com relação ao estudo da influência da temperatura na diminuição da concentração de ferro heme em carnes cozidas outros trabalhos na literatura mostraram uma reduzida taxa de desnaturação da mioglobina em temperaturas até 55 °C (GEILESKEY *et al.*, 1998), porém um aumento significativo foi demonstrado em temperaturas superiores a 55 °C (KRISTENSEN e PURSLOW, 2001).

5) Conclusões

As análises dos alimentos estudados permitem constatar que com relação à composição centesimal dos mesmos, o fígado bovino, assim como o espinafre são alimentos que podem ser usados na dieta humana como fontes importantes de proteínas, e o Açaí é uma fruta que pode ser usada na dieta como fonte de energia, pois possui um alto valor energético.

Com relação às concentrações totais e bioacessíveis de ferro nos alimentos, é possível constatar que o alimento que possui a maior quantidade deste nutriente é o espinafre, porém a bioacessibilidade de ferro no mesmo é muito baixa, provavelmente devido a alta quantidade de ácido oxálico e ácido fítico presentes neste alimento. Foi possível observar também que o açaí apresenta concentrações bioacessíveis de ferro próximas aos valores das concentrações dos alimentos mais conhecidos da população brasileira, o que demonstra o potencial nutritivo desta fruta típica da região amazônica, abrindo opções para dietas mais saudáveis que atendam as necessidades diárias de ferro.

Dentre os alimentos analisados, o fígado bovino cru foi o que apresentou o melhor resultado para a concentração de ferro bioacessível, porém quando o mesmo é submetido a processos de cozimento, a bioacessibilidade deste nutriente diminui consideravelmente, comprovando a influência do aquecimento na composição de ferro heme presente neste alimento, e consequentemente na absorção deste nutriente pelo organismo humano.

A cocção das amostras de fígado bovino em diferentes temperaturas causou uma diminuição de até 43% no conteúdo de ferro heme nas mesmas, mostrando que a redução da concentração de ferro durante o processo de cocção pode ser controlada utilizando condições de preparo mais suaves que promovam uma estabilidade do grupo heme presentes na carne.

Com respeito aos macro e micronutrientes analisados, o potássio foi o elemento que apresentou a maior bioacessibilidade dentre os outros elementos analisados, além de estar presente em grandes quantidades em todos os alimentos, comprovando o fato deste elemento ser fundamental no crescimento de qualquer espécie vegetal. Pelos valores de bioacessibilidade, conclui-se ainda que alguns alimentos, como o fígado bovino, são fontes importantes de todos os nutrientes estudados, possuindo quantidades maiores que os outros alimentos analisados.

Sobre a concentração de ácido fítico pôde-se concluir que os fitatos possuem diferentes intensidades de ligação com os cátions dos elementos nutrientes presentes nos alimentos analisados, desse modo, a influência dos fitatos na bioacessibilidade é maior para alguns elementos e menor para outros, dependendo da estabilidade dos complexos formados. Levando em consideração que o ácido fítico também pode apresentar efeitos benéficos para a saúde, os resultados permitiram concluir que o feijão, que foi o alimento que apresentou a maior concentração de ácido fítico, possui notáveis propriedades funcionais, pois combina o maior conteúdo de ácido fítico com boas quantidades bioacessíveis dos macro e micronutrientes analisados.

6) Referências Bibliográficas

AMMERMAN, C. B. Methods for estimation of mineral bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H. e LEWIS, A. J. (Ed.). **Bioavailability of Nutrients for Animals**. San Diego: Academic Press, 1995. cap. 4, p.83-94. ISBN 978-0-12-056250-3.

ASKAR, A.; EL-SAMAHY, S. K.; ABD EL-FADEEL, M. G. Phytinsäure in Lebensmittel. **Alimenta**, v. 22, p. 131-137, 1983.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.

BENJAKUL, S.; BAUER, F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 207-217, 2001.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORGES, D. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica** n. 18, 2005.

BROWN, E. C.; HEIT, M. L.; RYAN, D. E. PHYTIC ACID: AN ANALYTICAL INVESTIGATION. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1290-1297, 1961.

BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTÉN, 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. **The Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 442-449, 1992.

CÁMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R.; CLEMENTE, G. Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 481-489, 2005.

CAPAR, S. G.; SZEFER, P. Methods of Analysis of Food Components and Additives. In: OTLES, S. (Ed.): Taylor & Francis, 2005. cap. 6, (Determination and Speciation of trace elements in foods). ISBN 9780203503751.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; MATTERA, M.; AGUZZI, A.; PUSZTAI, A. Investigation of the mechanisms affecting Cu and Fe bioavailability from legumes. **Biological Trace Element Research**, v. 84, n. 1-3, p. 181-196, 2001.

CHEN, C. C.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I.; FOOLADI, M. H.; KU, P. K. Some Factors Influencing the Nonheme Iron Content of Meat and Its Implications in Oxidation. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 581-584, 1984.

DE FARIAS, R. F. **Química de coordenação: fundamentos e atualidades**. Ed. Átomo, 2005. p.245-246. ISBN 9788576700098.

DEL-VECHIO, G.; CORRÊA, A. D.; PATTO DE ABREU, C. M.; DOS SANTOS, C. D. Efeito do tratamento térmico em sementes de abóbora (*Cucurbita* spp.) sobre os níveis de fatores antinutricionais e/ou tóxicos **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n. 2, p. 369-376, 2005.

DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M. A. P. Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 631-639, 2008.

DIONÍSIO, A. G. G.; DE JESUS, A. M. D.; AMAIS, R. S.; DANOTI, G. L.; MIRANDA, K. A.; GUERRA, M. B. B.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Old and New Flavors of Flame (Furnace) Atomic Absorption Spectrometry. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2011, 2011.

DO NASCIMENTO DA SILVA, E.; LEME, A. B. P.; CIDADE, M.; CADORE, S. Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. **Talanta**, v. 117, n. 0, p. 184-188, 2013.

FÁBIO ALAN CARQUEIJA, A.; IVON PINHEIRO, L.; VERA LUCIA, C. S. S.; SÉRGIO LUIS COSTA, F. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7,

FABRE, R.; TRUHAUT, R. **Toxicologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1971. p.187.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of nutrients. In: MACRAE, R.;ROBINSON, R. e SADLER, M. J. (Ed.). **Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**: Academic Press, 1993. p.384-388. ISBN 9780122268502.

FENNEMA, S. D. K. L. P. O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2010. ISBN 9788536323343.

GEILESKEY, A.; KING, R. D.; CORTE, D.; PINTO, P.; LEDWARD, D. A. The kinetics of cooked meat haemoprotein formation in meat and model systems. **Meat Science**, v. 48, n. 3–4, p. 189-199, 1998.

GOMEZ-BASAURI, J. V.; REGENSTEIN, J. M. Processing and Frozen Storage Effects on the Iron Content of Cod and Mackerel. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 6, p. 1332-1336, 1992a.

GOMEZ-BASAURI, J. V.; REGENSTEIN, J. M. Vacuum Packaging, Ascorbic Acid and Frozen Storage Effects on Heme and Nonheme Iron Content of Mackerel. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 6, p. 1337-1339, 1992b.

HAN, D.; MCMILLIN, K. W.; GODBER, J. S.; BIDNER, T. D.; YOUNATHAN, M. T.; MARSHALL, D. L.; HART, L. T. Iron Distribution in Heated Beef and Chicken Muscles. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 697-700, 1993.

HAUG, W.; LANTZSCH, H.-J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 12, p. 1423-1426, 1983.

HENRY, P. R.; BENZ, S. A. 10 - Magnesium bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H. e LEWIS, A. J. (Ed.). **Bioavailability of Nutrients for Animals**. San Diego: Academic Press, 1995. p.201-237. ISBN 978-0-12-056250-3.

HORNSEY, H. C. The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 7, n. 8, p. 534-540, 1956.

HURRELL, R. F. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 74, n. 6, p. 445-52, 2004.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 876-886, 2006.

JYOTHI LAKSHMI, A.; KAUL, P. Nutritional potential, bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1821-1826, 2011.

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

KHOUZAM, R. B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v. 86, n. 0, p. 425-428, 2011.

KRISTENSEN, L.; PURSLOW, P. P. The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the heme- nonheme-iron ratio in meat. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 433-439, 2001.

KULKARNI, S. D.; ACHARYA, R.; RAJURKAR, N. S.; REDDY, A. V. R. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 681-688, 2007.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

LAI, J. F.; DOBBS, J.; DUNN, M. A. Evaluation of clams as a food source of iron: Total iron, heme iron, aluminum, and in vitro iron bioavailability in live and processed clams. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, n. 1, p. 47-55, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2005. ISBN 9780716743392.

LEI, X.; STAHL, C. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 474-481, 2001.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, B.; AGUZZI, A. Total Heme and Non-heme Iron in Raw and Cooked Meats. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1738-1741, 2002.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, B.; AGUZZI, A.; RINCÓN-LEÓN, F. Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 505-510, 2002.

LOPEZ, H. W.; LEENHARDT, F.; COUDRAY, C.; REMESY, C. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 727-739, 2002.

LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. In: (Ed.). 4ª Edição: Ministério da Saúde, 2005. ISBN 9788533410381.

MASSEY, L. K.; ROMAN-SMITH, H.; SUTTON, R. A. L. Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, n. 8, p. 901-906, 1993.

MCCANCE, R. A.; WIDDOWSON, E. M. Mineral metabolism of healthy adults on white and brown bread dietaries. **The Journal of Physiology**, v. 101, n. 1, p. 44-85, 1942.

MENG, F.; WEI, Y.; YANG, X. Iron content and bioavailability in rice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 333-338, 2005.

MERTENS-TALCOTT, S. U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S. T.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7796-7802, 2008.

MILLER, E. R. 13 - Potassium bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H. e LEWIS, A. J. (Ed.). **Bioavailability of Nutrients for Animals**. San Diego: Academic Press, 1995. p.295-301. ISBN 978-0-12-056250-3.

MOREIRA, R. F.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, n. 2, 2004.

OBERLEAS, D. The Role of Phytate in Zinc Bioavailability and Homeostasis. In: (Ed.). **Nutritional Bioavailability of Zinc**: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, v.210, 1983. cap. 10, p.145-158. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-0760-7.

PENA, R. S.; MENDONÇA, N. B.; ALMEIDA, M. D. C. Comportamento higroscópico do açaí em pó. **Revista brasileira de produtos agroindustriais** v. 12, p. 153-161, 2010.

RABOY, V. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. **Trends Plant Sci**, v. 6, n. 10, p. 458-62, 2001.

RABOY, V. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1033-1043, 2003.

RABOY, V.; NOAMAN, M. M.; TAYLOR, G. A.; PICKETT, S. G. Grain Phytic Acid and Protein are Highly Correlated in Winter Wheat. **Crop Sci.**, v. 31, n. 3, p. 631-635, 1991.

RAMOS, A.; CABRERA, M. C.; SAADOUN, A. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 116-124, 2012.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food Phytates**. Taylor & Francis, 2001. ISBN 9781566768672.

RÍOS-CASTILLO, I.; OLIVARES, M.; BRITO, A.; ROMAÑA, D. L. D.; PIZARRO, F. One-month of calcium supplementation does not affect iron bioavailability: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 44-48, 2014.

SANDBERG, A. S. Bioavailability of minerals in legumes. **Br J Nutr**, v. 88, n. 3, p. S281-S285, 2002.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006.

SCHRICKER, B. R.; MILLER, D. D. Effects of Cooking and Chemical Treatment on Heme and Nonheme Iron in Meat. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 4, p. 1340-1343, 1983.

SCHÜMANN, K.; ELSENHANS, B. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 16, n. 3, p. 139-144, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6ª Ed. Thomson Brooks/Cole, 2007. p.336-342. ISBN 9780495012016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8ª Ed. Cengage Learnin, 2006. p.748-749, 761. ISBN 9788522104369.

THOMPSON, L. U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Research International**, v. 26, n. 2, p. 131-149, 1993.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 30, n. 1, p. 1-22, 1991.

UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALEZ, M. Essentiality of copper in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 952S-959S, 1998.

VOHRA, P.; GRAY, G. A.; KRATZER, F. H. Phytic acid-metal complexes. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 120, n. 2, p. 447-9, 1965.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Cancer Inhibition by Inositol Hexaphosphate (IP6) and Inositol: From Laboratory to Clinic. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3778S-3784S, 2003.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry: what can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, 2003.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. Wiley, 2008. ISBN 9783527611683.

WU, F.; HE, Z.; LUO, Q.; ZENG, Y. E. HPLC determination of oxalic acid using tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) chemiluminescence—application to the analysis of spinach. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 543-546, 1999.