

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Zinco eritrocitário e zinco alimentar:
validação de metodologia analítica e
avaliação em mulheres da Comunidade da USP**

Hosana Gonçalves dos Santos

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre**

**Orientadora :
Profª Dra. Célia Colli**

**SÃO PAULO
2003**

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005519

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Hosana Gonçalves dos
S237z Zinco eritrocitario e zinco alimentar : validação de metodologia
analítica e avaliação em mulheres da Comunidade da USP Hosana
Gonçalves dos Santos. -- São Paulo, 2003.
70p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Colli, Célia

I. Zinco : Ciência dos alimentos I. T. II. Colli, Célia,
orientador.

641.17 CDD

Hosana Gonçalves dos Santos

**Zinco eritrocitário e zinco alimentar:
validação de metodologia analítica e
avaliação em mulheres da Comunidade da USP**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof^a Dra. Célia Colli
orientadora/presidente**

1º examinador

2ºexaminador

São Paulo, ____ de _____ de 2003.

*Haveria coisa difícil ao Senhor?
Ao tempo determinado tornarei a ti
por este tempo da vida,
e Sara terá um filho.
Gênesis 18:14*

*Obrigada meu Deus
pelo sonho realizado*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Prof^a Dra. Célia Collí, minha orientadora, que acreditou no meu potencial, pelo carinho e apoio.

À Prof^a Dra. Elvira Maria Guerra Shinozuka, que é responsável pela minha iniciação e meu amor à pesquisa.

Às voluntárias pertencentes a comunidade da USP pela contribuição a este projeto. Sem elas esta pesquisa não existiria.

Às técnicas do Laboratório de Nutrição Helena Chiebao e Ivanir Soares pela amizade e ajuda nos momentos críticos.

Às Secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e aos Secretários do Curso de Pós Graduação : Ângela L. De Oliveira, Isabel C. Bossi, Mônica D. Perussi, Benedita C.S. Oliveira, Jorge A. de Lima, Elaine M. Ychico, pela pronta disposição em ajudar-me sempre que solicitado.

Às funcionárias do Bloco 14: Joana A Santos e Maria de Lourdes Pedrosa, pelo carinho e sorriso diários.

À querida Dra. Fátima Sardinha que foi um espelho pra mim, devido à sua garra e paciência.

À Doutoranda Luciana Bueno e Mestre Eliane Marí pela análise estatística do trabalho.

À Bibliotecária Josuelita Gonçalves dos Santos pela revisão bibliográfica.

Às queridas amigas do laboratório Lílíana Mistura, Aline Amorim, Luciana Bueno, Raquel Simões, Maria Lúcia Cocato, Eliane Marí pela amizade e pelos momentos que passamos juntos que jamais serão esquecidos.

À meu pai Edgard Gonçalves dos Santos, minha mãe Carmen Lídia Moraes dos Santos, que amo muito, pelo carinho, incentivo fundamentais para que eu continuasse este trabalho.

A meu irmão Eliel G. dos Santos e sua esposa Elíana dos Santos e minha querida sobrinha Camila pelo apoio e compreensão nos momentos que estive ausente nas reuniões de família.

À minha irmã Mirian G. dos Santos pelo colo nas horas difíceis.

À minha tia Josuelita G. dos Santos e a minha vó Anesia Lima dos Santos agradeço pelo apoio dado na hora certa.

Ao meu companheiro Marco António Aguiar Pereira pelas palavras de carinho e amor.

Às minhas amigas do coração Lí Chiu Chih (Lia), Eva Teixeira, Maria Aparecida Ferreira (Cidinha), Vera Regina Aparcida Farias e Marcia Cristiane Moraes que me ajudaram nas horas mais difíceis da minha vida.

Ao Mateus, meu vizinho de 3 anos, que brincou de carrinho comigo várias vezes.

Aos meus amigos Denilson Artur Moreira, Nelson de Antônio, Osni F. Queiroz, Ederaldo L. Nieri e Rogério Silva, Nelson Francisco de Jesus, Luciano Tavares que apoiaram e incentivaram o meu trabalho.

À diretora da escola Carolina Cintra da Silveira Daletti Alves Souza e as vices - diretoras Cleide Terezinha e Marisa Luz pelo apoio.

Aos alunos Paulo Cesar Oliveira, Francisca Neila Gonçalves, Rute Oliveira, Anne Cristine Silva, Lílíane Alves Pires que acreditaram em minha pessoa apesar das dificuldades.

À direção, professores e alunos da Escola Carolina Cintra da Silveira, onde eu leciono, que sempre perguntaram: acabou a tese, professora Hosana? Agora eu posso responder, graças a Deus, acabei!!!

À todos que direta e indiretamente colaboraram comigo na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Distribuição de zinco no organismo.....	3
2.2. Fontes alimentares de zinco.....	4
2.3. Absorção e excreção de zinco.....	4
2.4. Deficiência de zinco	5
2.5. Indicadores do Estado Nutricional em zinco.....	7
2.6. Validação de metodologia analítica.....	10
2.6.1 Linearidade.....	11
2.6.2. Sensibilidade: limites de detecção e quantificação.....	11
2.6.3. Exatidão	11
2.6.4. Precisão.....	13
3 – OBJETIVOS.....	14
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Comitê de Ética.....	15
4.2. Casuística.....	15
4.3. Material de ensaio.....	16
4.4 . Métodos.....	17
4.4.1. Medidas Antropométricas.....	17
4.4.2. Lavagem de vidrarias.....	18
4.4.3..Zinco eritrocitário.....	18
4.4.4. Linearidade.....	19

4.4.5. Sensibilidade.....	19
4.4.6. Exatidão.....	20
4.4.7. Precisão.....	21
4.4.8. Consumo Alimentar.....	22
4.4.9. Preparação das amostras de alimentos.....	23
4.4.10. Umidade.....	23
4.4.11. Padrões de referência.....	23
4.4.12. Zinco total nos alimentos.....	24
4.4.13. Avaliação Dietética de zinco de acordo com as IDRs.....	24
4.4.14. Análise estatística.....	25
5 – RESULTADOS.....	26
6 – DISCUSSÃO.....	37
7 – CONCLUSÕES.....	45
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9 – ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Zinco em materiais biológicos : métodos.....	8
Tabela 2 – Tipos de curva - padrão e a porcentagem de recuperação do padrão adicionado no “ <i>pool</i> ” de eritrócitos.....	29
Tabela 3 – Concentração da a hemoglobina (g/dL) e a concentração do zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$).....	32
Tabela 4 – Concentração de zinco eritrocitário e seus respectivos coeficientes de variação (%)......	33
Tabela 5 – Distribuição da ingestão de 21 voluntárias a partir do registro alimentar de 3 dias, considerando como nota de corte os valores da EAR e RDA para idade e sexo e concentração média (DP) de zinco eritrocitário.....	34
Tabela 6 – Concentração média de zinco eritrocitário e a ingestão média do grupo estudado.....	35
Tabela 7 – Alimentos fontes de zinco do grupo estudado – derivados de leite, produtos de origem animal e tubérculos e derivados.....	36
Tabela 8 – Concentração de zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$) dados da literatura e desta pesquisa.....	40
Quadro 1 – Classificação do estado nutricional proposto por GARROW & WEBSTER, 1985.....	17
Quadro 2 – Protocolo do método de adição, matriz: eritrócitos lisados.....	20
Quadro 3 – Porcentagem de recuperação do padrão adicionado nas amostras individuais.....	28
Figura 1 – Curva - padrão média de zinco e desvios - padrão de cada ponto (n=10).....	26

Figura 2 – Curva - padrão de zinco adicionado no “ <i>pool</i> ” de eritrócitos.....	27
Figura 3 - Variação da concentração de hemoglobina e da concentração de zinco eritrocitário em relação ao tempo de armazenamento do “ <i>pool</i> ” de eritrócitos.....	30
Figura 4 – Gráfico de controle da determinação de zinco eritrocitário “ <i>pool</i> ” de lisado I.....	31
Figura 5 – Concentração de zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$), dados da literatura e desta pesquisa.....	41
Anexo 1 – Convite formal para as voluntárias participarem do projeto.....	52
Anexo 2 – Termo de consentimento e de responsabilidade – pós informação para as voluntárias participarem do projeto.....	54
Anexo 3 - Ficha de cadastramento/hábitos de saúde das voluntárias.....	57
Anexo 4 - Questionário de investigação médica de cada voluntária...59	
Anexo 5 - Alimentos - fonte de zinco analisados e comparados com duas Tabelas de Composição de Alimentos (Virtual Nutri e da Escola Paulista de Medicina – USDA.....	60
Anexo 6 - Concentrações de zinco ($\text{mgZn}/100\text{g}$) com seus respectivos de coeficientes de variação (CV) em base seca e na integral nos alimentos consumidos pelas mulheres avaliadas neste estudo.....	62

RESUMO

O zinco é um dos minerais mais importantes para a nutrição humana, desempenhando várias funções no organismo, como no metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, sendo também relacionado com a resposta imunológica. Os objetivos deste estudo foram validar a adaptação feita ao método de determinação de zinco eritrocitário descrito por WHITEHOUSE *et al.*, 1982, determinar a concentração desse zinco em mulheres adultas sedentárias e saudáveis da Comunidade da USP, bem como a sua ingestão dietética diária e identificar os alimentos fontes de zinco. Os limites de detecção e de quantificação foram : 0,006 $\mu\text{gZn/mL}$ e 0,045($\pm 0,013$) $\mu\text{gZn/mL}$, respectivamente; a linearidade média (n=10) das curvas - padrão a um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9999. A recuperação do padrão adicionado no "pool" de eritrócitos foi de 95 ($\pm 0,4$)% e nas amostras individuais de 93($\pm 1,4$)%. A repetibilidade intra-ensaio (n=10) mostrou um coeficiente de variação (CV) de 3,6% e a inter-ensaio (n=17) de 5,3%. A ingestão média de zinco do grupo de mulheres (n=21) foi de 9,7 (± 3)mgZn/dia. Quinze 15 delas estavam acima da RDA e 4 abaixo da EAR. A concentração média de zinco eritrocitário foi de 38,2(± 5) $\mu\text{gZn/gHb}$. Os alimentos fontes de zinco mais consumidos por considerar a concentração de zinco ou pela frequência de ingestão foram: carnes (bovina, suína, aves e peixes), queijos (prato, branco, provolone, gouda e mussarela), leite e derivado (leite integral, semi-desnatado, desnatado e iogurtes), pães (pães integral e francês), macarrão, arroz, batata, ovos, salsichas e salame.

ABSTRACT

Zinc is one of the most important minerals in human nutrition, performing several functions in the organism, in lipid, protein and nucleic acid metabolism, and is also related to immune response. The aim of this study was to validate the adapted method for erythrocyte Zn determination described by WHITEHOUSE *et al.*, 1982, and to determine zinc erythrocyte concentration in sedentary healthy adult women of the USP community as well as their dietary ingestion and zinc food sources. The detection and quantification limits were 0,006ugZn/mL and 0,045(\pm 0,013) ugZn/mL, respectively, the standard curves average linearity (n=10) was 0,9999. The recovery of the standard added into an erythrocyte *pool* was 95(\pm 0,4)% and into individual samples was 93(\pm 1,4)%. The intra and inter assay variation coefficients (repeatability) were 3,6% (n=10) and 5,3% (n=17), respectively. The average daily ingestion of zinc was 9,7(3) mg. Fifteen were above the RDA and 4 below the EAR. The average erythrocyte Zn concentration was 38,2(\pm 5) ug/gHb. The most consumed food sources of Zn so considered for their Zn concentration or frequency of ingestion were: meats (bovine, swinish, chicken and fish), cheeses (dish, white, provolone, gouda and mussarela) milk and dairy products (skim milk, semi-skimmed milk, whole milk and yogurts), breads (whole wheat bread and white bread), and wheat flour, pasta, rice, potato eggs, sausages and salami.

1 - INTRODUÇÃO

O zinco é um dos minerais mais importantes para a nutrição humana, desempenhando várias funções no organismo, como no metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, sendo também relacionado com a resposta imunológica.

Para avaliar o estado nutricional de zinco existem os parâmetros dietéticos, obtidos pela avaliação do consumo alimentar e os bioquímicos, determinados no plasma, no soro, na urina, nas fezes, nos eritrócitos, no cabelo e nos leucócitos.

O zinco eritrocitário é um parâmetro de avaliação nutricional que reflete o estado pregresso de nutrição em zinco - o eritrócito tem vida média de 120 dias - diferentemente do zinco sérico ou plasmático que expressam um "*pool*" de trocas recentes.

Foram objetivos deste estudo a avaliação do desempenho de método de quantificação de zinco eritrocitário, os parâmetros da validação estudados foram: linearidade, os limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

Determinando esse parâmetro em mulheres normais e identificando os alimentos - fonte de zinco da dieta desse grupo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A deficiência de zinco começou a ser descrita em animais em 1934 e Prasad (1965), descreveu os primeiros registros em humanos. no Egito e em países do Oriente Médio. Foi demonstrado que a deficiência deste mineral está associada com retardo de crescimento e com a falência da maturação sexual de adolescentes do sexo masculino. Mais tarde, em outros países, encontraram-se associações desta deficiência com complicações de doenças crônicas ou de má absorção (SALGUEIRO *et al.*, 2000; WOOD, 2000, FISBERG *et al.*, 2001).

O zinco atua como cofator de diversas metaloenzimas como a anidrase carbônica, a fosfatase alcalina, a desidrogenase láctica e as carboxipeptidases que participando de processos bioquímicos ligados à integridade celular, à imunidade, à formação óssea, crescimento e ao desenvolvimento, além de participar do metabolismo de ácidos nucléicos e da síntese de proteínas (FISBERG *et al.*, 2001).

O zinco apresenta papel fundamental no aparelho reprodutor, participando da espermatogênese e embriogênese; no sistema nervoso atua na afinidade de receptores e processos de síntese de proteínas importantes na formação de neurotransmissores, no sistema linfocítico alterando a afinidade de receptores e propriedades físico-químicas de receptores T₃ e de andrógenos. Exerce ainda função na visão, na resposta imunológica e está relacionado com a alterações no paladar e funciona como antioxidante (VALLEE & FALCHUK, 1993; FISBERG *et al.*, 2001)

2.1. DISTRIBUIÇÃO DE ZINCO NO ORGANISMO

O total de zinco corporal varia de 1 a 2 gramas sendo que 86% estão presentes nos músculos esqueléticos e nos ossos. É também encontrado em outros órgãos, como no pâncreas, rins, fígado e em outros tecidos e fluídos corporais. Segundo GIBSON (1990) em adultos humanos menos que 0,5% do conteúdo total de zinco no corpo está no sangue, sendo 12 a 22% no plasma, aproximadamente 3% nos leucócitos e plaquetas, e de 75 a 88% nos eritrócitos. A circulação representa a menor parte do total deste mineral no organismo, e o “*turnover*” plasmático é o mais elevado. A concentração plasmática normal é de aproximadamente 100µg/dl e representa menos que 1% do conteúdo corporal. É a fonte primária deste mineral para todas as células (SANDSTROM, 1997).

O fígado é um dos principais sítios de síntese de metalotioneína corpórea. Esta proteína tem sido considerada um “*pool*” lábil de zinco, que pode liberar o mineral para ser utilizado pelo organismo em estados fisiológicos que exijam maior demanda deste mineral como, por exemplo, estresse e desenvolvimento fetal (KING & KEEN, 1994). Embora não tenha sido caracterizado nenhum estoque corpóreo de zinco, em períodos prolongados de deficiência o osso diminui a captação e o zinco é mobilizado lentamente para suprir as necessidades dos outros tecidos (SANDSTROM, 1997).

2.2.FONTES ALIMENTARES DE ZINCO

Mariscos, ostras, carnes bovina, suína, cordeiro, vitela e de aves, fígado e miúdos são consideradas as melhores fontes do mineral (BETTS & MA, 2000).

A recomendação diária de zinco (RDA) para mulheres adultas é de 8 mg e de 11 mg para homens adultos. O limite superior diário (ULs) de ingestão é de 40 mg (DRI, 2000).

2.3. ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DE ZINCO

Após a absorção do mineral pelo organismo, através da célula intestinal, este passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e subseqüentemente distribuído para outros tecidos (KING & KEEN, 1994).

A porcentagem de absorção de zinco varia de 15 a 40% (KING & KEEN, 1994).

Das 4 a 15 mg de zinco consumidas diariamente, de 1 a 2 mg são absorvidas e de 3 a 14 mg/Zn excretados nas fezes (sendo 4 a 5 mg proveniente de excreção biliar). Da fração filtrável de zinco do plasma 95% é absorvida na parte distal do túbulo renal, resultando em 0,5 a 0,8 mg de zinco eliminados diariamente na urina. Suor, cabelo e descamação da pele são as vias responsáveis pela excreção de 1 a 5 mg de zinco ao dia (SANDSTROM, 1997; BERDANJER, 1998).

A quantidade de zinco necessária para cada indivíduo vai depender do estágio de vida (criança, adolescente e adulto), sexo e estado fisiológico (gravidez, amamentação) (KING, 1986).

2.4. DEFICIÊNCIA DE ZINCO

A primeira manifestação da deficiência de zinco clinicamente identificada foi a acrodermatite enterohepática, uma doença congênita que surge na infância e é caracterizada por alopecia, diarreia, lesões de pele e imunodeficiência celular (KING & KEEN, 1994).

As conseqüências fisiológicas e bioquímicas da deficiência de zinco afetam vários sistemas do organismo, parecendo mais sensíveis naqueles tecidos que normalmente têm um rápido "*turnover*" e proliferação celular, como intestino, pele, gônadas e células do sistema imunológico (VALLEE & FALCHUK, 1993).

Existe uma diminuição da concentração de zinco no eritrócito quando há uma deficiência de zinco primária , o que foi comprovado no estudo com voluntários humanos que ingeriram 0,6 a 1,0 mg de zinco por dia (SOLOMONS, 1979).

Os fatores que podem levar à deficiência do mineral aqui estudado são o uso prolongado de nutrição parenteral total, o elevado consumo de fitatos e fibras, a desnutrição energético - protéica (DEP), a insuficiência renal crônica e outras doenças (PRASAD et al., 1996).

Onde o consumo de zinco é baixo ou à base de dietas com baixa biodisponibilidade do mineral, observa-se que há limites para o

mecanismo homeostático. Existem também outras condições que podem concorrer para a diminuição do zinco no organismo, enquanto os níveis nos eritrócitos permanecem normais. São elas: cirrose pós-necrótica, hepatite crônica, diabetes e tuberculose pulmonar (SOLOMONS, 1979; KREBS, 2000).

No que diz respeito ao Brasil, alguns estudos revelam a inadequação qualitativa das dietas consumidas por diferentes grupos populacionais. Há relatos de baixo consumo de alimentos de origem animal, e nenhum consumo de cereais integrais ou de alimentos fortificados com zinco (TRAMONTE, 1994; CHICOUREL, 2001).

Estudos de depleção em humanos têm demonstrado que as concentrações de zinco no eritrócito diminuem apenas 21%, após a ingestão de dietas com baixo teor de zinco num período de noventa dias, e que são necessários de 5 a 10 anos para que os estoques de zinco do organismo (2000 – 3000 mg) sejam depletados. Portanto, para que a deficiência de zinco se manifeste em seres humanos, são necessários alguns anos de depleção, com dietas deficitárias desse elemento (GIBSON, 1990).

O método de determinação de zinco eritrocitário da metodologia de WHITEHOUSE *et al.*,(1982) é muito utilizado em estudos de avaliação nutricional em nosso meio (CORDEIRO, 1994; NOGUEIRA, 1997; MARQUES, 1998; MAFRA, 1999; CHICOUREL, 2001).

2.5. INDICADORES DO ESTADO NUTRICIONAL EM ZINCO

Para se obter uma avaliação do estado nutricional em zinco são necessários os dados dietéticos combinados com os bioquímicos e antropométricos (GIBSON, 1990).

A determinação da ingestão alimentar é uma importante ferramenta na avaliação do estado nutricional, possibilitando a detecção de falhas no hábito alimentar e permitindo um melhor planejamento dietético. As novas DRI (2000) preconizam que sejam considerados tanto os erros relativos ao levantamento do hábito alimentar como aqueles associados à determinação das necessidades nutricionais, o que aumenta o nível de confiança nas avaliações de adequação alimentar (IOM, 2000a).

Existem várias formas de avaliar a ingestão alimentar. O registro alimentar, é utilizado na obtenção de informações sobre a ingestão atual e o questionário de frequência alimentar e a história dietética que devem refletir a ingestão usual (PAO & CYPEL, 1997).

Os parâmetros bioquímicos de avaliação do estado nutricional em minerais não são bem definidos, existindo uma grande dificuldade de se estabelecer padrões de normalidade e o alcance de cada um deles (LADEFOGED & HEGEN, 1988; ABDALLAH & SAMMAN, 1993; SARIS *et al.*, 2000).

Assim sendo , o zinco tem sido determinado em vários materiais biológicos e por diversos métodos (tabela 1).

Tabela 1 – Zinco em materiais biológicos : métodos

Amostras	Método analítico
Cabelo	Espectrofotometria de absorção atômica Fluorescência do raio X Espectroscopia de plasma acoplado indutivamente com argônio
Plasma sanguíneo	Espectrometria de absorção atômica
Leite materno	Espectrofotometria de absorção atômica Espectroscopia de plasma acoplado indutivamente com argônio espectrometria de massa
Fezes	Técnicas de isótopos marcados Análises por ativação de neutros
Saliva	Espectrofotometria de absorção atômica
Osso	Espectrofotometria de absorção atômica
Soro e eritrócitos	Técnicas de traçadores isótopos Espectrofotometria de absorção atômica
Tecido muscular	Análise de injeção de fluxo
Fígado	Análise por ativação de nêutrons Radioquímicos Espectrofotometria de absorção atômica
Urina	Espectroscopia do plasma acoplado argônio indutivamente – espectrometria de massa Espectrofotometria de absorção atômica
Sêmen	Espectroscopia de absorção atômica de forno de grafite
Sangue ou tecidos	Espectroscopia de plasma acoplado indutivamente com argônio Análise de ativação de nêutrons instrumental, Espectroscopia de emissão atômica

fonte: BROWN *et al.*, 2001

A concentração plasmática de zinco é considerada, como já mencionado, um estoque de trocas rápidas do organismo, ou seja, um indicador pobre na avaliação do estado de nutrição em relação ao zinco. Somente há diminuição no plasma quando ocorre, no organismo, uma deficiência grave (KING & KEEN, 1994).

A metalotioneína é uma reserva protéica de zinco nos eritrócitos. Indivíduos com baixa concentração de metalotioneína tem um maior risco de deficiência de zinco. A concentração de metalotioneína pode ser determinada no plasma e no eritrócito por radioimunoensaio (KING, 1986). É uma técnica relativamente recente cuja sensibilidade e precisão não estão completamente definidas (WOOD,2000).

Embora os leucócitos possuam 25 vezes mais zinco do que os eritrócitos e representem o mais rápido e ativo componente de mobilização de zinco, a técnica para sua separação é muito trabalhosa e tediosa, sendo pouca usada (SOLOMONS, 1979).

O método que determina zinco nas plaquetas tem pouca sensibilidade e não reflete mudanças no estoque desse mineral no organismo (GIBSON, 1990).

A concentração de zinco no cabelo reflete a ingestão dietética crônica de meses ou anos porém é susceptível a contaminações externas (SOLOMONS, 1979) .

As técnicas que utilizam o uso de radioisótopos para determinar a absorção de zinco são limitadas por considerações éticas. O uso de isótopos estáveis pode evitar o emprego de radioisótopos, mas a

técnica exige instrumentos caros e conhecimentos muito específicos (ABDALLAH & SAMMAN, 1993).

A biópsia do músculo esquelético é considerada uma avaliação confiável da reserva de minerais, porém este método é invasivo e desagradável para o paciente, não sendo muito usado (LADEFOGED & HEGEN, 1988).

Pelo fato de o eritrócito apresentar uma vida média de 110 a 120 dias, o zinco eritrocitário é utilizado como parâmetro bioquímico na avaliação do estado nutricional progresso relativo ao mineral (GIBSON, 1990).

2.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A qualidade de dados analíticos é assegurada por programas de controle de qualidade, que incluem a validação de metodologias e de resultados. Os objetivos do controle de qualidade são fornecer aviso precoce quanto às tendências e desvios nos resultados, de modo que uma medida possa ser tomada antes que ocorra perda de precisão metodológica. A validação permite a comparação entre os resultados com diferentes técnicas, garantindo a escolha do método mais adequado (HYDE & MELLOR, 1986; VOET *et al.*, 1999; CURRIE, 1999)

A escolha do procedimento de validação vai depender das condições do laboratório, da metodologia, do tipo de amostra, do componente analisado e da disponibilidade de materiais de referência certificados (FUNK *et al.*, 1995).

2.6.1. Linearidade

A linearidade da curva de calibração de um método analítico, representa sua habilidade em produzir resultados proporcionais à concentração do analito, dentro de um determinado intervalo de concentração. É representada pelo coeficiente de correlação, que expressa a variância da inclinação da reta de regressão linear entre dois pontos aleatórios (BARROS & HIRATA, 1997).

2.6.2. Sensibilidade: limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção é definido como o menor nível de concentração do analito, estaticamente diferente do branco, determinado por um método analítico (CHAIRMAN *et al.*, 1983).

O limite de quantificação é o menor nível de concentração do analito, em que podem ser obtidos resultados quantitativos com um certo grau de confiança (CHAIRMAN *et al.*, 1983).

Esses parâmetros de avaliação da qualidade analítica, nos fornecem informações sobre os intervalos de confiança em que os resultados obtidos são considerados válidos (FUNK *et al.*, 1995).

2.6.3. Exatidão

Exatidão é um termo qualitativo, utilizado para definir o grau de concordância ou compatibilidade entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência, aceito como valor exato ou verdadeiro (FUNK *et al.*, 1995; RAMOS, 1999).

As formas de controle da exatidão são várias como a utilização de material de referência certificado, ensaios de recuperação e a utilização de padrões internos. A escolha de uma ou de outra forma de controle vai depender, entre outros fatores, da metodologia utilizada, da matriz da amostra, do analito a ser determinado, e da disponibilidade de materiais de referência certificados (FUNK *et al.*, 1995).

A exatidão dos resultados ainda pode ser monitorada com gráficos de controle. Tais gráficos consistem em uma forma de controle interno de estabilidade dos resultados obtidos dentro do laboratório (BARROS & HIRATA, 1997).

Uma maneira de se verificar a exatidão é o ensaio de recuperação realizado pela adição do analito a amostras que são preparadas em triplicata em 2 a 3 níveis de concentração na faixa de 50 a 150% da concentração alvo ou esperada (BARROS & HIRATA, 1997).

A exatidão pode ser afetada pelo erro sistemático, cujas principais fontes são: calibração inadequada do instrumento, extração imperfeita do analito da matriz da amostra, presença de impurezas no solvente, interferentes na amostra e método não adequado (BARROS & HIRATA, 1997).

2.6.4. Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de medidas independentes (replicatas), em torno de um valor central (média), efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições experimentais definidas (TAYLOR, 1987; RAMOS, 1999).

A precisão pode ser avaliada pelos parâmetros Repetibilidade e Reprodutibilidade. A Repetibilidade é definida como o grau de concordância entre resultados de medidas independentes do mesmo analito, realizadas sob condições iguais, com o mesmo tipo de amostra, mesmos equipamentos e analistas, e o mesmo laboratório. A Reprodutibilidade, por outro lado, é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes do mesmo analito, realizadas sob diferentes condições de analistas, equipamentos e laboratórios (FEINBERG & BUGNER, 1989).

A precisão é afetada pelo erro aleatório que ocorre acima e abaixo do valor médio; é de difícil controle pois provém de causa desconhecida, em geral irregular, não detectável, imprevisível, inevitável, podendo ser minimizado, mas não totalmente eliminado. (BARROS & HIRATA, 1997).

Assim, as figuras de mérito analítico utilizadas neste trabalho para a metodologia de determinação de zinco eritrocitário foram: linearidade, sensibilidade (limite de detecção, limite de quantificação), exatidão e a precisão.

- 3 - OBJETIVOS

Geral

Validar o método de determinação de zinco no eritrócito.

Avaliar o zinco eritrocitário e zinco alimentar em mulheres da Comunidade da USP

Específicos

Determinar em mulheres sedentárias:

- A concentração de zinco eritrocitário .
 - A ingestão dietética diária de zinco .
 - Os alimentos - fonte de zinco da dieta.
 - Relacionar no grupo o zinco eritrocitário com o zinco ingerido.
-

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1.COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, inclusão do ofício nº 23/99 (16 de setembro de 1999). (*Projeto: Avaliação do Estado Nutricional de minerais ferro, zinco, cobre e magnésio em Jogadoras de polo Aquático*, mas este estudo foi elaborado a partir do grupo controle (mulheres sedentárias) do estudo acima citado).

Todos os participantes do grupo receberam um convite formal e assinaram um termo de consentimento e de responsabilidade, após receberem orientações em relação ao estudo em todo os seus aspectos (anexo 1 e 2).

4.2. Casuística

Foram selecionadas da comunidade da USP, 24 voluntárias com idade de 19 a 40 anos, aparentemente saudáveis, não praticantes de atividade física regular (frequência inferior a 2 horas semanais), índice de massa corporal (IMC) menor que 28 Kg/m², não fumante, uso de medicamentos ou suplementos nutricionais nas 72 horas que antecederem a coleta de sangue. Todas estas informações foram retiradas de uma ficha de cadastramento/hábitos de saúde e um questionário de investigação clínica de cada participante (anexos 3 e 4).

4.2. Material de ensaio

Coleta de sangue

Foram colhidas amostras de 20 mL de sangue em seringas descartáveis, distribuídas em alíquotas de 5 mL com 5 µl de citrato de sódio a 30%, como anticoagulante. Após centrifugação (centrífuga refrigerada RC5C SORVAL INSTRUMENTS, 9002607) a 4°C, a 13.000g, por 10 minutos, o plasma foi separado e a massa eritrocitária (papa de eritrócitos) resultante, lavada por três vezes com solução salina, transferida para tubos eppendorf (2,0 mL) e armazenada em *congelador* a -70° C, até o momento da análise.

“Pool” de eritrócitos

Em um balão volumétrico (10 mL) foi pipetado 0,5 mL de papa de eritrócitos de 5 mulheres selecionadas aleatoriamente das amostras obtidas do grupo avaliado. O volume foi completado com água, formando assim o lisado I e, então, armazenado a -70° C até o momento da análise.

4.4. MÉTODOS

4.4.1. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

As medidas foram realizadas após a coleta de sangue. O peso corporal foi obtido em balança eletrônica da marca ECHOLAC (precisão de 100g), (as voluntárias foram pesadas de maiô). A altura foi determinada com uma fita métrica afixada à parede (precisão de 0,1 centímetros).

A partir das duas medidas anteriores, calculou-se o Índice de Massa Corporal (IMC): peso (Kg/m^2), para avaliar o estado nutricional das participantes. A classificação do estado nutricional proposta por GARROW & WEBSTER, 1985, é recomendado pela Organização Mundial da saúde, encontra-se no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação do estado nutricional proposta por GARROW & WEBSTER, 1985

Estado Nutricional	IMC(Kg/m^2)	Grau de Classificação
Desnutrição	17 – 18,49	I
	16 – 16,99	II
	< 16	III
Eutrófico	18,50 – 24,99	
	25 – 29,99	I
Sobrepeso(obesidade)	30 – 34,99	II
	> - 40,00	III

4.4.2. Lavagem de vidraria

Toda a vidraria e os recipientes plásticos utilizados durante os experimentos e análises foram desmineralizadas por imersão, em banho de ácido nítrico a 30% e enxaguados com água desmineralizada, por no mínimo 10 vezes, e secos em estufa a 37°C (INSTITUTO ADOLFO LUTTZ, 1985).

4.4.3. DETERMINAÇÃO DE ZINCO ERITROCITÁRIO

A determinação de zinco eritrocitário baseou-se no método de WHITEHOUSE *et al*, 1982, onde os pontos da curva - padrão são diluídos em água e minerais presentes nos eritrócitos humanos. E a adaptação feita em nosso estudo foi na modificação da diluição dos pontos da curva – padrão com solução de ácido nítrico (Synth): glicerol (Carlo Erba): água (10:30:60).

A massa eritrocitária foi diluída 40 vezes. Na primeira diluição (1:4), produto chamado de lisado I, foi determinada a concentração de hemoglobina (método de cianometahemoglobina). Na segunda diluição (1:10), lisado II, foi determinada a concentração de zinco. Os resultados finais foram expressos em $\mu\text{g Zn/g}$ de hemoglobina.

O zinco foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (espectrofotometro Hitachi Modelo Z – 5000) nas seguintes condições: fenda 0,9 nm, chama oxidante com mistura de ar

acetileno, comprimento de onda de 213,9 nm. A curva - padrão foi preparada utilizando-se o ZnCl_2 - Tritisol (MERCK) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 $\mu\text{Zn/mL}$.

4.4.4. Linearidade

A linearidade das curvas padrão foi avaliada pelo coeficiente de correlação da curva de regressão linear. Foi obtida com 5 pontos, analisados em 10 replicatas (BARROS & HIRATA, 1997).

4.4.5. Sensibilidade

O limite de detecção foi calculado através da multiplicação por 3 do desvio - padrão de 10 leituras do branco, dividindo-se o resultado pela inclinação da curva de calibração (CHAIRMAN *et al.*, 1983).

O limite de quantificação foi calculado pelo mesmo procedimento anterior, com a diferença de se multiplicar por 10 o desvio padrão das leituras do branco (CHAIRMAN *et al.*, 1983).

4.4.6. Exatidão

A exatidão do método de determinação de zinco eritrocitário foi avaliada pelo ensaio de recuperação (avaliação da interferência da matriz), pela não disponibilidade de padrões de referência certificados.

O “*pool*” de eritrócitos foi analisado em três dias diferentes, com um total de 17 repetições e as médias das respostas analíticas foram plotadas ao longo do tempo, num gráfico controle. Este gráfico é uma importante ferramenta para monitorar a estabilidade de processos em particular, de processos analíticos (TAYLOR, 1987).

Interferência da matriz

Para avaliar a exatidão do método utilizou-se tanto o “*pool*” de lisado I como as amostras individuais como matrizes para adição de padrão de zinco. O padrão adicionado foi preparado a partir de um de padrão de zinco na concentração de 5 µg/mL diluído em água desmineralizada.

O ensaio foi realizado em três dias, em triplicata (Quadro 2).

Padrão adicionado 5 µgZn/mL µL	Água desmineralizada (µL)	Lisado I (µL)
0	1800	200
100	1700	200
200	1600	200
300	1500	200

Quadro 2 – Protocolo do método de adição de padrão
Matriz: eritrócitos lisados

A massa correspondente a extrapolação na curva é o valor da concentração de zinco sem nenhuma interferência. Para calcular a porcentagem de recuperação do método relacionam-se os resultados obtidos da leitura direta do lisado I na curva padrão com os obtidos com o método de adição de padrão (TAYLOR, 1987, BARROS & HIRATA, 1997).

4.4.7. Precisão

A precisão intra-ensaio foi avaliada a partir do resultado de 10 determinações feitas no “*pool*” de lisado I.

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada nesse “*pool*” em três ensaios, feitos em dias diferentes, o primeiro com 10 repetições, o segundo com 4 e o terceiro com 3 .

Cinco amostras individuais, escolhidas aleatoriamente, foram analisadas em dois dias consecutivos. Em cada um dos dias foram feitas 3 repetições.

O coeficiente de variação inter-ensaio ($100 \times S/\text{média}$) foi determinado a partir do *pool* de desvios-padrão (*S pool*) segundo a fórmula (TAYLOR, 1987).

$$S_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2 + (n_3-1)S_3^2 + \dots + (n_n-1)S_n^2}{(n_1-1) + (n_2-1) + (n_3-1) + \dots + (n_n-1)}}$$

Onde:

S_1 = desvio padrão da média das replicatas

n = número de replicatas

4.4.8. Consumo alimentar

O padrão de consumo de alimentos do grupo estudado foi determinado a partir dos dados do Registro Alimentar de 3 dias (RA 3dias).

O registro alimentar de 3 dias foi preenchido individualmente, em formulário em 2 dias úteis e 1 dia de final de semana. Considerou-se alimento - fonte de zinco, aquele cuja composição no mineral suprisse 15% da RDA (8mgZn/dia) por porção diária consumida ou aquele cuja frequência de consumo levasse a esse nível de ingestão (BRASIL, 2001).

A análise dos dados foi realizada por meio do programa Virtual Nutri, desenvolvido pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP (PHILIPPI *et al.*, 1996), complementando os valores da concentração de zinco da tabela da *Royal Society of Chemistry* (MACCANCE E WIDDOWSON, 1991) e a tabela de composição de alimentos utilizada na Escola Paulista de Medicina de

São Paulo. Ao final foram identificados os alimentos - fonte de zinco do grupo estudado.

4.4.9. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Os alimentos selecionados foram comprados em 4 dias alternados, em feiras e supermercados. No mesmo dia da compra, parte das amostras foi submetida a técnicas de preparação domésticas usuais em cozinha residencial e armazenadas em sacos plásticos. A outra parte das amostras, não submetida a processamento, foi acondicionada em sacos plásticos.

No laboratório, as amostras foram homogeneizadas em processadores e identificadas e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

4.4.10. UMIDADE

A umidade dos alimentos selecionados foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C , até a obtenção do peso constante.

4.4.11. PADRÕES DE REFERÊNCIA

Ração à base de caseína (AIN 93G/160497), preparada conforme a formulação preconizada (REEVES *et al.*, 1993), porém isenta de lipídios, foi adotado como padrão secundário.

4.4.12. ZINCO TOTAL NOS ALIMENTOS

As amostras de alimentos foram pesadas em tubos de digestão, em triplicatas, e adicionadas ácido nítrico e digeridas á 150°C, e adicionou-se peróxido de hidrogênio para o término do processo. Em seguida, foram realizadas as diluições dependendo da concentração aproximada de zinco de cada alimento. Cada amostra foi lida em espectrofotômetro de absorção atômica.

4.4.13. AVALIAÇÃO DIETÉTICA DE ZINCO DE ACORDO COM AS DRIs

Para avaliação da ingestão do zinco utilizou-se a metodologia descrita nas recomendações nutricionais que considera a ingestão de cada indivíduo (IOM, 2000b).

O coeficiente de variação interpessoal de ingestão de zinco foi maior que 60% e, por essa razão, optou-se por utilizar a seguinte classificação considerando os valores das DRIs (IOM, 2000a):

< EAR –Ingestão inadequada

**entre a EAR e a RDA – incerteza de adequação ou
inadequação**

≥ RDA – Ingestão adequada

4.4.14. Análise estatística

Foi testada a normalidade de distribuição dos valores de ingestão de zinco e de concentração de zinco eritrocitário. Em seguida foi realizado o teste de correlação de Pearson entre as duas variáveis para um $n=21$ e um $\alpha = 0,05$

5 - RESULTADOS

Os resultados da validação da metodologia de determinação de zinco eritrocitário estão apresentados a seguir em forma de tabelas e gráficos.

Linearidade

A linearidade média (n=10) das curvas - padrão de zinco foi considerada adequada no intervalo de 0,1 a 1,0 μ g Zn/mL a um coeficiente de correlação de (R^2)= 0,9999(Figura 1).

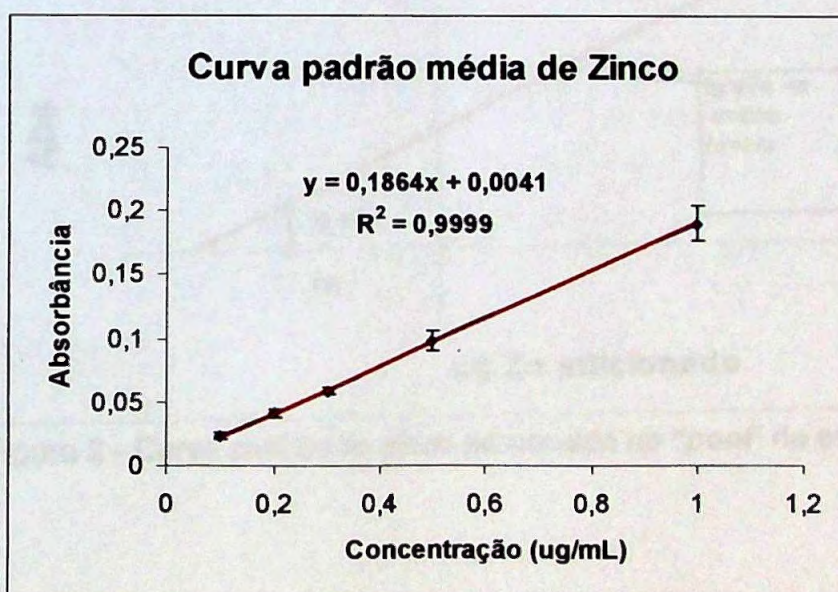


Figura 1 – Curva - padrão média de zinco e desvios padrão de cada ponto (n=10)

Sensibilidade : Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação encontrados foram $0,006\mu\text{g/mL}$ e $0,045 (\pm 0,013)\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Exatidão

A exatidão do método determinada pela recuperação do padrão adicionado no "pool" de eritrócitos foi de $95(\pm 0,4)\%$ (figura 2).

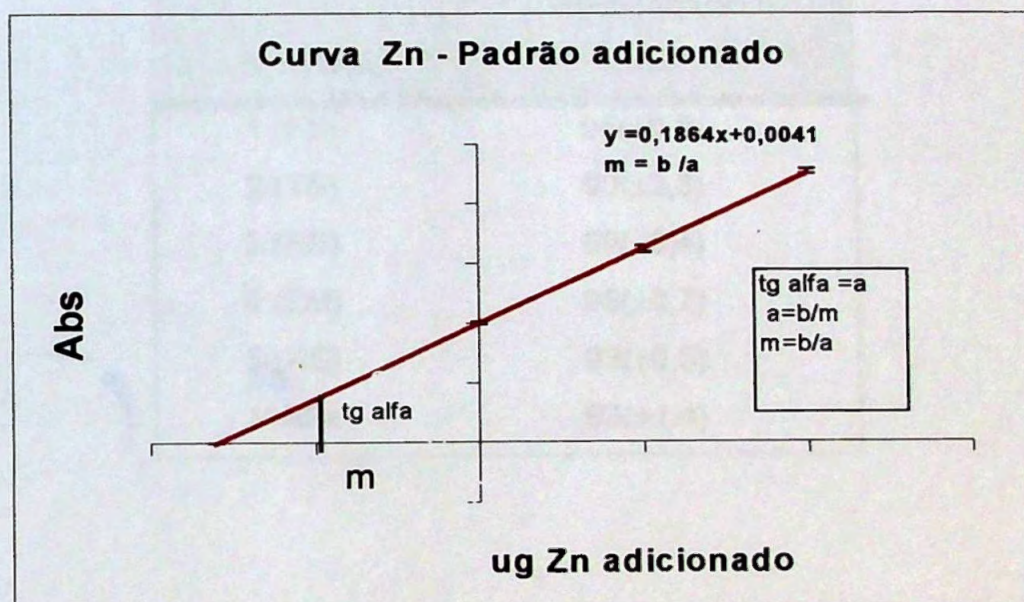


Figura 2 - Curva padrão de zinco adicionado no "pool" de eritrócitos

Análises individuais

O quadro 3 apresenta a porcentagem de recuperação do padrão adicionado por avaliação da interferência da matriz em cinco amostras individuais, realizadas em dois dias consecutivos, em triplicata. A média de recuperação (*S pool*) foi de 93 ($\pm 1,4$)%.

Quadro 3 - Porcentagem de recuperação do padrão adicionado nas amostra individuais

Amostra	Recuperação % (DP)
1 (FS)	95($\pm 0,8$)
2 (TS)	90($\pm 2,3$)
3 (RS)	89($\pm 0,4$)
4 (EM)	96($\pm 0,7$)
5 (HS)	93($\pm 0,5$)
Média	93($\pm 1,4$)

A tabela 2 apresenta a porcentagem de recuperação (DP) do método em três tipos de curvas – padrão: em ácido nítrico 1% e solução de sais minerais (WHITEHOUSE *et al*, 1982); a segunda apenas em ácido nítrico 1% e a terceira em ácido nítrico 1% e glicerol a 3%. A melhor recuperação foi obtida na curva diluída em glicerol e ácido nítrico. Nas outras curvas a recuperação foi menor do que 90%.

Tabela 2 –Tipos de curvas - padrão e a porcentagem de recuperação do padrão adicionado no “pool” de eritrócitos

Curva - padrão em:	Método direto ($\mu\text{g/mL}$)	Método de padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação % (DP)
HNO ₃ 1%/ Solução de sais (WHITEHOUSE <i>et al</i> , 1982)	2,7	3,1	87 ($\pm 0,3$)
HNO ₃ 1%	3,0	3,6	83 ($\pm 0,4$)
HNO ₃ 1%/ glicerol 3%	2,9	3,1	95($\pm 0,4$)

A concentração de zinco eritrocitário no “*pool*” de eritrócitos mostrou variação nos diferentes tempos analisados. No tempo zero (inicial) a concentração obtida foi de 43 $\mu\text{gZn/gHb}$, sendo subsequente 46 $\mu\text{gZn/gHb}$. Em contrapartida, em relação a hemoglobina foi observada uma queda na sua concentração, de 0,6 $\mu\text{g/dL}$, em relação ao tempo inicial.

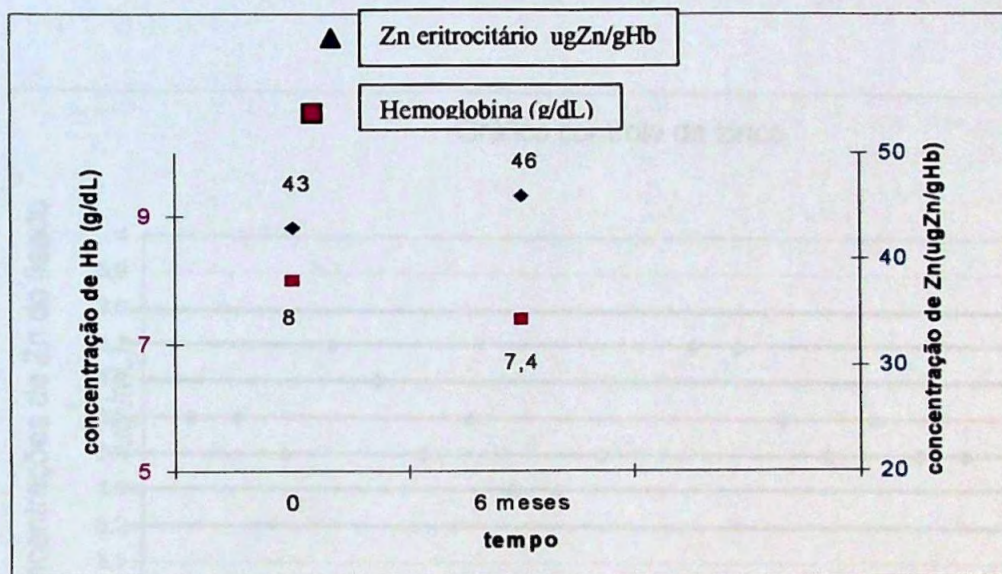


Figura 3 – A variação da concentração de hemoglobina e da concentração de zinco eritrocitário em relação ao tempo de armazenamento do “*pool*” de eritrócitos.

A exatidão do método de determinação de zinco eritrocitário pode ser avaliada pelo gráfico controle. Com os resultados analíticos da dosagem do "pool" de eritrócitos em 17 repetições foram estabelecidos os limites do gráfico de controle a serem utilizados nas análises posteriores (figura 4).

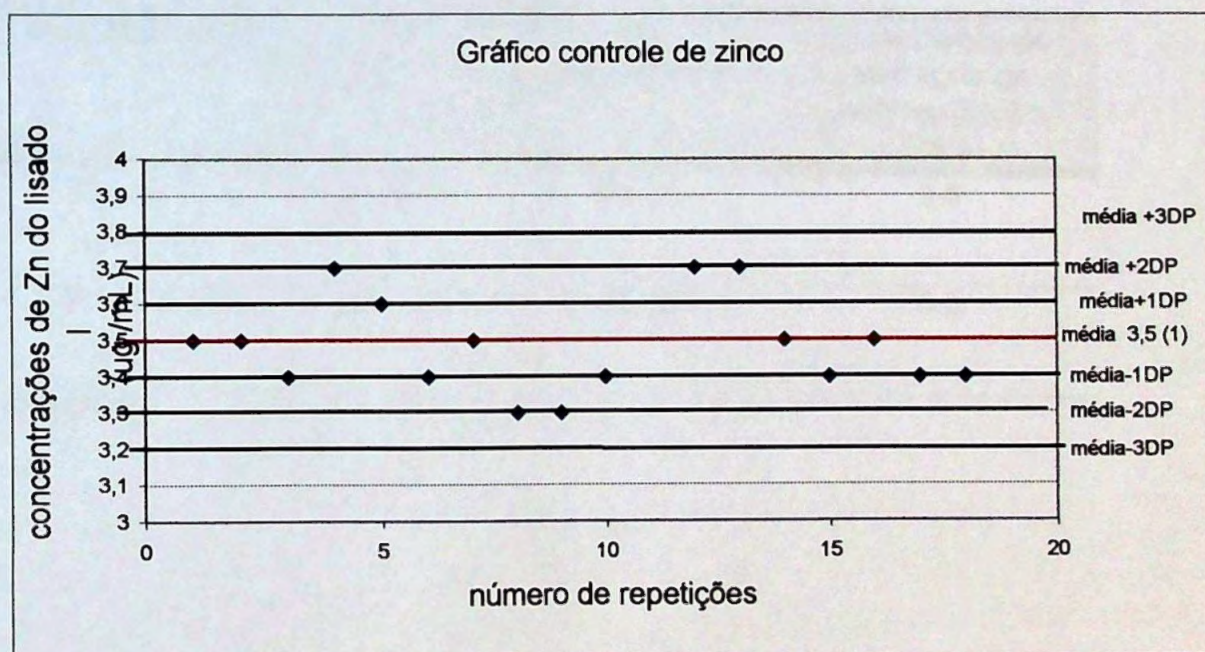


Figura 4 – Gráfico de controle da determinação de zinco eritrocitário "Pool" do lisado I.

Precisão

Em relação à concentração de zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$) na repetibilidade intra-ensaio e inter-ensaio foi observado $43(\pm 2)$ $\mu\text{gZn/gHb}$ e $46(\pm 2)$ $\mu\text{gZn/gHb}$, respectivamente, realizada no “pool” de eritrócitos .

Tabela 3 - Concentração da Hb(g/dL) e a concentração do Zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$)

Repetibilidade	Hb (g/dL)	Zn ($\mu\text{gZn/gHb}$)	Coefficiente de Variação da concentração Zn(%)
Intra-ensaio (n=10)	8,0 ($\pm 0,3$)*	43(± 2)	3,6
Inter – ensaio (n=17)	7,6($\pm 0,3$)	46(± 2)	5,3

*Média(s)

Análises individuais

A tabela 5 apresenta a concentração média ($\mu\text{gZn/gHb}$) de zinco eritrocitário de 5 mulheres selecionadas aleatoriamente do grupo e determinada em dois dias consecutivos. A concentração média de zinco eritrocitário foi de $41(\pm 1,4)$ $\mu\text{gZn/gHb}$ dentro do limite de normalidade e o coeficiente de variação médio ($100 \cdot s_{\text{pool}}/\text{média}$) foi de 3,4%, portanto adequado.

Tabela 4 – Concentração de zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$) e seus respectivos coeficientes de variação (%).

Amostra	Concentração ($\mu\text{gZn/gHb}$)	CV %
1(FS)	29($\pm 0,7$)	2,4
2(TS)	41($\pm 3,5$)	8,5
3(RS)	46($\pm 4,2$)	9,2
4(EM)	43(0,0)	0,0
5(HS)	44($\pm 1,4$)	3,2
Média	41 ($\pm 1,4$)	3,4

Dados antropométricos

O grupo tinha idade média de 23,5(\pm 4,9) anos, peso médio de 58 (\pm 7,1) Kg e IMC de 22 (\pm 1,8) Kg/m², encontrando - se em eutrofia.

Parâmetros nutricionais

A distribuição da adequação de zinco das dietas do grupo estudado encontra-se na tabela 6. Considerando-se inadequada uma ingestão de zinco < EAR, verificou-se que 19% (4/21) das mulheres avaliadas apresentaram a ingestão inadequada e 71,5% (15/21) apresentam a ingestão acima da RDA, considerada portanto adequada.

Tabela 5- Distribuição da ingestão de 21 voluntárias, a partir do registro alimentar de 3 dias, considerando o ponto de corte os valores da EAR e RDA para idade e sexo e concentração média (DP) de zinco eritrocitário

	< EAR	EAR- RDA	\geq RDA
n / n total	4/21	2/21	15/21
ZnEr	40,2(\pm 3,5)	38,9(\pm 3)	38(\pm 5,1)
μ gZn/gHb			

A tabela 6 apresenta a concentração média ($\mu\text{gZn/gHb}$) de zinco eritrocitário no grupo estudado.

Tabela 6 – Concentração média de zinco eritrocitário e a ingestão média de zinco do grupo estudado.

Amostras	Ingestão de Zn (mg/dia) Rec 3 dias	Concentração de Zn eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$)
1 (DM)	6,6	39
2 (SSA)	9,9	37
5(ASP)	12	34
6 (RP)	12	39
7 (MFPS)	11	41
8 (RLRC)	---	37
9 (FAM)	8,8	38
10(MGW)	9,3	32
11 (CGG)	14	36
12 (ALP)	7	37
13(VVS)		42
14(CLR)	10	47
15(LP)	12	36
16(RASS)	12	36
17 (EF)	15	36
18(ACN)	6,6	36
22(RAA)	9,0	40
23(JPS)	7,9	41
24(CCL)	13	27
25 (HS)	5,5	44,12
26(FS)	4,7	29,5
27(EM)	8,3	43
28(RS)	10	47
29(T)	-----	41,5
Média(S)	9,7(\pm3)	38,2(\pm5)

Lembrando que o valor médio estimado pela EAR – 6,8 mg Zn/dia, RDA – 8,00 mg Zn/dia para mulheres de 19 a 40 anos.

A tabela 7 apresenta os alimentos - fonte de zinco identificados a partir de dados de ingestão alimentar das mulheres da Comunidade da USP.

Tabela 7 – Alimentos - fonte consumidos pelo grupo estudado - produtos de origem animal e tubérculos, cereais e derivados

Derivados de leite	Outros produtos de origem animal	Tubérculos, cereais e derivados
Leite: integral, desnatado e semi desnatado	Carne bovina (coxão mole)	Arroz integral
Queijos: provolone, gouda, branco, mussarela e prato	Carne suína (lombo)	Arroz branco
logurtes	Carne de frango	Pães francês e integral
	Embutidos (salsicha, salame, linguiça)	Batata
	Ovos de galinha	Macarrão
	Pescada branca	
	Vísceras de boi (fígado)	

6 - DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos indicou a adequação da metodologia utilizada, validando os resultados para que fossem empregados na interpretação do estado de nutrição em zinco de um determinado grupo populacional.

O coeficiente de correlação da reta de calibração de zinco eritrocitário (figura 1) num intervalo de concentração de 0,1 a 1,0 $\mu\text{gZn/ mL}$, a um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9999$ e indicou um bom ajuste entre o sinal gerado pelo equipamento e a concentração do analito. As leituras das amostras situaram-se dentro do intervalo de linearidade da curva.

A sensibilidade do método foi de 0,006 $\mu\text{gZn/ mL}$ para o limite de detecção e 0,045(0,013) $\mu\text{gZn/ mL}$ para o limite de quantificação refletem as características do equipamento, o padrão de pureza dos reagentes e o grau de descontaminação da vidraria.

A exatidão do método de determinação de zinco eritrocitário variou de 83% a 95%. Este último valor foi obtido com a curva padrão diluída em ácido nítrico 1% e glicerol 3% (tabela 2) portanto a melhor das 3 condições empregadas.

Na literatura foram encontrados valores variando entre 94 a 106% (PRASAD (1965), WHITEHOUSE *et al* (1982), DEUSTER *et al* (1987) e CORDEIRO (1994).

HORWITZ (1982) considera uma recuperação de 80% como o menor valor aceito para as análises de elementos traço em níveis de concentrações de $\mu\text{g/g}$. WANG & LI (1995) por outro lado, assumem como satisfatória a recuperação mínima de 90% e máxima de 110%. BARROS & HIRATA (1997) destacam que, embora seja desejável obter-se uma recuperação próxima a 100%, valores de recuperação superiores a 50% tem sido usado como limite aceitável, dependendo do analito a ser determinado e da metodologia de análise.

Com base nesses trabalhos podemos considerar que a porcentagem de recuperação do método depende do tipo de solução diluente, da massa adicionada, do tipo de matriz, e dos erros sistemáticos e aleatórios inerentes ao método.

Assim, por exemplo, se a separação dos componentes celulares não for eficiente, isto é, se a amostra preparada contiver outros componentes celulares que apresentem quantidades apreciáveis de zinco, o resultado da determinação deste mineral no eritrócito será sensivelmente afetado.

Quanto à precisão do método, avaliada pela repetibilidade e expressa pelos coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios (tabela 4), os valores de 3,6 e 5,3%, respectivamente, encontram-se dentro do limite aceitável (<10 %) para análises de micronutrientes e são semelhantes a outros autores (HORWITZ, 1982; DEUSTER *et al.*, 1987, SPRENGER & FRANZ, 1983, CORDEIRO, 1994).

Os gráficos de controle da qualidade são utilizados em diversas áreas para mensurar a qualidade de um produto ou de um serviço.

Quem primeiro utilizou este método foi Shewart, em 1931, com a finalidade de controlar o aspecto econômico dos produtos manufaturados (DUX, 1986). O gráfico de controle do método de determinação de zinco eritrocitário foi apresentado na figura 4 e pode ser usado como referência do laboratório em futuras análises.

WANG & LI (1995) descrevem a utilização de gráficos na análise da qualidade dos resultados analíticos. Consideram valores aceitáveis aqueles situados entre a média ± 3 desvios padrão, pois segundo os autores, as amostras utilizadas como materiais de referências, poderiam ter sua composição alterada com o decorrer do tempo, ou pela ação de certos fatores como oxigênio, a temperatura, a luz, entre outros.

Os resultados das análises em amostras de **"pool"** de eritrócitos armazenadas por 6 meses mostraram que há alteração na concentração de hemoglobina com o armazenamento, o que assinala que essa determinação deva ser feita logo após a coleta de sangue (tabela 3 e figura 3).

A concentração média de zinco eritrocitário encontrada no grupo avaliado (tabela 6) de $38,2 (\pm 5) \mu\text{gZn/gHb}$ com intervalo de confiança de 35,6 a 40,2 $\mu\text{gZn/gHb}$, mais baixo do que o encontrado por WHITEHOUSE *et al.*, 1982, de $40,8 (\pm 6,3) \mu\text{gZn/gHb}$, para indivíduos de ambos os sexos na faixa de 21 a 50 anos, e por GIBSON (1990) de $42(\pm 5) \mu\text{gZn/gHb}$.

Dados de literatura de determinação de zinco eritrocitário (tabela 8 e a figura 5), mostram uma tendência de a concentração aumentar até a idade adulta e diminuir no idoso. Esse tipo de compilação pode ser interessante para caracterizar esse parâmetro como indicador do estado nutricional em zinco da população em geral e de grupos particulares.

Tabela 8 – Concentração de zinco eritrocitário (ugZn/gHb)

Idade (sexo)	ugZn/gH(DP)	Referência
1 a 6 meses (F/M)	18,7(6,1)	NISHI, 1980
4 a 7 anos (F/M)	31(media)	CHICOUREL, 2001
7 a 9 anos(F/M)	36 (media)	PEDROSA, 1997
11 a 55 anos	42,2 (5,6)	GIBSON, 1989
21 a 50 anos (F/M)	40,7(3,6)	WHITEHOUSE <i>et al</i> , 1982
19 a 40 anos (F)	38,2 (5)	Nossa pesquisa
49 a 63 anos (F/M)	40,8(6,3)	MAFRA, 1998
75 a 91 anos (F/M)	33,7(1,6)	CORDEIRO, 1994

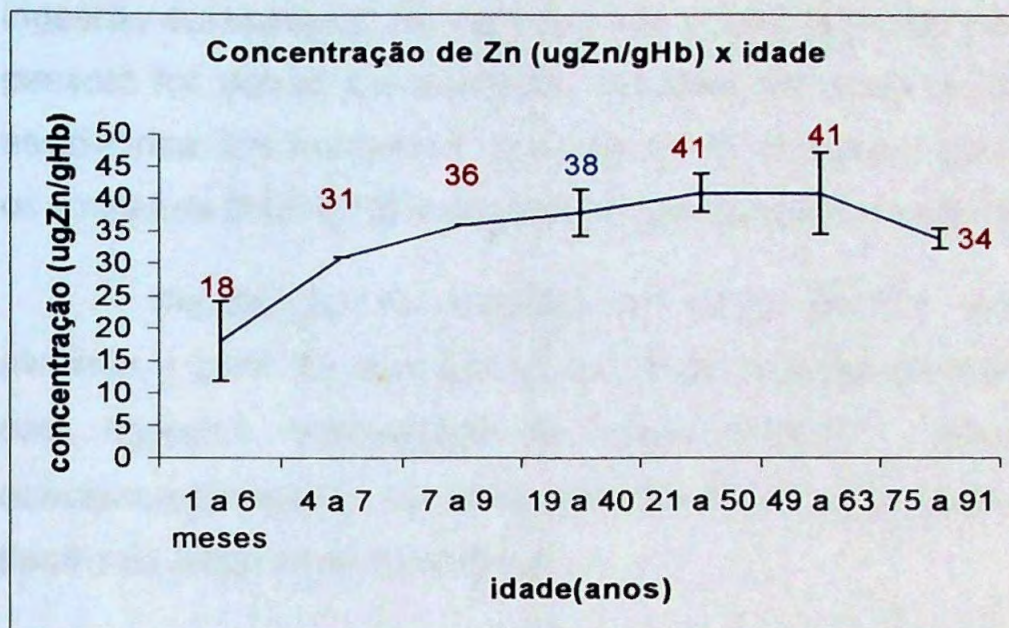


Figura 5 - Concentração de zinco eritrocitário ($\mu\text{gZn/gHb}$), dados da literatura e desta pesquisa

Parâmetros Dietéticos

A avaliação nutricional desse grupo estudado foi feita considerando as recomendações de ingestão dietética de $8\text{mgZn}/\text{dia}$ (IOM, 2000b) para mulheres de 19 a 40 anos.

Essas recomendações tem como proposta uma metodologia que leva em consideração as diferenças inter e intra-individuais (IOM, 2000a).

Este método permite decidir, com o estabelecimento de um nível de confiança pré - determinado, se a ingestão de um nutriente está adequada ou excessiva, considerando-se a distribuição em z- escore, método já empregado na avaliação da desnutrição (IOM, 2000b). Vale lembrar, porém, que este método só se aplica a se a distribuição de

ingestão do nutriente for normal e se o coeficiente de variação inter-pessoal for menor do que 60%. No caso do zinco, a distribuição é assimétrica dos nutrientes e assim sendo tomamos como referência os limites da EAR e RDA para definir adequação de ingestão.

A distribuição da ingestão de zinco das 21 voluntárias foi avaliada a partir do recordatório de 3 dias. O grupo de mulheres (n=4) com ingestão inadequada de zinco (<EAR), possuíam uma concentração média de zinco eritrocitário de $40,2(\pm 3,5)$ $\mu\text{g}/\text{Zn}/\text{g Hb}$, dentro do limite de normalidade.

Assim sendo, a concentração de zinco no eritrócito não refletiu a ingestão do mineral. Este fato pode ser o resultado da limitação desse parâmetro em responder à grande variação dos valores de ingestão. (reflexo da grande variação intra e inter-pessoal e do erro de cerca de 40% associado à obtenção de dados a partir de somente três registros).

MARI (2002) trabalhando com mulheres atletas de Polo Aquático da Seleção Brasileira do ano de 2000, de 17 a 31 anos (n=23), obteve média ingestão diária de $10,6 (\pm 4,9)$ mg Zn/dia, através do recordatório de 3 dias e da frequência alimentar.

VÁSQUEZ (1998) que estudou atletas maratonistas com idade média de $32(\pm 6,2)$ anos, calculando a ingestão média de zinco por meio do recordatório de 7 dias, mencionou um resultado semelhante ao de MARI (2002), ou seja, $10,9 (\pm 3,0)$ mg Zn/dia.

TRAMONTE (1994) verificou em homens e mulheres adultas da população brasileira de baixa renda no estado de Santa Catarina, ingestão média de zinco de 7,7 e 6,3 mg Zn/dia, respectivamente, pois o grupo estudado pela pesquisadora apresentou teores de fibras bastante superiores em relação a todos os valores recomendados pela DRIs que implicaram em prejuízo á biodisponibilidade de zinco.

ORTEGA *et al* (1999) que analisaram mulheres grávidas de 18 a 35 anos, sendo que 62 apresentaram uma ingestão média de zinco menor que 12 mg Zn/dia e 20 maior ou igual a 12 mg Zn/dia, estes resultados revelaram que o grupo estudado possuía adequação de consumo de zinco para esta situação fisiológica, pois a média preconizada pela RDA de 2000 é de 11mgZn/dia.

Considerando-se a ingestão média de zinco do grupo estudado (21 mulheres) de 9,7(\pm 3) mg Zn/dia (tabela 6), podemos dizer que 15 delas têm ingestão adequada ($>$ 8,0 mg Zn/d) e 4 inadequada ($<$ 6,8 mgZn/dia) . Essa últimas necessitariam de um acompanhamento mais prolongado - mais registros- para que se definisse se estão com algum grau de deficiência do mineral.

Os alimentos - fonte de zinco na dieta desse grupo, assim classificados por apresentarem mais do que 1,2 mg Zn/ porção habitual foram: carne bovina, lingüiça, carne suína, queijo gouda, queijo branco, queijo mussarela, queijo prato, fígado e amendoim. Os que foram considerados fontes pela freqüência diária de ingestão são: leites, iogurtes, pão integral e pão francês, macarrão arroz polido e arroz integral, salsicha, salame e batata (tabela 7).

Na determinação de Zn nos alimentos (anexo 6) os coeficientes de variação dos resultados encontram-se dentro do limite aceitável para as análises de micronutrientes, para estudos de repetibilidade ou seja, abaixo de 10%.

A realização de levantamentos continuados de ingestão alimentar é importante para se avaliar os desvios intrapessoais e permitir a montagem de um banco de dados que possibilite o estabelecimento das necessidades médias estimadas (EARs) para a população brasileira. Recomenda-se o consumo de alimentos- fonte de zinco para suprir a recomendação preconizada.

7- CONCLUSÕES

- O método de determinação de zinco eritrocitário usado foi validado e considerado adequado para os propósitos de pesquisa do presente trabalho.
 - A concentração de zinco eritrocitário das mulheres avaliadas foi de $38,2(\pm 5) \mu\text{gZn/gHb}$ com intervalo de confiança de 35,6 a $40,2\mu\text{gZn/gHb}$.
 - Considerando simultaneamente o intervalo de confiança para a distribuição de valores de ingestão de zinco (de 8,5 a 11,0 mg/d) e de concentração de zinco eritrocitário (de 35,6 a 40,2 $\mu\text{g Zn/g Hb}$), a maioria do grupo estudado ($n=20$) apresentou concentração de zinco e ingestão dentro do padrão de normalidade, portanto não são deficientes desse mineral.
 - 81% das 21 mulheres avaliadas apresentaram ingestão adequada ($>6,8 \text{ mgZn/dia}$).
 - Os alimentos - fonte de zinco na dieta do grupo avaliado, assim classificados por apresentarem mais do que 1,2 mg Zn/ porção habitual foram: carne bovina, lingüiça, carne suína, queijo gouda, queijo branco, queijo mussarela, queijo prato, fígado e amendoim. Os que foram considerados fontes pela frequência diária de ingestão são: leites, iogurtes, pão integral e pão francês, macarrão arroz polido e arroz integral, salsicha, salame e batata. Os valores de concentração de Zinco desses alimentos poderão alimentar as tabelas de composição nacionais.
-

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, S.M. E SAMMAN, S. The effect of increasing dietary zinc on the activity of superoxide dismutase and zinc concentration in erythrocytes of healthy female subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 5, p. 327-32, 1993.

BARROS, C.B.; HIRATA, Y.S. **Validação de métodos analíticos**. Taboão da Serra: Isolab, 1997. 157 p. (Apostila de curso).

BERDANIER, C.D. **Advanced nutrition: micronutrients**, vol.2, New York: CRC Press, 1998. p. 236

BETTS, N.M. e MA, J. Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in the 1994 – 1996 continuing survey of food intakes by individuals (CSFII) **Journal of Nutrition**. 130:2838-2843, 2000.

BRASIL. Resolução nº 39 de 21 de março de 2001. **Tabela de valores de referência para porções de alimentos e bebidas embaladas para fins de rotulagem nutricional Diário Oficial da república Federativa do Brasil** (Brasília, 22 de março de 2001).

BROWN, K.H.; WUEHLER, S.E.; PEERSON, J.M. The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency **Food of Nutrition Bulletin**, v. 22, n. 2, p. 113-125, 2001.

CHAIRMAN, L.H.K. ; CRUMMETT, W.; DEEGAN, J.J.; LIBBY, R.A.; TAYLOR, J.K.; WENTLER, G. **Principles of environmental analyses. Analytical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 14, p. 2210-2218, 1983.

CHICOUREL, E.L. **Zinco: efeito da suplementação no desenvolvimento físico e cognitivo de pré – escolares**. 2001. 150 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

As referências bibliográficas estão de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas Bibliográficas (2000).

CORDEIRO, M.B. Adequação Alimentar do estado nutricional em relação do zinco em grupos de idosos de São Paulo. 1994. 120 f. Tese (Doutorado em Alimentos e nutrição experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995) *Analytica Chimica Acta*, n. 391, p.105-126, 1999.

DEUSTER, P.A ; TROSTMANN, ERAN.D. Indirect vs direct measurement magnesium and zinc in erythrocytes *Clinical Chemistry*, v. 33, n. 4, p. 529-532, 1987.

DUX, J.P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New York: Van Nostrand Reinhold, 1986. 120p.

FEINBERG, M.; BUGNER, E. Chemometrics and food chemistry; data validation. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 223, p. 223-235, 1989.

FISBERG, M. ; FERNANDES, R.L.; MITTERMAYER, O. Deficiência de zinco em pediatria *Nutrição em Pauta*, ano IV, n. 48, 2001.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. Quality assurance in analytical chemistry . Weinheim : VCH, 1995. 238 p.

GARROW, J. S.; WEBSTER, J. Quetelet's index (W/H^2) as a measure of fatness. *Interation Journal of Obesity*. v. 9, p. 147-53, 1985.

GIBSON, R.S. Assessment of trace element status in humans. *Progress in Food and Nutrition Science*, 13: 67-111, 1989.

GIBSON, R.S. Principles of Nutritional Assessment. New York: Oxford, University Press, p. 543-53, 1990.

GIBSON, R.S. & FERGUSON, E.L. Assessment of dietary zinc in a population **American Journal Clinical Nutrition**. 68(suppl):430S-434S, 1998.

HYDE, T. A. ; MELLOR, L.D. Química. In: STANLEY, R. ; LYNCH, S. **Técnicas de laboratório**. 4. ed. São Paulo, 1986, p.1053.

HORWITZ, W Evaluation of analytical methods used for regulation of foods And drugs. **Analytical Chemistry** , Washington, v. 54, n. 1, p. 67 A -76 A, 1982.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo, 1985

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM) – **Dietary Reference Intakes – Applications - in dietary assessment**, National Academy Press, Washington, D.C. , 2000. P.185-202.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM) – **Dietary Reference Intakes for vitamin A, Vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicion, vanadium, and zinc** National Academy Press, Washington, D.C. , 2000. p. 9-78.

KING, J. C. Assessment of techniques for determining human zinc requirement **Journal of the Americam Dietetic Association**, v. 86, n. 86, p. 1523-1528, 1986.

KING, J. C. ; KEEN, C.L. Zinc. In: SHILS, M.E.; OLSON, J. A. ; SHIKE, M. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 8 th Philadelphia: A Waverly Company, v. 2, p. 198-211, 1994.

KREBS, F.N. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastriontestinal tract **Journal of Nutrition**, 130:1374S-1377S, 2000.

LADEFOGED, K. E. HEGEN, K. Correlation between concentrations of magnesium, zinc and potassium in plasma, erythrocytes and muscles. **Clinica Chimica Acta**, 177: 157-66, 1988.

MACCANCE, R. A; WIDDOWSON, E.M. – **The composition of foods**, Royal Society of Quemistry , Ministry of Agriculture, 5. th, 1991. 462 p.

MAFRA, D. **Avaliação do Estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com insuficiência renal crônica**. 1998. 100 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MARI, E.T.L. **Análises uni e multivariada na avaliação do estado nutricional de atletas de polo aquático feminino: enfoque em minerais**. 2002. 172 f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Nutrição Humana Aplicada) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARQUES, A G. **Gosto e zinco eritrocitário em crianças de São Paulo**. 1999. 100 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

NISHI. Y . zinc levels in plasma, erythrocyte and leucocyte in healthy children and adults. **Journal of Medical Science**, Hiroshima, 29:7-13, 1980.

NOGUEIRA, E. **Estudo comparativo sobre os efeitos da suplementação com ferro (diferentes concentrações), ácido fólico e zinco no estado nutricional de adolescentes grávidas e de seus conceptos**. 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

ORTEGA , R.S. ; QUINTAS, M.E.; ANDRÉS, P.; MARTINEZ, R.M.; SOBALER, A . M. L.;REQUEJO, A .M. Zinc status of a group pregnnant spanish women:effects on anthropometric data and apgar scores of neonates. **Nutrition Research**, v. 19, n. 9, p. 1423-1428, 1999.

PAO,E.M. & CYPEL, Y.S. Estimation of dietary intake In: ZIEGLER, E.E.; FILER, Jr. Present knowledge in nutrition 7th edition. ILSI Press, Washington, DC,1997,497-508.

PEDROSA, L.F. C. **Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco de crianças com diabetes mellitus insulino dependente.** 1997. 109 f. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PHILIPPI, S.T.; SZARFAC, S.C.; LATTEZA, A , R. **Virtual Nutri**, versão 1.0 (software). São Paulo: Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 1996. 1 CD-ROM.

PRASAD, A .S. ; OBERLEAS, D. ; HALSTED, J.A . Determination of zinc in biological fluids by atomic absorpyion spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects **Journal of Laboratory & Clinical Medical** , v. 66, n. 3, 1965.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in women, infants and children. **Journal of Nutrition**, Philadelphia v. 15,n. 2, p.113-120, 1996.

RAMOS, K.S. **Efeito do processamento sobre as concentrações de ferro em carnes e em pulmão bovino.** 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

REEVES, P.G. , NIELSEN, F.H. , FAHEY Jr, G.C. AIN – 93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation the Ain-76^A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, p. 1939-1951,1993.

SALGUEIRO,M.J., ZUBILLAGA, M., LYSIONEK, SARAIBIAM.I., CARO, R., PAOLI, T., HAGER, A, WEILL, R., BOCCIO, J. Zinc as essential micronutrient :a review **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000.

SANDSTROM, B. Bioavailability of zinc. **European Journal of Clinical of Nutrition**, v. 51, Suppl.1 , p. S17-S19, 1997.

SARIS, N.E.;MERVAALA, E;KARPPANEN, H.;KHAWAJA, J.A. LEWENSTAM, A . Review. Magnesium na update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinical Chimica Acta**, v. 194, p. 1-26, 2000.

SOLOMONS, N.W. On the assessment of zinc and copper nutriture in man **American Journal of Clinical Nutrition** 32: 856-871, 1979.

SPRENGER, K.B.G.; FRANZ, H.E. Viscosity for automated micromethod of flame absorption spectrometry, and intracellular trace element analysis after pressure decomposition: zinc determination in plasma and erythrocytes **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 8, p.1522-1526, 1983.

TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. Chelsea; Lewis, 1987. 328 p.

TRAMONTE, V.L.C. **Biodisponibilidade de ferro e zinco de dieta típica da população brasileira de baixa renda, estudo com isótopos estáveis em humanos**. 1994. 143 f. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

VALLEE, B. L. e FALCHUK, K. H. **The biochemical basis of zinc physiology**. *Physiology Reviews*. v. 73, n. 1, 1993.

VÁSQUEZ, J.W.P. **Avaliação do estado nutricional de atletas maratonistas em fase - pré competitiva. Uma abordagem referente ao ferro**. 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

VOET, H.V.D.; RHINJIN, J. A WIEL, H. Interlaboratory, time, and fitness for purpose aspects of effective validation **Analytica Chimica Acta**, 399:157-171, 1999.

WHITEHOUSE, R.C.; PRASAD, A.S.; RABBANI, P.I.; COSSACK, Z.T. – Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 475-80, 1982.

WANG, G. e LI, X. Assuring regional data quality in the food composition program in china. In: **INTERNATIONAL FOOD DATA BASE CONFERENCE**, 1., Sidney, 1995. Proceedings. Arlington, AOAC International, 1995, p. 119 – 128.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans **Journal of Nutrition** 130:1350S -1354S, 2000.

Anexo 1 – Convite formal para as voluntárias participarem do projeto



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPTO. DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
EXPERIMENTAL

Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900 S.Paulo Brasil
Fax (00 55) (11) 815 4410

Laboratório de Nutrição. F: 818 3651

CONVITE

São Paulo, dede 1999

Ilmo Sr. (a)

Por meio da presente, formalizamos o convite para que participe do projeto "Avaliação do estado nutricional em minerais (Zn, Cu, Fe e Mg) de jogadoras de Pólo Aquático em fases pré -competitiva". O referido estudo será realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e no INCOR (Instituto do Coração).

O estudo tem como objetivo geral a avaliação do estado nutricional, de vários minerais, em atletas de competição da modalidade Pólo Aquático.

Com essa finalidade, serão realizadas as avaliações:

- A- Consumo Alimentar
- B- Antropometria
- C- Eritrograma
- D- Soro, para análise de outros minerais
- E- Teste Ergoespirométrico

Cada indivíduo participante será comunicado oportunamente sobre as datas das avaliações. Os resultados serão fornecidos individualmente para todos os indivíduos participantes do projeto.

Agradecendo antecipadamente a sua participação, ficamos a seu dispor para qualquer esclarecimento - Fone: (011) 818-3651.

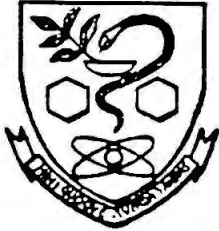
Atenciosamente.

Dra Célia Colli
Lab. de Nutrição
FCF/USP

Eliane Teixeira Luz Mari
Lab. de Nutrição
FCF/USP

Fátima A. Arantes Sardinha
Lab. De Nutrição
FCF/USP

Anexo 2 – Termo de consentimento e de responsabilidade – pós
informação para as voluntárias participarem do projeto



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPTO. DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
EXPERIMENTAL
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900 S.Paulo Brasil
Fax (00 55) (11) 815 4410

Laboratório de Nutrição. F: 818 3651

TERMO DE CONSENTIMENTO - PÓS-INFORMAÇÃO

São Paulo, de de 1999

Eu,....., anos de idade,
RG....., residente na R./Av.....
Nº..... Bairro....., no município de
....., Estado de aceito
participar como voluntária no trabalho de pesquisa denominado, "**Avaliação do estado nutricional em minerais (Zn, Cu, Fe e Mg) de jogadoras de Pólo Aquático em fases pré e pós competitiva**", cuja pesquisadora responsável é Prof. Célia Colli , telefone (011) 818-3651.

Declaro também que tenho pleno conhecimento das seguintes informações:

1. Que os dados obtidos na minha avaliação serão comparados aos obtidos em atletas de polo aquático feminino.
2. Que serão coletados 25 ml de sangue, uma única vez, em jejum de 12 horas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, bloco 17 com materiais descartáveis de alta qualidade.

Meu sangue será colhido da veia de um dos braços e eu deverei estar sentada ou deitada. O único risco na coleta é de extravasamento do sangue devido à fragilidade da veia e/ou estado de tensão, podendo acarretar aparecimento de um hematoma, que desaparecerá no máximo em uma semana. Nesse caso, a área poderá ficar um pouco dolorida. Eventualmente poderá ocorrer sensação de tontura.

3. Que eu realizarei um Teste Ergoespirométrico, uma única vez, no Laboratório de Teste de Exercício Cardio Pulmonar - INCOR, que será monitorizado por pessoal técnico especializado. O teste consistirá em avaliar a minha capacidade física, após esforço realizado pedalando em uma bicicleta. Será introduzido em minha boca um tubo, onde ficará o ar que será expelido durante a realização do esforço. Eu poderei ficar cansada por alguns minutos, mas não há riscos de acidentes.

4. Que eu receberei um impresso de *Gasto Energético* onde eu deverei anotar, com responsabilidade, todas as atividades que desenvolver pelo período de 3 dias, com a finalidade de determinar o meu gasto energético diário.

5. Que eu receberei um impresso de *Registro Alimentar de 3 Dias* para anotar, com muita atenção e detalhe, tudo o que eu beber e comer nestes dias, sem mudar meus hábitos alimentares no período de anotação, com o objetivo de calcularem a minha ingestão calórica.

6. Que eu receberei uma *Ficha de Cadastramento* para anotar informações pessoais de interesse ao projeto de pesquisa.

7. Que eu serei entrevistada por um pesquisador para responder um Questionário de Freqüência Alimentar Específico e dados sobre saúde (*Investigação Clínica*).

8. Que eu serei avaliada fisicamente a partir do levantamento de dados como peso, altura e dobras cutâneas. As dobras serão medidas com um aparelho chamado adipômetro, que se assemelha a uma pinça de maior proporção. O pesquisador irá pinçar com o polegar e o indicador a pele de algumas partes de meu corpo (braço, costas, abdômen, perna), e fará a leitura da dimensão das dobras com o aparelho. Poderá ocorrer vermelhidão e ligeira dor no(s) local (is) somente no ato da medida.

9. Que receberei resposta a qualquer pergunta e/ou esclarecimento sobre minhas dúvidas a respeito de assuntos relacionados com a pesquisa:

10. Que os resultados obtidos com os meus dados serão comentados individualmente após avaliação final dos pesquisadores envolvidos.

11. Caso houver algumas alterações importantes em uma de minhas avaliações, serei encaminhado a um especialista

12. Que não será devido pela pesquisadora responsável qualquer remuneração pela minha participação nesse estudo.

13. Que para qualquer recurso ou reclamação poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo através do telefone (011) 818-3677.

..... de de 1999.

.....
Assinatura do voluntário

.....
Assinatura do responsável

Anexo 3 - Ficha de cadastramento /hábitos de saúde das voluntárias

FICHA DE CADASTRAMENTO/ HÁBITOS DE SAÚDE

Nome.....

Data de nascimento:___/___/___ Idade:.....

Endereço:

Fone: Res.....Com.....

Celular Page

Nível de escolaridade:

(1) Superior (2) Colegial completo (3) Colegial incompleto (4) Ginásio (5)

Ausência de escolaridade

Ocupação:

Estado civil:

Já recebeu algum tipo de orientação nutricional?

 sim não

Com quem?

 médico nutricionista outros

OBS.

Tem algum problema de saúde crônico?

 não sim Qual?_____

Apresentou, durante o último ano, algum problema de saúde?

 não sim Qual?.....

Foi necessário realizar algum exame de sangue? () sim () não

Tem hábito de consumir medicamentos e/ou suplementos nutricionais?

() Não () Sim: () conta própria () prescrição médica

Com que frequência tem consumido?.....

Toma a medicação:

() corretamente de acordo com bula ou prescrição

() falha algum dia por esquecimento

() pára de tomar quando acha que não é mais necessário. mesmo que não tenha completado a dose prescrita.

Está consumindo algum medicamento/suplemento nutricional atualmente? ()

Não

() Sim. Qual (is)?

Anexo 4 - Questionário de investigação médica de cada voluntária

Antecedentes familiares : () Não () Sim _____

Apetite : () Inapetência () Normal () Aumentado

Mastigação: () Rápida () Adequada () Lenta () Compulsiva

Alterações gastrintestinais: () Pirose /Azia () Obstipação () Distensão ()

Flatulência () Diarréia () Hemorróida/Fístula () Outros _____

Presença de vômitos/enjôo: () Não () Pós prandial () Pré prandial

() misto () Outros _____

Evacuações: () Diária () Alternada () > 2 dias () > 4 dias

Consistência das fezes: () Líquida () Pastosa () Ressecada

Usa laxante ? () Não () Sim

Ingestão de água: () < 2 copos/dia () 2 a 4 copos/dia () 5 a 6 copos/dia

() > 2 L/dia

Hábito urinário:

Aspecto da urina: () Bem claro () Amarelado/normal () Concentrado

Hipoglicemia: () Não () Sim Momentos: _____

Idade da primeira menstruação: _____

Ciclo Menstrual: () Normal () Alterado

Anemia: () Não () Sim Quando/Tipo: _____

Cãibras: () Não () Sim Momentos: _____

Resistência Imunológica: _____

Fadiga Muscular: () Não () Sim Momentos: _____

Exames Bioquímicos: () Não () Sim Qual(is)/Quando/Resultados (mais recentes): _____

Ansiedade: () Não () Sim Momentos _____

Preferência Alimentar: _____

Aversão Alimentar: _____

Alergia Alimentar: _____

Intolerância Alimentar: _____

Anexo 5 – Alimentos fontes de zinco na dieta e sua concentração em base integral .

Dados de duas tabelas - Escola Paulista de Medicina de São Paulo e (McCande e Virtual Nutri) e a concentração do alimento analisado no laboratório de nutrição.

Alimento	Conc. Tabela McCande Virtual Nutri mgZn/100g	Conc. Tabela EPMSP (USDA) mgZn/100g	Conc. mgZn/100g analisado
Leite integral Shefa	0,34	0	0,34
Leite semi-desnatado carrefour	0,35	0	0,32
Leite desnatado carrefour	0,40	0	0,47
Queijo branco –minas frescal	3,1	NE	4,2
Queijo prato Quatá		3,0	3,5
Queijo mussarela Quatá	2,5	2,0	3,5
Queijo provolone Quatá	3,2	3,0	3,9
Queijo gouda Quatá	3,9	4,0	3,6
Iorgute natural	0,45	1,0	0,27
Iorgute com frutas	0,74	1,0	0,57
Arroz integral cozido unclesbens	0,70	1,0	0,54
Arroz branco cozido tio João	0,70	1,0	0,69
Macarrão parafuso cozido adria com ovos	0,50	1,0	0,35
Batata frita (feira)	0,30		0,66
Peito de frango cru temperado sadia	0,70	1,0	0,79
Peito de frango cozido temperado sadia	1,09	1,0	0,76
Lingüiça de porco aurora	1,2	2,0	2,00

Alimento	Conc. Tabela McCande Virtual Nutri mgZn/100g	Conc. Tabela EPMSP(USDA) mgZn/100g	Conc. mgZn/100g analisado
Lingüiça de porco frita aurora	2,58	3,0	3,4
Lombo cru (carrefour)	1,60	2,0	1,54
Lombo frito (carrefour)	1,78	3,0	2,2
Fígado cru (feira)	5,4	4,0	5,5
Fígado frito (feira)		5,0	7,8
Pescada branca crua(feira)		1,0	0,8
Pescada branca frita(feira)	1,00	1,0	1,00
Bife (coxão mole) cru carrefour	4,3	5,0	3,2
Bife (coxão mole) frito Carrefour	7,7	7,0	4,1
Carne moída (coxão mole) crua	4,3	5,0	4,8
Carne moída(coxão mole) refogada	5,4	4,5	4,5
Salsicha de frango crua perdigão	1,6	1,0	1,8
Salsicha de frango cozida perdigão	1,6	1,0	1,9
Pão francês (padaria)	0,70	1,0	1,06
Pão integral vikbold	1,8	2,0	2,2
Salame sadia	2,12	4,0	4,5
Ovo frito	1,38	1,0	2,4

Anexo 6 – Concentrações de zinco (mgZn/100g) com seus respectivos coeficientes de variação (C.V.) % em base seca e na base integral nos alimentos consumidos pelas mulheres avaliadas neste estudo

Alimento	Conc.Zn mgZn/100g Base integral Média(DP)	C.V. (%)	Conc.Zn mgZn/100g Base seca Média(DP)	C.V. (%)
Arroz branco	0,7(0,03)	3,8	2,3(0,009)	3,9
Arroz integral	0,5(1,70)	4,0	2,7(0,09)	3,3
Lingüiça crua	2,0(0,73)	3,6	6,7 (0,25)	3,9
Lingüiça frita	3,4(1,40)	4,2	6,10(0,13)	2,1
Carne suína crua	1,5(0,66)	4,2	6,5 (0,36)	5,6
Carne suína frito	2,2(1,20)	5,5	4,9(0,21)	4,3
Carne bovina crua	3,2(0,78)	2,4	11,1(0,40)	3,6
Carne bovina frita	4,1(1,60)	3,8	11,9(2,5)	2,5
Queijo mussarela	3,4(4,0)	9,0	6,8(0,72)	9,0
Queijo provolone	3,9 (1,60)	4,0	6,4(0,30)	4,2
Queijo branco	0,41(0,71)	1,7	4,0(0,13)	3,1
Queijo gouda	3,6(1,50)	4,0	7,0(0,30)	4,1
Queijo prato	3,5(0,90)	2,7	6,8(0,20)	2,6
Frango cru	7,6(0,16)	2,1	3,0(0,06)	2,0
Frango cozido	7,9(1,03)	9,0	2,1(0,32)	9,0
macarrão	0,35(0,09)	2,5	1,0(0,02)	2,4
Leite integral	0,35(0,9)	8,0	4,3(0,26)	6,0

Alimento	Conc.Zn mgZn/100g Base integral Média(DP)	C.V. (%)	Conc.Zn mgZn/100g Base seca Média(DP)	C.V. (%)
Leite desnatado	0,40(0,38)	8,0	6,8(0,50)	7,4
Leite semi	0,45(0,66)	8,0	3,3(0,50)	9,0
Pão francês	1,0(1,60)	8,0	1,6(0,21)	8,0
Pão integral	2,2(1,30)	6,0	2,4(0,20)	8,5
logurte natural	0,26(0,24)	9,0	1,8(0,18)	9,0
logurte c/frutas	0,57(1,90)	8,0	2,3(0,05)	2,5
Ovo frito	2,4(0,62)	2,5	8,6(0,21)	2,5
Batata crua	0,41(0,14)	3,0	2,5(0,08)	3,3
Batata frita	0,66(0,73)	9,0	2,0(0,20)	9,0
Salsicha crua	1,77(0,66)	3,6	4,1(0,15)	3,6
Salsicha cozida	1,9(0,17)	0,8	4,3(0,03)	0,8
Peixe cru	0,8(0,24)	3,0	5,3(0,15)	3,0
Peixe frito	1,0(0,37)	3,7	3,9(0,09)	2,5
Fígado cru	5,5(6,0)	8,0	21(1,9)	8,5
Fígado frito	7,8(1,30)	1,6	19(0,32)	1,7
salame	5,6(3,90)	7,0	9,2(0,13)	1,5
Carne bovina refogada e moída	5,3(9,30)	8,0	12(2,25)	8,0
Carne bovina crua e moída	4,7(3,40)	7,1	15(1,12)	7,5