

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Thaís dos Santos Berón

**DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE METAIS EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE
EMISSÃO ÓPTICA APÓS PROTOCOLOS *IN VITRO***

Santa Maria, RS
2023

Thaís dos Santos Berón

**DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE METAIS EM SUPLEMENTOS
ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA APÓS
PROTOCOLOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello

Santa Maria, RS
2023

Berón, Thaís dos Santos
DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE METAIS EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO
ÓPTICA APÓS PROTOCOLOS IN VITRO / Thaís dos Santos Berón.-
2023.
90 p.; 30 cm

Orientadora: PAOLA DE AZEVEDO DE AZEVEDO MELLO
Coorientadora: ALINE LIMA HERMES MULLER
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2023

1. Suplementos alimentares 2. Elementos essenciais 3.
Elementos não essenciais 4. Bioacessibilidade 5. ICP OES
I. DE AZEVEDOMELLO, PAOLA DE AZEVEDO II. LIMA HERMES
MULLER, ALINE III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, THAÍIS DOS SANTOS BERÓN, para os devidos fins e sob as penas dalei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estado ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thaís dos Santos Berón

DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE METAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA APÓS PROTOCOLOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovado em 14 de Abril de 2023:

Paola de Azevedo Mello, Dra. (UFSM)
(Orientadora)

Rochele Sogari Picoloto, Dra. (UFSM)

Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA), pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa.

À Profa. Dra. **Paola de Azevedo Mello** pela orientação neste trabalho, pela confiança, exemplo profissional, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e amizade.

À Profa. Dra. **Rochele Sogari Picoloto** e a Profa. Dra. **Fabiana Ernestina Barcellos da Silva** pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho. Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. **Aline Lima Hermes Muller** e o Prof. Dr. **Rodrigo Cordeiro Bolzan** pelas valiosas contribuições nesse trabalho.

Aos colegas do **LAQIA/CEPETRO** do Departamento de Química da UFSM, de um modo geral, pelo convívio, amizade e colaboração no desenvolvimento desse trabalho. Aos funcionários da secretaria do PPGQ, em especial ao **Ademir** e o **Miguel**, pela atenção e disponibilidade demonstradas durante as atividades do mestrado.

Em especial, agradeço a minha família que sempre incentivou minha vida acadêmica e deu o suporte necessário para que isso fosse possível, principalmente a minha mãe **Valdereza** e o meu pai **Gustavo** (*in memoriam*) pelo carinho e dedicação. Agradeço aos amigos que estiveram comigo desde do início e aos que conquistei durante a minha trajetória.

“A metamorfose é irreversível. Depois que voa, a borboleta jamais volta a rastejar”.

(Wandy Luz)

RESUMO

DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE METAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA APÓS PROTOCOLOS *IN VITRO*

AUTOR: Thaís dos Santos Berón

ORIENTADORA: Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello

Suplementos alimentares são definidos como produtos para complementar a dieta e fornecer nutrientes essenciais para os seres humanos. Podem conter vitaminas, minerais, produtos botânicos, aminoácidos, ou qualquer combinação destes. Dentre os nutrientes fornecidos pelos suplementos alimentares encontram-se os elementos essenciais e não essenciais. A bioacessibilidade é definida como a fração de um nutriente que é liberado da sua matriz no trato gastrointestinal, tornando-a disponível para uma absorção eficiente pelo intestino. Diferentes metodologias podem ser aplicadas para avaliar a bioacessibilidade dos elementos, e os métodos *in vitro* têm sido amplamente utilizados, principalmente devido ao seu menor custo e à sua fácil aplicação. O Grupo de Pesquisas em Bioacessibilidade da Europa (UBM BARGE, do inglês *Bioaccessibility Research Group of Europe*) desenvolveu um método unificado de bioacessibilidade (UBM, do inglês *unified bioaccessibility method*) a fim de produzir um procedimento *in vitro* validado e padronizado. Outro método de bioacessibilidade *in vitro* foi também estabelecido num consenso internacional pela ação COST (*European Cooperation in Science and Technology*) INFOGEST. Neste trabalho, a bioacessibilidade de alguns elementos essenciais (Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Zn, V) e não essenciais (Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Cr, La, Pb, Sr) foi avaliada empregando os protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST. A determinação foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a avaliação das interferências foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Para tal, foram utilizadas quatro amostras de suplementos alimentares de diferentes classes (vitamínicos, minerais e botânicos). A concentração total dos elementos essenciais e não essenciais foi determinada por ICP OES após digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas. O procedimento UBM BARGE consistiu em duas fases, simulando os processos digestivos da boca, estômago e intestino, em que a primeira fase simula a fase gástrica (saliva + fluido gástrico) e a segunda fase simula a fase gastrointestinal (fluido duodenal + bile). Por outro lado, pelo método COST INFOGEST a fase gástrica e a gastrointestinal são obtidas em uma única etapa (saliva + fluido gástrico + fluido intestinal). Todas as extrações foram realizadas a 37 °C e sob agitação, como sugerido por ambos os protocolos. A concentração total de Ag, As, Be, Cd, Co, La, Ni, Pb e V em todas as amostras ficou abaixo do limite de quantificação (LQ) do método, e a bioacessibilidade desses elementos não foi avaliada. As frações bioacessíveis utilizando o método UBM BARGE foram poucos significantes para alguns elementos como Al, Ba, Cr, Fe, Sr e Zn (até 34% dependendo da amostra), e mais elevadas para outros, como para Cu, Mg, Mn, Mo (acima de 98% em alguns casos). Considerando o método COST INFOGEST, frações bioacessíveis de até 39% foram obtidas para Ba, Fe, Mg, Mn, V e Zn. Por outro lado, para Cu e Mo, frações de até ou acima de 77% foram observadas. Os resultados obtidos para as frações bioacessíveis de elementos essenciais e não-essenciais em suplementos alimentares apresentaram diferença dependendo do método utilizado, o que denota para a necessidade de uma avaliação cautelosa para cada matriz e analito.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. Elementos essenciais. Elementos não essenciais. Bioacessibilidade. ICP OES.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE BIOACCESSIBILITY OF METALS IN FOOD SUPPLEMENTS BY OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY AFTER *IN VITRO* PROTOCOLS

AUTHOR: Thaís dos Santos Berón
ADVISOR: Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello

Dietary supplements are defined as products to supplement the diet and provide essential nutrients for the humans. They can contain vitamins, minerals, botanical products, amino acids, or any combination of these. The large consumption of dietary supplements can be associated with several factors, as awareness of the people with health care, higher consumption by athletes and bodybuilding exercises practitioners for better performance and gain of muscle mass, among others. Among the nutrients provided by dietary supplements, there are the essential and non-essential elements and the evaluation of their bioaccessibility is crucial. Bioaccessibility is defined as the fraction of a nutrient that is released from its matrix in the gastrointestinal tract, making it available for efficient absorption by intestine. Different methodologies can be applied to determine the bioaccessibility of elements, and the *in vitro* methods have been widely used, mainly due to their lower cost and easier application. The Bioaccessibility Research Group of Europe (UBM BARGE) developed a unified bioaccessibility method (UBM) in order to produce a validated and standardized *in vitro* procedure. Another bioaccessibility *in vitro* method was also established in a consensus by the COST (European Cooperation in Science and Technology) INFOGEST international network. Thus, in this work the bioaccessibility of some essential (Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Zn, V) and non-essential elements (Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Cr, La, Pb, Sr) was determined by using the UBM BARGE and COST INFOGEST protocols, and further determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and the interference was evaluated by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). Four samples of dietary supplements of different classes (vitamins and minerals, minerals, and botanicals) were used. Total concentration of the essential and non-essential elements was determined by ICP OES after microwave-assisted wet digestion. The UBM BARGE procedure consisted of a three-stage process, simulating the digestive processes of the mouth, stomach, and small intestine, where the first stage simulates the gastric phase (saliva + gastric fluid), and the second stage simulates the gastrointestinal phase (duodenal fluid + bile). On the other hand, the COST INFOGEST method produces the gastric and the gastrointestinal phase in only one stage (saliva + gastric fluid + intestinal fluid). All extractions were performed at 37 °C as suggested by both protocols, because the enzyme activity and chemical characteristics, such as solubility, are affected by the temperature. The total concentration for Ag, As, Be, Cd, Co, La, Ni, Pb, and V were below the limits of quantification (LQ) of the method in all samples, and these elements were not considered for the bioaccessibility study. The bioaccessible fractions using the UBM BARGE method were low for some elements, as Al, Ba, Cr, Fe, Sr and Zn (up to 34% depending on the sample), and higher for others, like Cu, Mg, Mn and Mo (above 98% for some elements). Considering the COST INFOGEST method, the bioaccessible fractions for Ba, Fe, Mg, Mn, V and Zn were up to 39%, depending on the sample. On the other hand, higher bioaccessible fractions were found for Cu, Mo (above 77% depending on the sample). The results obtained for the bioaccessible fractions of the essential and non-essential elements in the dietary supplements samples showed differences depending on the method used, requiring a careful evaluation for each matrix and analyte.

Keywords: Dietary supplements. Essential elements. Non-essential elements. Bioaccessibility. ICP OES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento de ICP OES utilizado nesse trabalho.....	32
Figura 2 - Equipamento de MIP OES utilizado nesse trabalho.....	34
Figura 3 - Equipamento de micro-ondas utilizado nesse trabalho.....	36
Figura 4 - Incubadora utilizada nesse trabalho.....	37
Figura 5 - Resíduo proveniente do método COST INFOGEST	45
Figura 6 - Fluxograma dos procedimentos executados nesse trabalho.	49
Figura 7 - Posições de aquecimento na incubadora utilizadas para as etapas de aquecimento dos protocolos de bioacessibilidade	52
Figura 8 - Fluxograma representativo do procedimento experimental segundo o método UBM BARGE.....	54
Figura 9 - Frações bioacessíveis de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método UBM BARGE na fase gástrica (■) e fase gastrointestinal (■). A linha tracejada representa a concentração total do elemento em cada amostra.....	55
Figura 10 - Fluxograma representativo do procedimento experimental segundo o método COST INFOGEST.....	62
Figura 11 - Frações bioacessíveis de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método COST INFOGEST na fase gastrointestinal (■). A linha tracejada representa a concentração total do elemento em cada amostra.....	63
Figura 12 - Efeitos provocados pela matriz proveniente do método COST INFOGEST na determinação de Pb (■), Mo (■), La (■), V (■), Zn (■), As (■), Cd (■), Mn (■), Fe (■), Be (■), Sr (■), Cu (■), Ag (■), Co (■), Ni (■), Ba (■), Mg (■), Cr (■) e Al (■) por MIP OES. A linha preta contínua representa a resposta obtida para a solução de referência em HNO ₃ 5% (100%) e a linha preta pontilhada representa o desvio-padrão expandido (19%), I_{rel} = Intensidade do analito na solução de diluição do digerido em relação a solução de referência. ...	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos suplementos alimentares de acordo com a legislação sanitária brasileira	16
Tabela 2 - Aspectos principais de trabalhos publicados para determinação elementar e avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares ou similares empregando diferentes técnicas.	22
Tabela 3 - Condições operacionais para as determinações por ICP OES.	33
Tabela 4 - Condições operacionais para determinações por MIP OES.	35
Tabela 5 - Informações sobre as amostras utilizadas no trabalho.	38
Tabela 6 - Constituintes da saliva, fluido gástrico, fluido duodenal e bile para o método UBM BARGE.....	40
Tabela 7 - Constituintes da saliva, fluido gástrico, fluido duodenal e bile do método COST INFOGEST.....	41
Tabela 8 - Concentração total de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares, obtidos por ICP OES (média ± desvio padrão, n=3)	53
Tabela 9 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gástrica, utilizando o método UBM BARGE e posterior determinação por ICP OES (média ± desvio-padrão, n=3).	57
Tabela 10 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gastrointestinal, utilizando o método UBM BARGE e posterior determinação por ICP OES (média ± desvio-padrão, n=3).	58
Tabela 11 - Resultados para a concentração elementar por ICP OES no resíduo da extração utilizando o método UBM BARGE (média ± desvio-padrão, n=3).	61
Tabela 12 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gastrointestinal, utilizando o método COST INFOGEST e posterior determinação por ICP OES (média ± desvio-padrão, n=3). .	64
Tabela 13 - Resultados para a concentração elementar por ICP OES no resíduo da extração utilizando o método COST INFOGEST (média ± desvio-padrão, n=3).....	66
Tabela 14 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares elementos na etapa que simula a fase gástrica (só com HCl 1 mol/L), utilizando o método UBM BARGE (média ± desvio-padrão, n=3).	68

Tabela 15 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares elementos na etapa que simula a fase gastrointestinal (só com HCl 1 mol/L utilizando o método UBM BARGE (média ± desvio-padrão, n=3)..	69
Tabela 16 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na etapa que simula a fase gastrointestinal (só com HCl 1 mol/L utilizando o método COST INFOGEST (média ± desvio-padrão, n=3).....	71
Tabela 17 - Avaliação da influência do ajuste do pH da solução de HCl 1 mol L ⁻¹ para ambos os protocolos.	73
Tabela 18 - Resultados para Ca, K, Na e Mg nos extratos de ensaio de bioacessibilidade em suplementos alimentares.	74
Tabela 19 - Concentração de carbono em digeridos de suplementos alimentares via protocolos de bioacessibilidade (média ± desvio padrão, n=3).	77
Tabela 20 - Concentração de cloro em digeridos de suplementos alimentares para protocolos de bioacessibilidade (média ± desvio padrão).	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UBM BARGE	Grupo de Pesquisa em Bioacessibilidade da Europa, do inglês <i>Bioaccessibility Research Group of Europe</i>
BT	Suplemento alimentar de origem botânica
COST	Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia, do inglês <i>European Cooperation in Science and Technology</i>
DCP AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma de corrente contínua, do inglês <i>direct-current plasma atomic emission spectrometry</i>
DSHEA	Lei de Educação e Saúde de Suplementos Alimentares, do inglês <i>Dietary Supplements Health and Education Act</i>
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente Acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IDR	Ingestão diária recomendada
LQ	Limite de quantificação
MAWD	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted wet digestion</i>
MIC	Combustão Iniciada por micro-ondas, do inglês <i>microwave-induced combustion</i>
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>microwave-induced plasma optical emission spectrometry</i>
MN	Suplemento alimentar de origem mineral
PIQ	Padrão de identidade e qualidade
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
UBM	Método de bioacessibilidade unificado, do inglês <i>unified bioaccessibility method</i>
VM	Suplemento alimentar de origem vitamínico e mineral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	SUPLEMENTOS ALIMENTARES	14
2.2	ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES	17
2.3	BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS QUÍMICOS.....	18
2.4	DETERMINAÇÃO ELEMENTAR UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	32
3.2	AMOSTRAS	37
3.3	REAGENTES	39
3.4	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA NA INCUBADORA PARA ENSAIOS DE BIOACESSIBILIDADE.....	41
3.5	PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM SUPLEMENTO ALIMENTAR	42
3.6	PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	42
3.6.1	Procedimento UBM BARGE para avaliação da bioaccessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares	43
3.6.2	Procedimento COST INFOGEST para a avaliação da bioaccessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares	44
3.6.3	Avaliação do resíduo proveniente dos métodos de UBM BARGE e COST INFOGEST para avaliação da fração remanescente	44
3.6.4	Avaliação da influência do aquecimento em meio aquoso (sem os reagentes dos protocolos)	45
3.7	AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS	45

3.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE C e Cl NOS EXTRATOS DE BIOACESSIBILIDADE.....	46
3.8.1	Procedimentos para determinação da concentração de C nos extratos de bioaccessibilidade	46
3.8.2	Procedimentos para determinação da concentração de Cl nos extratos de bioaccessibilidade	46
3.8.3	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1	AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA TEMPERATURA NA INCUBADORA	51
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ICP OES.....	52
4.3	AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE ELEMENTAR.....	54
4.3.1	Determinação da bioaccessibilidade pelo método UBM BARGE.....	54
4.3.2	Determinação da fração não bioaccessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método UBM BARGE	60
4.3.3	Determinação da bioaccessibilidade pelo método COST INFOGEST	62
4.3.4	Determinação da fração não bioaccessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método COST INFOGEST.....	65
4.4	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AQUECIMENTO EM MEIO AQUOSO ÁCIDO SOBRE A LIXIVIAÇÃO DOS ANALITOS.....	67
4.5	AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS USANDO A MIP OES PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM PROTOCOLOS DE BIOACESSIBILIDADE....	74
4.5.1	Determinação da concentração de C nos extratos de bioaccessibilidade	76
4.5.2	Determinação da concentração de Cl nos extratos de bioaccessibilidade	78
5	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A busca por melhor qualidade de vida e prevenção de doenças, além da melhora estética, tem levado muitas pessoas a utilizarem suplementos associado à uma alimentação balanceada e à atividade física, pois muitos desses produtos prometem resultados como a diminuição da gordura corporal e a hipertrofia muscular (HIRSCHBRUCH et al., 2018).

Os suplementos alimentares são definidos como produtos para complementar a dieta e fornecer nutrientes essenciais para os seres humanos e animais, os quais podem conter vitaminas, minerais, produtos herbais ou botânicos, aminoácidos, ou qualquer combinação destes (WRAGG e CAVE 2011). Para garantir um suprimento adequado de nutrientes aos consumidores, é de extrema importância conhecer a concentração total dos nutrientes presentes nos suplementos alimentares, assim como de elementos essenciais e não essenciais. Porém, muitas vezes, a quantidade de um determinado nutriente ingerido a partir de suplementos alimentares (ou em qualquer alimento) não é absorvida integralmente pelo organismo. Por conta disso, se faz importante conhecer a bioacessibilidade de um elemento a partir de determinado alimento ou via de exposição/administração (SOUZA et al., 2019).

A bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto bioativo ingerido, de características nutricionais ou farmacêuticas, que é liberada no trato gastrointestinal, estando disponível para absorção (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009). A bioacessibilidade de compostos bioativos é dependente de diversos fatores, dentre eles, da matriz do medicamento consumido, da absorção e metabolização do composto pelo organismo, dentre outros (GALANAKIS, 2017).

Diferentes metodologias podem ser empregadas para a determinação da bioacessibilidade de compostos bioativos, dividindo-se em métodos estáticos e dinâmicos (*in vitro*), experimentos *in vivo* e ensaios clínicos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009). O Grupo de Pesquisa em Bioacessibilidade da Europa (UBM BARGE, do inglês *Bioaccessibility Research Group of Europe*) desenvolveu um método unificado de bioacessibilidade (UBM, do inglês *unified bioaccessibility method*) a fim de estabelecer um procedimento *in vitro* validado e padronizado. Outro método de bioacessibilidade *in vitro* foi estabelecido em um consenso internacional pela ação COST (*European Cooperation in Science and Technology*) COST INFOGEST (WRAGG e CAVE, 2011 e DO NASCIMENTO DA SILVA et al., 2018).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens e desvantagens quando comparados com as metodologias *in vivo*. Quanto às vantagens, são considerados métodos relativamente rápidos que permitem controlar condições como pH temperatura e tempo, favorecendo a padronização de um método. Porém, essa característica também pode ser considerada uma desvantagem, pois não representa condições reais do organismo humano, como, por exemplo, o pH da fase gástrica variável durante o processo de digestão. Além disso, não reproduzem condições específicas, considerando as individualidades e todos os fatores que podem afetar o organismo humano. Por outro lado, um fator decisivo para escolha pelos métodos *in vitro* é a possibilidade de coleta nas diferentes fases do processo de digestão, além dos menores custos e menor estrutura necessária (DO NASCIMENTO DA (SILVA et al., 2018).

Para a determinação elementar diversas técnicas podem ser utilizadas, sendo que as espectrométricas, como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) (SMICHOWSKI e LONDONIO, 2018), são as mais comumente aplicadas. Dentre outras características, essa técnica apresenta baixos LDs e pode ser utilizada para determinação multielementar (NOVAES et.al., 2016).

Diante disso, tendo em vista o aumento no consumo de suplementos alimentares, associado com a necessidade de conhecer a concentração total e a fração bioacessível dos elementos presentes, esse trabalho tem como objetivo avaliar a bioacessibilidade de alguns elementos essenciais (Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Zn, V) e não essenciais (Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Cr, La, Pb, Sr) em suplementos alimentares, utilizando os protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST, com posterior determinação por ICP OES. Em virtude da composição dos suplementos alimentares e dos digeridos obtidos nos protocolos de bioacessibilidade, foram avaliadas interferências provenientes da matriz nas determinações por MIP OES.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica está dividida em duas partes. Na primeira parte, serão abordados aspectos gerais acerca de suplementos alimentares, bem como os diferentes protocolos para determinação da bioacessibilidade. Na segunda parte, serão abordados os aspectos da espectrometria de emissão óptica como técnica para determinação elementar.

2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Suplementos alimentares são produtos que servem para complementar a dieta de um indivíduo saudável, com a finalidade de fornecer nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos (BRASIL, 2018). Diferentemente de medicamentos, os suplementos alimentares não são desenvolvidos para tratar, prevenir ou curar doenças (BRASIL, 2018). Ainda assim, podem auxiliar na redução do risco de doenças, sendo essa uma das razões para o número cada vez maior de consumidores recorrendo a estes produtos, acompanhado do crescente e diversificado conjunto de suplementos alimentares disponíveis para consumo (ALMEIDA e BALMANT, 2017). Alguns produtos trazem alegações de saúde ou funcionais, como suplementos de proteínas que auxiliam na formação de músculos e suplementos de vitaminas e minerais que contribuem para a manutenção do cabelo, da pele e das unhas (BRASIL, 2018).

O termo “suplemento alimentar” foi definido pela primeira vez em 1994 com a Lei de Educação e Saúde de Suplementos Alimentares (DSHEA, do inglês *Dietary Supplements Healthand Education Act*). Como sendo um produto que se destina a complementar a dieta e que contém os seguintes ingredientes: vitaminas, minerais, plantas ou produtos botânicos, aminoácidos para suplementação da dieta por aumento da ingestão diária, concentrado, metabólito, constituinte, extrato ou combinação de qualquer ingrediente citado anteriormente (UNITED STATES, 1994).

No Brasil, até 2018, a definição de suplementos alimentares não era prevista pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O enquadramento legal dos produtos dependia basicamente da composição declarada no rótulo e nem sempre era evidente a categoria a qual o produto pertencia, uma vez que os mesmos são conhecidos por constituírem-se de multi-ingredientes. Entretanto, após a publicação da RDC nº 43 da ANVISA, teve-se uma maior clareza em relação à definição de suplementos alimentares (BRASIL, 2018).

De acordo com a nova norma, os suplementos alimentares são produtos com a finalidade de fornecer nutrientes em complemento à alimentação e não podem ser definidos como medicamentos e não servem para tratar ou prevenir doenças. Ao mesmo tempo, na nova norma, foram reunidos produtos que estavam enquadrados em outros grupos de alimentos e foram definidas regras mais apropriadas aos

suplementos alimentares, incluindo limites mínimos e máximos, populações indicadas, constituintes autorizados e alegações com comprovações científicas (BRASIL, 2018).

O mercado de suplementos alimentares no Brasil foi um dos que mais cresceu durante a pandemia, de acordo com a IQVIA (do inglês *IMS Health & Quintiles are now*), empresa norte-americana que estuda o mercado de tecnologia da informação em saúde. Houve um aumento de 47,8% no faturamento no setor no último ano, que já movimentou cerca de R\$ 3,5 milhões (IQVIA, 2021).

Na Tabela 1 é apresentada a classificação dos suplementos alimentares de acordo com a legislação brasileira.

Tabela 1 - Classificação dos suplementos alimentares de acordo com a legislação sanitária brasileira

Categoria	Definição	Exemplos	Legislação
Vitaminas e minerais	Alimentos que servem para complementar a dieta diária de uma pessoa saudável. Devem conter um mínimo de 25% e podem conter no máximo 100% da IDR ¹ .	Suplementos vitamínicos e minerais	Portaria nº 32/1998
Fitoterápicos	Produtos obtidos com o emprego de matérias vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e sejam caracterizadas pela constância de qualidade	Ginkgo biloba	RDC nº 26/2014
Aminoácidos	Produtos necessários para construção de tecidos, músculos, alguns hormônios e enzimas	Metionina e triptofano	RDC nº 18/2010
Medicamentos específicos	Medicamentos à base de vitaminas, minerais e aminoácidos, isolados ou associados entre si, com pelo menos um dos componentes citados acima	Vitamina C (45 mg) e Cálcio (1000 mg)	RDC nº 24/2011
Alimentos para atletas	Alimentos especialmente formulados para auxiliar atletas à atender suas necessidades nutricionais e auxiliar no desempenho dos exercícios	Creatina e cafeína	RDC nº 18/2010

¹IDR – Ingestão Diária Recomendada.

Fonte: Adaptado de NEVES e CALDAS (2015).

2.2 ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os elementos químicos essenciais podem ser classificados quanto à quantidade necessária para o funcionamento fisiológico dos indivíduos em macroelementos (Na, K, Mg, Ca e P), elementos traço essenciais (Fe, Zn, Cu e Mn) e elementos ultra traço essenciais (V, Cr, Mo, Co, Ni, Se), sendo que eles são necessários ao organismo na ordem de gramas, miligramas e microgramas, respectivamente (ANDERSON, 2005). Os macronutrientes são necessários no organismo em maiores quantidades, como, por exemplo, cálcio e magnésio, os quais atuam na formação dos ossos, tecidos e dentes, além de auxiliarem na ativação de enzimas que participam do processo de digestão (FAO/WHO, 1998).

Além disso, outros metais são requeridos em quantidades menores, denominados como micronutrientes, como, por exemplo, ferro, zinco, cobre e manganês, os quais são importantes para o bom funcionamento do organismo (FAO/WHO, 1998). Os elementos não essenciais são aqueles que não apresentam uma função fisiológica bem estabelecida no organismo humano, tais como alumínio, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio. Além disso, dentre esses, alguns podem apresentar efeitos nocivos ao organismo humano quando ingeridos. Até mesmo elementos essenciais que possuem uma atividade biológica conhecida no organismo, quando presentes em concentrações elevadas, têm grande potencial de se tornarem tóxicos (MARTINS, 1998). Apesar dos benefícios que os suplementos alimentares podem trazer à saúde, diversos tipos de contaminantes que podem causar efeitos indesejáveis no organismo podem estar presentes, como metais tóxicos e pesticidas, oriundos principalmente da matéria-prima utilizada e do processo de produção (COSTA et al., 2019). O grau de toxicidade é dependente principalmente da concentração em que os contaminantes elementares estão presentes, além da dosagem e da frequência de uso (TUMIR et al., 2010).

2.3 BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS QUÍMICOS

A simples presença de um nutriente nos alimentos ingeridos em dietas não garante sua total utilização pelo organismo. Ou seja, somente a informação da concentração de um nutriente em um determinado alimento não é um indicador confiável para avaliar esse alimento sob aspectos nutricionais (COZZOLINO, 2005). Para tal informação, é necessário estimar a fração bioacessível de um composto bioativo liberada para absorção pelo organismo.

De forma geral, a bioacessibilidade é definida como a fração de um composto bioativo ingerido, de características nutricionais ou farmacêuticas, que é liberada no trato gastrointestinal, estando disponível para absorção. A bioacessibilidade de elementos químicos é dependente de fatores como a matriz do alimento/medicamento consumido, a absorção e metabolização do composto pelo organismo, o transporte pela corrente sanguínea, entre outros (GALANAKIS, 2017). Para fins conceituais, enquanto a fração bioacessível é aquela disponível para absorção, a fração biodisponível é aquela efetivamente utilizada nas funções fisiológicas do organismo (OOMEN et al., 2002).

Diferentes metodologias podem ser empregadas para determinação da bioacessibilidade, dividindo-se em método *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in vivo* apresentam vantagens como representar a bioacessibilidade real do organismo. Entretanto, apresentam desvantagens, como baixo rendimento, custo elevado, danos aos animais e burocracias éticas (FERNDÁNDEZ-GÁRCIA et al. 2009 e TOKALIOĞLU et al., 2014).

Os métodos *in vitro* consistem basicamente na simulação de condições (composição química, temperatura, agitação, etc...) e da sequência fisiológica durante o trato gastrointestinal humano, simulando etapas do sistema digestivo: boca, estômago e intestino (OOMEN et al. 2022). A etapa de simulação na boca pode ser opcional, uma vez que há evidências de que a bioacessibilidade de compostos é pouco dependente da saliva (WRAGG e CAVE, 2002). Diversos métodos para o estudo e determinação da bioacessibilidade de elementos químicos têm sido empregados, dentre os mais conhecidos o método do Grupo de Pesquisa em Bioacessibilidade da Europa (UBM BARGE, do inglês *Bioaccessibility Research Group of Europe*) e o método COST INFOGEST (Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia).

A iniciativa UBM BARGE representa uma rede europeia que reúne institutos internacionais e grupos de investigação para estudar a bioacessibilidade humana de contaminantes prioritários nos solos através do trato gastrointestinal. Em 2009, o UBM BARGE realizou um teste interlaboratorial para o desenvolvimento de um método unificado, padrão e validado para estudo da bioacessibilidade em As, Cd e Pb provenientes de solo. O método UBM (do inglês *unified bioaccessibility method*) do UBM BARGE consiste em um processo de três etapas: boca, estômago e intestino, simulando a composição química da saliva, fluídos gastrointestinais, temperatura corporal e agitação natural (BROADWAY et al., 2010).

O método UBM BARGE foi aplicado por TOKALIOĞLU et al. (2014) para determinação da bioacessibilidade de Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se e Zn em suplementos alimentares multivitamínicos/minerais. Os autores fizeram a determinação da bioacessibilidade dos elementos após digestão na fase gástrica (simulando o efeito da saliva e do estômago) e na fase gastrointestinal (simulando o efeito do estômago e do intestino). A bioacessibilidade dos elementos na fase gástrica variou de 13 a 89%, 9 a 79%, 55 a 99%, 33 a 95%, 83 a 94%, 42 a 101%, 74 a 125% e 81 a 104% para Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se e Zn, respectivamente. Já na fase gastrointestinal, houve uma variação da bioacessibilidade dos elementos de 6 a 65%, 27 a 66%, 3 a 14%, 34 a 91%, 53 a 62%, 40 a 109%, 53 a 146% e 3 a 35% para Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se e Zn, respectivamente. De uma forma geral, os resultados apontam uma maior bioacessibilidade dos elementos na fase gástrica.

Uma possível explicação a isso é que, nessa fase, ocorre um aumento da solubilidade dos metais, devido ao menor pH e à presença de agentes quelantes, como a pepsina. Além disso, alguns elementos, como Cr, Fe e Zn, podem formar compostos insolúveis na forma de hidróxidos, fosfatos ou carbonatos na fase gastrointestinal, reduzindo suas bioacessibilidade. Os autores destacam também a grande influência da forma química dos elementos nos suplementos alimentares na sua bioacessibilidade (TOKALIOĞLU et al. 2014)

A bioacessibilidade do Fe na forma química de fumarato, sulfato ou gluconato chegou a 99% na fase gástrica, enquanto que para Fe na forma de óxido ficou em 55%. Outro exemplo é o Cu, onde foi constatada maior bioacessibilidade do elemento, na fase gástrica, na forma de gluconato (79%) em relação à bioacessibilidade do Cu na forma de sulfato, ficando em apenas 9%.

A COST INFOGEST é uma rede internacional que apresenta objetivos específicos, entre eles: comparar os modelos de digestão existentes, harmonizar as metodologias, validá-las com dados *in vivo*, propor diretrizes para realização de novos experimentos, identificar os componentes bioativos que são liberados no intestino durante a digestão dos alimentos, demonstrar efeitos desses compostos na saúde humana e determinar o efeito da estrutura da matriz na biodisponibilidade de nutrientes alimentares e moléculas bioativas. Esse método permite a harmonização das metodologias utilizadas para estudar a digestão e propôs diretrizes para a realização de novos experimentos. Um dos principais resultados foi o lançamento e publicação de um modelo de consenso de digestão *in vitro* que foi citado mais de 1.500 vezes desde 2014 e foi atualizado em um artigo divulgado pela *Nature Protocols* (BRODKORB et al., 2019), conhecida como ação COST INFOGEST.

O método COST INFOGEST foi aplicado por DO NASCIMENTO DA (SILVA et al., 2018) para determinação da bioacessibilidade de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em fórmulas infantis, cereais instantâneos e nutrientes em purês infantis. Os autores fizeram a determinação da bioacessibilidade desses compostos em alimentos após a digestão na fase gástrica (simulando o efeito da saliva e do estômago) e na fase gastrointestinal (simulando o efeito do estômago e do intestino). Para todos os elementos, os valores de bioacessibilidade para fórmulas infantis foram superiores a 50%, chegando a 89% para Mn. É interessante destacar que a bioacessibilidade de Fe e Mn foi maior para um tipo de cereal instantâneo do que para demais cereais (61% e 42%, respectivamente) e, provavelmente, esse resultado se deve à presença de proteínas de leite em pó integral presentes em sua composição. Mesmo que o Mn tenha apresentado maior bioacessibilidade em alimentos salgados devido à presença de proteínas da carne, ovo e feijão, sua solubilidade ainda é maior em amostras vegetais em comparação com o Fe, pois os complexos Mn-fitato são mais solúveis que os complexos Fe-fitato (DO NASCIMENTO DA (SILVA et al., 2018), KHOUZAM et al., 2011). A bioacessibilidade para Cu apresentou valores intermediários, chegando a 52% nas amostras baseadas em frutas e grãos e apresentou valores menores nas amostras de purê salgado (24–30%). Para o Mg, a faixa de bioacessibilidade foi de 18 a 74%, 36 a 62% e 64 a 75% para cereais, purês e fórmulas, respectivamente. Por fim, o Zn apresentou maiores valores de bioacessibilidade para cada purê (de 46 a 100%), incluindo as amostras de purê contendo frutas, e menores valores de bioacessibilidade para os cereais instantâneos (de 10 a 38%). Embora os dados da

literatura também mostrem que a bioacessibilidade do Zn é muitas vezes menor em alimentos de origem vegetal (AMMERMAN et al., 1995, LONNERDAL, 2000), esses altos valores para os purês infantis contendo frutas podem ser resultado da boa homogeneidade das amostras, o que pode facilitar a digestão. No entanto, esses resultados estão de acordo com a literatura, pois alguns autores já relataram que a bioacessibilidade de Fe e Zn está inversamente correlacionada com a quantidade de fitatos presentes em alimentos de origem vegetal (DO NASCIMENTO DA SILVA et al., 2018, KHOUZAM et al., 2011), e que alimentos de origem animal ou leite e soro de leite podem aumentar a solubilidade desses elementos no trato gastrointestinal devido à presença de proteínas (AMMERMAN et al., 1995, LONNERDAL, 2000). Por outro lado, os resultados para o Cu mostram que sua bioacessibilidade é maior em alimentos à base de frutas e grãos, como arroz e trigo. Além disso, em contraste com Fe e Zn, os complexos Cu-fitato são mais solúveis no pH do trato gastrointestinal (DO NASCIMENTO DA SILVA, KHOUZAM et al., 2011, PEREIRA et al., 2016). É importante destacar que os purês infantis apresentaram valores de bioacessibilidade intermediários a altos. No entanto, a contribuição para o IDR é baixa devido à concentração total dos elementos neste tipo de amostra. Por outro lado, embora os valores de bioacessibilidade para cereais instantâneos sejam menores para quase todos os elementos estudados, a contribuição para o IDR é maior.

A importância da avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em amostras de suplementos alimentares está relacionada com as quantidades recomendadas de ingestão desses elementos em dietas, que devem suprir algumas necessidades do indivíduo (COZZOLINO, 2005). Na Tabela 2, estão resumidos alguns trabalhos publicados para determinação da bioacessibilidade de diversos elementos químicos em matrizes similares aos suplementos alimentares.

Tabela 2 - Aspectos principais de trabalhos publicados para determinação elementar e avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares ou similares empregando diferentes técnicas.

(continua)

Amostra	Analito	Técnica de determinação	Condição	Método de digestão <i>in vitro</i>	Referência
Cereais infantis	Al, Fe, Mn, Pb, Ti, Zn, Ba, Bi, Cd, Cr	MIP OES	Concentração total: 1 g amostra + 5 mL HNO ₃ (200 °C por 1 h) + 1 mL H ₂ O ₂ (150 °C por 1 h) + 3 mL HCl (90 °C por 1h). Digestão gástrica: 5 g amostra + 12 mL fluido salivar + 1 mL CaCl ₂ 7,5 mol L ⁻¹ (37 °C por 10 min em banho-maria) + 9,1 mL fluido gástrico + 700 µL CaCl ₂ 7,5 mol L ⁻¹ (ajustar pH para 3,0 com 1 mol L ⁻¹ HCl (37 °C por 2 h em banho-maria) + 20 min em banho de gelo + 15 min a 10.000 rpm.	Não especificado	SOUZA et al., 2019
Cereais	Cd, Pb, Fe, Cu, Zn	ET-AAS (Cd, Pb) DCP-AES (Cu, Fe, Zn)	Digestão gástrica: 100 g de amostra + 50 mL H ₂ O deionizada + 125 mL suco gástrico (37 °C por 2 h). Digestão intestinal: após a digestão gástrica ajustar o pH para 7,5 + 125 mL suco gástrico intestinal (37 °C por 2 h).	Não especificado	INTAWONGSE et al., 2006

MIP OES - espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas; ET AAS - espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica; DCP AES - espectrometria de emissão atômica com plasma de corrente contínua.

Tabela 2 - Aspectos principais de trabalhos publicados para determinação elementar e avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares ou similares empregando diferentes técnicas.

(continuação)

Amostra	Analito	Técnica de determinação	Condição	Método de digestão <i>in vitro</i>	Referência
Mel	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn	FAAS	Concentração total: 25 g amostra + 50 mL. HNO ₃ Digestão gástrica: 2,5 g amostra + 10 mL suco gástrico (37 °C por 2 h) + 30 gotas NaHCO ₃ 30 g L ⁻¹ + 10 mL solução intestinal + 0,07 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ em 0,02 mol L ⁻¹ de NaOH (37 °C por 2 h).	Não especificado	POHL et al., 2012
Alimentos	Fe, Zn, Cu, Mn, Mo	ICP MS	Digestão gastrointestinal: 0,3 g amostra + 5 mL de solução gástrica a 37 °C por 4 h + 5 mL solução intestinal (37 °C por 4 h) e após centrifugar 4000 rpm por 15 min.	Não especificado	KHAN et al., 2011
Purês Fórmulas infantis Cereais instantâneos	Cu, Fe, Mg, Mn, Zn	ICP OES	Digestão salivar: 5 g amostra + 4 mL saliva + 1 mL CaCl ₂ 7,5 mol L ⁻¹ agitação a 37 °C por 10 min. Digestão gástrica: 5 g amostra + 9,1 mL suco gástrico + 0,7 mL CaCl ₂ 2 mol L ⁻¹ Digestão intestinal: 5 g amostra + 18,5 mL suco intestinal + 1,35 mL CaCl ₂ (37 °C por 2 h), centrifugar 10600 rpm por 30 min + filtrar em filtro 11 µm.	COST INFOGEST	DO NASCIMENTO SILVIA et al., 2018

F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama; ICP MS - espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; ICP OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Tabela 2 - Aspectos principais de trabalhos publicados para determinação elementar e avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares ou similares empregando diferentes técnicas.

(continuação)

Amostra	Analito	Técnica de determinação	Condição	Método de digestão <i>in vitro</i>	Referência
Suplemento alimentar	Se	ICP MS	<p>Concentração total: 0,05 g amostra + 0,5 mL HNO₃ + 0,5 mL H₂O₂).</p> <p>Digestão gástrica: 0,05 g amostra + 10 mL suco gástrico artificial (37 °C por 2 h).</p> <p>Digestão gastrointestinal: foi adicionada solução NaHCO₃ para ajustar o pH para 6,8 + 10 mL de solução intestinal artificial (37 °C por 2 h). Centrifugar a 10200 rpm por 15 min e filtrar em filtro seringa de 0,45 µm.</p>	Não especificado	HU et al., 2018
Arroz Nozes grãos leguminosos	Fe, Zn, Ca, Mg	FAAS	<p>Secagem da amostra: 2 g amostra + moagem em moinho + peneirar + secar 105 °C.</p> <p>Digestão gastrointestinal: 2 g amostra + 20 mL H₂O + agitar 10 min (ajustar o pH para 2 com solução 1 mol L⁻¹ HCl + 0,5 mL de pepsina (agitar a 37 °C por 2 h e o pH foi corrigido se necessário com 6 mol L⁻¹ HCl. Após as 2 h o pH foi corrigido para 6,8-7,0 com 6% NaHCO₃ + solução de pancreatina (37 °C por 4 h). Centrifugar a 3800 rpm por 10 min</p>	Não especificado	SULIBURSKA et al., 2011

ICP MS - espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama.

Tabela 2 - Aspectos principais de trabalhos publicados para determinação elementar e avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares ou similares empregando diferentes técnicas.

(conclusão)

Amostra	Analito	Técnica de determinação	Condição	Método de digestão <i>in vitro</i>	Referência
Suplemento nutricional	Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, Zn	ICP OES ICP MS	Concentração total: 0,25 g amostra + 5 mL HNO ₃ (120 °C por 30 min e 140 °C por 2 h) Digestão gástrica: 0,30 g amostra + 4,5 mL fluido salivar + 6,75 mL fluido gástrico, agitar a 200 rpm a 37 °C por 1 h em banho-maria. Retirar uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi combinado com 9 mL de HNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ Digestão gastrointestinal: 13,5 mL fluido duodenal + 4,5 mL bile + 30 g amostra (200 rpm a 37°C por 1 h). Retirar uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e adicionar 9 mL de HNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹	UBM BARGE	TOKALIOGLU et al., 2014
Iogurte	Zn	FAAS	Digestão gastrointestinal: 2 g de iogurte + 2,5 mL de suco gástrico simulado a 37 °C e agitação de 150 rpm por 2 h + 2,5 mL de suco intestinal a 37 °C e 150 rpm por 2 h.	UBM BARGE	ANDRADE et al., 2019

ICP MS - espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; ICP OES - espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama.

2.4 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA

Para a determinação de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares, são necessárias ferramentas analíticas sensíveis e eficientes para gerar dados de confiança na identificação e quantificação. Dentre essas, as técnicas espectrométricas baseadas em plasma são comumente utilizadas, como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) (SMICHOWSKI e LONDONIO, 2018) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*) (PINHEIRO et al., 2019).

Geralmente, as técnicas analíticas utilizadas para determinação elementar requerem a introdução da amostra na forma líquida e, para isso, deve-se utilizar métodos de preparo de amostra que submetam a amostra à decomposição total ou parcial da matéria orgânica, com o objetivo de deixar o analito disponível para determinação. Os métodos de decomposição de amostra podem ser por via seca ou por via úmida (KRUG, 2010). Dentre esses, a decomposição por via úmida em sistemas abertos ou fechados é comumente utilizada para o preparo de amostras de suplementos alimentares, com aquecimento convencional ou por micro-ondas (KREJČOVÁ et al., 2006; ZACHARIADIS e OLYMPIOU, 2008; KRAWCZYK, 2014).

A decomposição por via úmida em sistemas abertos com aquecimento convencional é o método de preparo mais utilizado entre os laboratórios, devido ao seu custo relativamente baixo e pela possibilidade de utilizar elevada massa de amostra. Porém, devido ao fato de ser um sistema aberto, a temperatura do meio reacional é limitada pela temperatura de ebulição do reagente, o que pode prejudicar a eficiência de decomposição de amostras com matrizes mais complexas, além de conter maior risco de contaminação e perdas por volatilização (MESTER e STURGEON, 2003).

Uma forma de contornar essas desvantagens é utilizar sistemas fechados. O uso desses sistemas permite maiores pressões e, conseqüentemente, aumenta a temperatura de ebulição dos ácidos e sua capacidade de oxidação da matéria orgânica (KRUG e ROCHA, 2016).

Em virtude da complexidade de certas matrizes, associada à necessidade de temperatura e pressão elevadas para decomposição, o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD, do inglês *microwave-assisted wet digestion*) tem se mostrado eficiente em relação ao uso de sistemas convencionais. Esse método consiste na irradiação da amostra e da solução de decomposição pela ação das micro-ondas em sistema fechado, resultando em uma rápida transferência de energia para a solução e, conseqüentemente, maior taxa de aquecimento, quando comparado ao aquecimento convencional (FLORES, 2014).

Conforme relatado na literatura, a decomposição por via úmida é o método mais utilizado para decomposição de diversos suplementos alimentares (AVULA et al., 2011; PEREIRA et al., 2019), particularmente com o uso de aquecimento micro-ondas (MAWD). Para esse tipo de amostra, a eficiência de decomposição tem apresentado resultados satisfatórios, dependendo do tipo da amostra e os reagentes utilizados, reduzindo o risco de interferências e problemas relacionados à introdução de amostras por sistemas convencionais de nebulização.

Uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação elementar em suplementos alimentares é a ICP OES. Essa técnica apresenta baixos limites de detecção e pode ser usada para determinação de uma grande variedade de elementos. A técnica está baseada na emissão de radiação ultravioleta/visível por átomos ou íons gerados e excitados no plasma, gerado por um gás inerte (normalmente argônio), induzido por um campo eletromagnético e que pode chegar a temperaturas de até 10000 K (NOVAES et al., 2016).

A técnica de ICP OES é suscetível à interferências espectrais e não espectrais. As interferências espectrais são provenientes da sobreposição total ou parcial de linhas espectrais e presença de *background* contínuo, e podem ser facilmente resolvidas através da escolha apropriada da linha analítica. Já as interferências não espectrais estão relacionadas à composição (matriz) da amostra, como, por exemplo, variações na eficiência de nebulização e transporte do analito até o plasma, ocasionadas por mudanças na viscosidade e densidade da solução, principalmente pelo uso de ácido na etapa de preparo de amostra, e efeitos na atomização/excitação dos analitos no plasma, causados pela alta concentração de carbono ou elementos facilmente ionizáveis (EIEs, do inglês *Easily Ionized Elements*), como Na e K. (OLESIK e WILLIAMSEN, 1989; ROMERO; POUSSSEL; MERMET, 1997a, 1997b; TODOLÍ et al.; 2002). Por esse motivo é de extrema importância conhecer a amostra a ser

determinada para que interferências como essas possam ser corrigidas e minimizadas. Especialmente no caso de protocolos de bioacessibilidade, este é um problema crítico já que as soluções contém altos teores de Ca, K e/ou Na, principalmente.

No mesmo contexto, a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), possui como característica a determinação multielementar (JIN, Q et al., 1998). Nessa técnica, a radiação micro-ondas (normalmente com frequência de 2,45 GHz) é responsável pela indução do plasma, diferentemente da ICP OES, que utiliza da radiação na faixa de radiofrequência. Diferentes gases podem ser usados na composição dos plasmas induzidos por micro-ondas (MIPs) ou até mesmo, misturas, como por exemplo, Ar, He, N₂, ar atmosférico, O₂, Ar/He e N₂/O₂, com aplicações demonstradas em trabalhos da literatura (JANKOWSKI et al., 2011), mas em poucas delas para avaliação da bioacessibilidade.

Em 2012, um equipamento de MIP OES passou a ser disponível comercialmente. Nessa versão, a potência aplicada é fixa em 1 kW e o plasma é sustentado por N₂, que é um gás com elevada condutividade térmica, com energia de ionização de aproximadamente 14,5 eV que pode ser facilmente separado do ar atmosférico a partir do uso de um “gerador de N₂” conectado ao equipamento. No gerador, o N₂ presente no ar atmosférico é separado dos demais componentes e utilizado na manutenção do plasma, reduzindo os custos operacionais ocasionados pela compra e recarga de gases (GONÇALVES et al., 2016).

Nesse equipamento, a visão é axial e o posicionamento do plasma é vertical, o que confere a ele maior robustez. Após os processos de nebulização, dessolvatação, vaporização, atomização/ionização e excitação no plasma de N₂, a radiação emitida é direcionada por um conjunto de espelhos até o monocromador sequencial Czerny-Turner e uma rede de difração separa os comprimentos de onda de interesse e esses são detectados por um dispositivo de carga acoplada (CCD), como detector (GONÇALVES et al., 2016).

O MIP com plasma de N₂ apresenta vantagens, como baixo custo operacional, capacidade de determinação multielementar, fácil operação e implementação em laboratórios de rotina, possibilidade de acoplamentos e atinge temperaturas superiores às observadas no uso de chamas de óxido nitroso em F AAS. No entanto, o plasma de N₂ opera a uma temperatura menor (aproximadamente 5000 K) em relação à temperatura do plasma de Ar comumente usada em ICP OES

(aproximadamente 7500 K), permitindo que os processos de excitação e o equilíbrio do plasma sejam afetados pelos produtos de prováveis reações e recombinações que podem ocorrer nesse plasma menos energético, prejudicando a exatidão e a precisão dos resultados (GONÇALVES et al., 2016).

A técnica de MIP OES foi utilizada por SOUZA et.al. (2019) para avaliação da bioacessibilidade de Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Ti e Zn em cereais. A bioacessibilidade variou de acordo com o tipo de amostra de cereal infantil. Os valores da fração bioacessível (mínimo e máximo) para Cu, Fe, Mn, Pb e Zn foram 24 a 68, 1 a 10, 7 a 58, 24 a 100 e 1 a 7% da concentração total, respectivamente. Elementos como Al e Ti apresentaram percentuais de bioacessibilidade baixos em poucas amostras: 6% no multicereal A e 14% no cereal de arroz e aveia B. A concentração de Ba, Bi, Cd e Cr ficou abaixo do limite de detecção pelo método de bioacessibilidade. As concentrações obtidas foram inferiores à ingestão diária recomendada para elementos essenciais e tóxicos, com exceção de Pb em arroz e aveia. O método desenvolvido apresentou LODs abaixo dos limites permitidos para o controle desses analitos. As diferenças observadas entre as porcentagens de frações bioacessíveis dos analitos investigados estão relacionadas ao tipo de cereal utilizado na sua fabricação (aveia, milho, arroz, entre outros). Essa variação refletiu diretamente no estudo de bioacessibilidade de Al, Cu, Fe, Mn, Pb, Ti e Zn, com diferenças na concentração liberada no trato gastrointestinal. Além disso, foi possível observar que houve uma variação na bioacessibilidade entre os elementos investigados de acordo com o tipo de matriz e matéria-prima utilizada. Pelos resultados foi possível observar que a concentração dos elementos está abaixo dos valores de ingestão diária recomendados para analitos essenciais. Em relação aos elementos potencialmente tóxicos, as concentrações bioacessíveis estavam abaixo do valor máximo permitido, garantindo assim uma segurança aos consumidores destes alimentos.

A avaliação da concentração total de Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Pb e Zn e da fração bioacessível de Ba, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em amostras de cascas de uva de diferentes cultivares (*Vitis Viníferas* Tannat e Cabernet Sauvignon) por MIP OES foi feita por (JACOBS et al. 2021). Para a determinação da concentração total, foi utilizada a decomposição ácida com sistema de refluxo adaptado a tubos de digestão em meio oxidante de HNO₃ e H₂O₂. A exatidão do método foi verificada por meio de testes de recuperação, cujos valores variaram de 80 a 120%, bem como por

meio de comparação usando sistema fechado para decomposição. A concentração total de Bi, Cd e Cr ficou abaixo do LD. Para avaliar a fração bioacessível, o sistema gastrointestinal foi simulado por procedimento *in vitro*, e seu desempenho foi avaliado considerando a fração bioacessível (sobrenadante) e a fração não bioacessível, cuja soma deve ser próxima à concentração total, e os resultados obtidos ficaram entre 81 e 120%. Ambas as cultivares apresentaram valores semelhantes para as frações bioacessíveis (entre 13,5 e 53% do conteúdo total).

Apesar do uso recente dessa técnica, algumas condições contribuem para o menor número de métodos utilizando a MIP OES, dentre eles, os efeitos causados pela matriz da amostra, que são mais perceptíveis quando comparados a ICP OES (MÜLLER et al., 2020a). Os efeitos causados por EIEs são amplamente conhecidos. ZHANG e WAGATSUMA (2002) avaliaram as interferências causadas por Na e Ca em diversos elementos por MIP OES. Os autores concluíram que a presença desses elementos com concentrações na faixa de 500 a 5000 mg L⁻¹ ocasiona uma redução na temperatura de excitação do plasma e um aumento da densidade eletrônica, gerando alteração no equilíbrio de ionização e, conseqüentemente, alguns elementos com linhas atômicas com menores energias de excitação sofrem uma intensificação no sinal de emissão, enquanto que as linha iônicas sofrem uma supressão do sinal.

SERRANO et al., (2019) avaliaram as interferências causadas por C em diversos elementos utilizando MIP OES e compararam os resultados obtidos com ICP OES. Os autores concluíram que a MIP OES possui maior tolerância quando comparada à ICP OES, uma vez que não ocorreu diferença na intensidade do sinal dos elementos analisados na presença de C, enquanto que para a técnica de ICP OES, alguns elementos, como As e Se, sofreram intensificação no sinal. Segundo os autores, a menor temperatura do plasma em MIP OES afeta o grau de ionização do C, e, conseqüentemente, produz menos processos de transferência de carga.

Diante desse cenário, além da avaliação dos protocolos de bioacessibilidade, neste trabalho, foram avaliadas as interferências provocadas pelos reagentes utilizados nos protocolos nas determinações por OES, buscando fornecer informações para a escolha desta como técnica de medida em trabalhos avaliando a bioacessibilidade elementar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa seção são descritos os equipamentos, reagentes e as amostras utilizadas, bem como os métodos utilizados para avaliação da bioacessibilidade em suplementos alimentares e para determinação da concentração total. Serão detalhados nesse capítulo os métodos de preparo de amostras para posterior determinação do teor total e bioacessível e posterior determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES e/ou MIP OES, assim como serão descritos os procedimentos experimentais para todas as avaliações feitas.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação elementar em suplementos alimentares foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, modelo Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha) equipado com uma câmara de nebulização de duplo passo (tipo Scott, Spectro Analytical Instruments) e uma tocha com tubo injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro (SPECTRO EOP Quartz Torch, Glass Expansion, Austrália), mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Equipamento de ICP OES utilizado nesse trabalho.



Para geração do plasma foi utilizado Ar com pureza de 99,996% (White Martins, Brasil). As condições operacionais do equipamento estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições operacionais para as determinações por ICP OES.

Parâmetro	ICP OES
Potência de radiofrequência, W	1400
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15,0
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,2
Vazão do gás nebulizador, L min ⁻¹	0,7
Câmara de nebulização, tipo	Ciclônica de duplo passo (Tipo Scott)
Nebulizador, tipo	GemCone®
Analito,	Linha de emissão, nm
Ag	328,068
Al	167,078
Ba	455,404
Be	234,861
Cd	228,802
Co	238,892
Cr	205,552
Cu	324,754
Fe	259,941
La	408,672
Mg	285,213
Mn	257,611
Mo	202,095
Ni	231,604
Pb	220,553
Sr	421,552
V	292,464
Zn	213,856

Também para determinação elementar e para avaliação de interferências provocadas pelos reagentes dos protocolos de bioacessibilidade, foi utilizado um espectrômetro de MIP OES (modelo 4210 MP-AES, Agilent, EUA), conforme método proposto por BITENCOURT (2021). Esse instrumento, de análise sequencial, possui um monocromador do tipo Czerny-Turner, com distância focal de 600 mm e grade de difração com 2400 ranhuras mm⁻¹, apresentando uma resolução e faixa espectral de 0,050 nm a 780 nm, respectivamente. O espectrômetro é equipado com um detector do tipo CCD (532 X 128 pixels) e está mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Equipamento de MIP OES utilizado nesse trabalho.



O gás N_2 utilizado para a sustentação do plasma é obtido a partir de um gerador de nitrogênio (modelo 4107, Agilent, EUA), com pureza mínima de 99,5%, vazão de 25 L min^{-1} e pressão de 65 psi, alimentado por um compressor de ar atmosférico isento de óleo (modelo CSV 20/250, Schulz, Brasil). A ignição do plasma é realizada utilizando Ar com pureza de 99,0%, contido em um compartimento próprio, de 60 L, suprimido pelo fabricante do equipamento. O equipamento também é equipado com um amostrador automático (modelo SPS 4, Agilent, EUA). As condições operacionais do equipamento estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições operacionais para determinações por MIP OES.

Parâmetro	Condição
Frequência de micro-ondas, MHz	2450
Potência de micro-ondas, W*	1000
Correção de background	Automática
Vista de observação do plasma	Axial
Nebulizador, tipo	OneNeb®
Câmara de nebulização, tipo	Ciclônica de duplo-passo/MSIS
Vazão do gás do plasma, L min ⁻¹	20
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1,5
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	0,3 a 1,0
Posição de observação do plasma	-120 a 120
Tempo de leitura, s	3
Replicatas	3
Tempo de aspiração da amostra, s	25
Tempo de estabilização, s	15
Rotação da bomba peristáltica, rpm	15
Analito (linha de emissão, nm)	Ag(I) (328,068), Al(I) (394,401), As(I) (193,695), B(I) (249,677), Ba(II) (493,408), Be(I) (234,861) Ca(II) (396,847), Cd(I) (228,802), Co(I) (340,512), Cr(I) (357,868), Cu(I) (324,754), Fe(II) (259,940), Hg(II) (253,652), K(I) (766,491), La(II) (433,374), Li(I) (670,784), Mg(II) (280,271), Mn(I) (403,307), Mo(I) (386,410), Na(I)(589,592), Ni(I) (341,476), Pb(I) (363,957), Sr(II) (407,771), V(I) (437,923) Zn(I) (213,857)

(I) Linha de emissão atômica

(II) Linha de emissão iônica

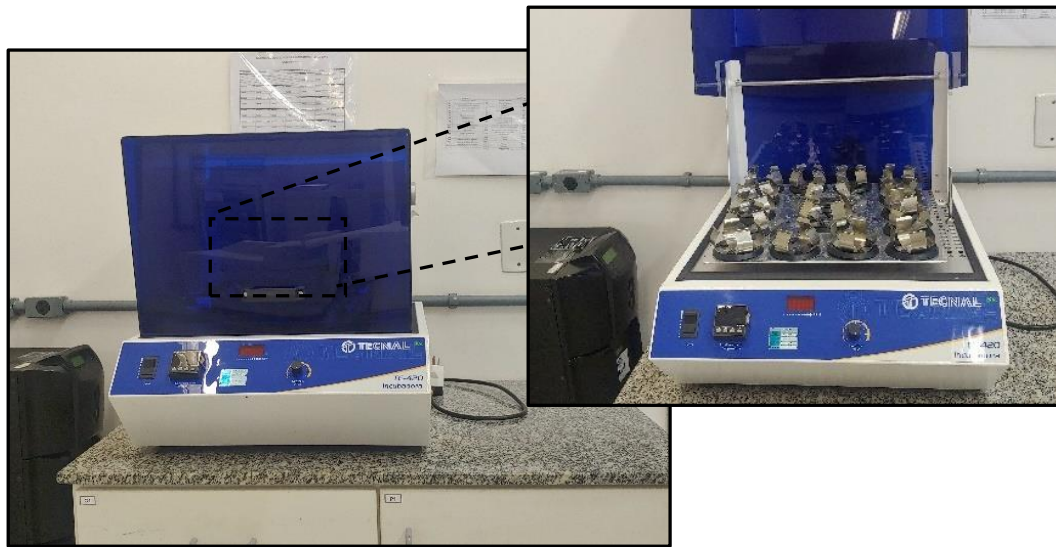
O preparo das amostras de suplementos alimentares para posterior determinação da concentração total foi baseado no trabalho de BITENCOURT (2021). Foi utilizada a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (Ethos Easy, Milestone, Itália). O instrumento é equipado com um rotor com capacidade para 44 frascos de Teflon com capacidade individual de 100 mL. O equipamento e micro-ondas está mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Equipamento de micro-ondas utilizado nesse trabalho.



Para as extrações feitas pelo método UBM BARGE e COST INFOGEST para posterior determinação da bioacessibilidade dos elementos, foi utilizada uma incubadora (modelo TE-420, Tecnal Equipamentos Científicos) com capacidade para 14 béqueres de 150 mL com controlador de temperatura analógico e sistema de agitação controlada. Para todos os experimentos, a temperatura da incubadora foi mantida em $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 200 rpm, mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Incubadora utilizada nesse trabalho.



Para a decomposição do resíduo dos extratos provenientes dos protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST (fração não bioacessível) foi feita a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, utilizando um forno de micro-ondas (Multiwave PRO®, Anton Paar, Áustria), equipado com um rotor com capacidade para 8 frascos de quartzo de 80 mL. O sistema de micro-ondas pode operar com condições máximas de temperatura, pressão e potência de micro-ondas de 280 °C, 80 bar e 1500 W, respectivamente.

Todos os procedimentos de pesagem foram realizados utilizando uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Japão), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g ou uma microbalança (modelo M2P, Sartorius, Alemanha), com resolução de 0,001 mg e uma carga máxima de 2 g. Uma centrífuga (modelo 3K30, Sigma, EUA) foi utilizada em todos os procedimentos.

3.2 AMOSTRAS

Nesse trabalho, foram utilizadas quatro amostras de suplementos alimentares de diferentes tipos e composições, conforme apresentado na Tabela 5. As amostras foram adquiridas no mercado local ou por comércio eletrônico, são oriundas do Brasil e dos Estados Unidos e foram codificadas de acordo com o seu tipo.

Tabela 5 - Informações sobre as amostras utilizadas no trabalho.

Código	Classificação	Informações do Rotulo	Forma	Origem
VM-1	Vitamínico e Mineral	Vitaminas A (940 µg), B1 (1 mg), B2 (1 mg), B3 (10 mg), B5 (2,5 mg), B6 (1 mg), B7 (15 µg), B9 (200 µg), B12 (1 µg), C (45 mg), D3 (2,5 µg) e K (60 µg). Óxido de magnésio (68 mg), zinco (7 mg), manganês (1 mg), cobre (400 µg), selênio (34 µg), molibdênio (20 µg), cromo (10 µg), talco, dióxido de silício, estabilizantes e corantes.	Comprimido	Brasil
VM-3	Vitamínico e Mineral	Vitaminas A (750 mcg), B1 (1,5 mg), B2 (1,7 mg), B5 (20 mg), B6 (2 mg), B7 (600 mcg), B9 (10 mg), B12 (6 mcg), C (180 mcg), D3 (25 mcg), E (22,5 mg) e K (80 mcg). Carbonato de cálcio (250 mg), fumarato ferroso (18 mg), iodeto de potássio (150 mcg), óxido de magnésio (100 mg), óxido de zinco (15 mg), selenato de sódio (70 mcg), sulfato de cobre (2 mg), sulfato de magnésio (4 mg), cloreto de cromo (120 mcg), molibdato de sódio (75 mcg), celulose, amido modificado, maltodextrina, croscarmelose de sódio, hipromelose, estearato de magnésio, dióxido de silício, gelatina e polietileno glicol.	Comprimido	EUA
BT-2	Botânico	Aromatizantes de guaraná (<i>paullinia cupana</i>) e açaí (<i>euterpe oleracea</i>). Extratos naturais de catuaba (<i>anemopaegma mirandum</i>), cacau (<i>theobromacacao</i>), vitaminas A (600 mcg), B1 (1,2 mg), B2 (1,3 mg), B3 (16mg), B5 (5 mg), B6 (1,3 mg), B9 (240 mcg), B12 (2 mcg), C (45 mg), E (10 mg), K2 (65 mcg) e minerais (Cu (900 mcg), Fe (14 mg), Cr (35 mcg), Mn (2,3 mg), Mo (45 mcg), Se (34 mcg) e Zn (7 mg).	Cápsula	Brasil
MN-2	Mineral	Cálcio aminoácido quelato (1,000 mg), fosfato de potássio (22 mg), iodeto de potássio (225 mcg), magnésio aminoácido quelato (500 mg), zinco aminoácido quelato (15 mg), L-selenometionina (50 mcg), cobre aminoácido quelato (0,5 mg), manganês aminoácido quelato (5 mg), picolinato de cromo, molibdênio (50 mcg), fosfato de potássio (59 mg), ácido bórico (1mg), vanádio aminoácido quelato (25 mcg), ácido glutâmico (50 mg), proteína de arroz, ácido cítrico, celulose, estearato de magnésio, folhas de salsa e alfafa, rabo de cavalo, agrião, raiz de dente de leão e doca amarela, camomila e barrilha.	Cápsula	EUA

Todas as amostras foram secas em estufa por 4 h a 60 °C. As amostras que se apresentam na forma de comprimido foram cominuídas utilizando gral e pistilo, enquanto somente o conteúdo interno das amostras em forma de cápsulas foi utilizado. A amostra VM-1 foi peneirada utilizando malhas de tecido de 35 fios (porosidade menor que 200 µm), devido ao revestimento presente no comprimido.

3.3 REAGENTES

A água utilizada nos procedimentos realizados no trabalho foi destilada, deionizada em coluna de troca iônica e purificada (Milli Q[®] Ultra Pure Water Purification system, Gradient System, Merck MilliporeCorp, EUA), com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm. Para as extrações foram utilizados os seguintes reagentes: ácido nítrico P.A 65% (Merck, Alemanha) e ácido clorídrico P.A 37% (Merck, Alemanha), previamente destilados em um sistema de sub-ebulição (modelo duo PUR[®]2.01E, Milestone, Itália), cloreto de potássio (Merck, Alemanha), fosfato de sódio (Labsynth, Brasil), tiocianato de potássio (Merck, Alemanha), sulfato de sódio (Sigma Aldrich, EUA), cloreto de sódio (Vetec, Brasil), hidróxido de sódio (Vetec, Brasil), cloreto de cálcio (CRQ, Brasil), cloreto de amônio (Merck, Alemanha), bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha), fosfato monopotássico (Labsynth, Brasil), cloreto de magnésio (Labsynth, Brasil), uréia (Labsynth, Brasil), alfa-amilase (A9857, Sigma Aldrich, EUA), mucina (Sigma Aldrich, EUA), glucose (Proquímica, Brasil), ácido glucorônico (Sigma Aldrich, EUA), glucosamina (Sigma Aldrich, EUA), ácido úrico (Merck, Alemanha), soro bovino (Sigma Aldrich, EUA), pepsina (Sigma Aldrich, EUA), pancreatina (Sigma Aldrich, EUA), lipase (Sigma Aldrich, EUA) e bile (Sigma Aldrich, EUA).

As curvas de calibração utilizadas para determinação elementar por ICP OES foram preparadas em duas faixas (1 a 100 µg L⁻¹ e 0,25 a 10 mg L⁻¹ em HNO₃ 5% v/v), a partir de duas soluções padrões estoque, uma contendo 10 mg L⁻¹ dos analitos (SCP33MS, SCP Science, Canadá) e outra contendo 1000 mg L⁻¹ (Merck, Alemanha).

Na Tabela 6 são apresentados os constituintes da saliva, fluído gástrico, fluído duodenal e bile para o procedimento UBM BARGE (WRAGG et al., 2002).

Tabela 6 - Constituintes da saliva, fluído gástrico, fluído duodenal e bile para o método UBM BARGE

Componentes (volume)	Reagentes	Fase gástrica (mg)		Fase Intestinal (mg)	
		Saliva	Fluído gástrico	Fluído duodenal	Bile
Solução inorgânica (500 mL)	KCl	896	824	564	376
	NaH ₂ PO ₄	888	266	-	-
	KSCN	200	-	-	-
	Na ₂ SO ₄	570	-	-	-
	NaCl	298	2752	7012	5259
	CaCl ₂	-	400	-	-
	NH ₄ Cl	-	306	-	-
	NaHCO ₃	-	-	5607	5785
	KH ₂ PO ₄	-	-	80	-
	MgCl ₂	-	-	50	-
	NaOH (1 mol L ⁻¹)	1,8 mL	-	-	-
Solução orgânica (500 mL)	HCl (12 mol L ⁻¹)	-	8,3 mL	180 µL	180 µL
	Uréia	200	85	100	250
	Glucose	-	650	-	-
	ác. Glucurônico	-	20	-	-
	Glucosamina	-	330	-	-
	α-amilase	145	-	-	-
	Mucina	50	3000	-	-
	ácido úrico	15	-	-	-
	soro bovino	-	1000	1000	1800
	Pepsina	-	1000	-	-
	Solução adicional (1000 mL)	CaCl ₂	-	-	200
Pancreatina		-	-	3000	-
Lipase		-	-	500	-
Bile		-	-	-	6000

Fonte: WRAGG e CAVE, 2002.

Na Tabela 7 são apresentados os constituintes da saliva, fluido gástrico, fluido intestinal e bile para o procedimento COST INFOGEST (MINEKUS et al., 2014).

Tabela 7 - Constituintes da saliva, fluido gástrico, fluido duodenal e bile do método COST INFOGEST.

Saliva		Fluido gástrico		Fluido duodenal + bile	
Reagente	(g L ⁻¹)*	Reagente	(g L ⁻¹)*	Reagente	(g L ⁻¹)*
KCl	1,13	KCl	0,51	KCl	0,507
KH ₂ PO ₄	0,5	KH ₂ PO ₄	0,12	KH ₂ PO ₄	0,109
NaHCO ₃	1,14	NaHCO ₃	2,1	NaHCO ₃	7,14
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,03	NaCl	2,76	NaCl	2,25
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,058	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,024	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,067
HCl	1,1 mol L ⁻¹	(NH ₄) ₂ CO ₃	0,048	HCl	8,4 mol L ⁻¹
Amilase**	37,5 U mL ⁻¹	HCl	15,6	Pancreatina**	216 U mL ⁻¹
		Pepsina	4396 U/mL	Bile	27

Fonte: MINEKUS et al., 2014

*exceto quando especificada unidade de concentração distinta

**concentração conforme especificidade

3.4 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA NA INCUBADORA PARA ENSAIOS DE BIOACCESSIBILIDADE

Segundo os protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST, a temperatura para execução dos procedimentos deve estar em torno de 37 ± 2 °C. Sabendo disso, foi feita uma avaliação da temperatura e do tempo de estabilização em diferentes locais da incubadora utilizada nesse trabalho.

Inicialmente, para avaliar a exatidão do controlador analógico de temperatura da incubadora, o mesmo foi configurado para alcançar a temperatura de 37 °C. Após estabilização (segundo o controlador), a temperatura real da incubadora foi avaliada colocando um béquer com água dentro da cavidade e sua temperatura foi monitorada por 20 min. A segunda avaliação realizada foi referente ao mapeamento das posições para aquecimento das soluções dentro da incubadora. Foram avaliadas 16 diferentes posições, monitorando a água em cada ponto ao longo de 15 min.

3.5 PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM SUPLEMENTO ALIMENTAR

O método de preparo de amostra para a determinação da concentração total dos elementos essenciais e não essenciais nos suplementos alimentares foi baseado no trabalho de BITENCOURT (2021), utilizando a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas. As amostras foram submetidas a uma etapa de moagem, utilizando gral e pistilo e foram armazenadas em tubo tipo falcon de 50 mL devidamente identificados.

A avaliação de interferências (item 4.2) foi feita utilizando o equipamento de MIP OES. Devido à necessidade de manutenção no equipamento durante o período de execução dos experimentos os demais resultados foram obtidos por ICP OES.

3.6 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES.

Para determinação da bioacessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares dois procedimentos *in vitro* foram avaliados: o método UBM BARGE e o método COST INFOGEST. Os resultados foram avaliados em percentuais de bioacessibilidade, conforme mostrado na Equação 1.

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{\text{Concentração bioacessível} \times 100}{\text{Concentração total}} \quad (\text{Equação 1})$$

Fonte: WRAGG e CAVE, 2002.

3.6.1 Procedimento UBM BARGE para avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares

O método UBM BARGE consiste em duas etapas, produzindo dois extratos: o digerido retirado na primeira fase (fase gástrica) consiste em uma solução de extração retirada do sistema após simulação com saliva seguido por fluido gástrico. Já o digerido retirado na segunda fase (fase gastrointestinal) consiste em uma solução de extração removida após simulação de compartimentos da boca, estômago e intestino (saliva + fluido gástrico + fluido duodenal + bile). Os parâmetros são controlados, mimetizando as condições fisiológicas que ocorrem no corpo humano.

Nesse método, cerca de 0,3 g de amostra foram adicionados em tubos de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de saliva, seguido de agitação manual por 1 minuto. Posteriormente, 6,75 mL de fluido gástrico foram adicionados a cada alíquota de amostra, e os tubos foram levados para aquecimento em banho-maria, em a uma temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ a uma velocidade de agitação de aproximadamente 200 rpm, por 1 h. Após essa etapa, mediu-se o pH, o qual deveria estar entre 1,2 a 1,7 caso o mesmo não estivesse nessa faixa, era necessário fazer o ajuste do mesmo. Após os extratos foram submetidos a centrifugação à 3000 rpm por 5 min. Finalizando essa etapa, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e combinada com 9 mL de HNO_3 0,1 mol L^{-1} , sendo essa solução denominada extrato gástrico, para posterior determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES.

Utilizando a mesma porção em que a fase gástrica foi realizada, os extratos foram submetidos à fase gastrointestinal. Para isso, 13,5 mL de fluido duodenal e 4,5 mL de bile foram adicionados na solução gástrica. Os tubos foram agitados manualmente por 1 min, e colocados em banho-maria sob agitação a uma temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e uma velocidade de aproximadamente 200 rpm, por 1 h. Após essa etapa, mediu-se o pH, onde se esperava que o mesmo estivesse na faixa de $(6,3 \pm 0,5)$. Após, os extratos foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm por 5 min. Então, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e combinada com 9 mL de HNO_3 0,1 mol L^{-1} , sendo essa solução denominada extrato gastrointestinal, para posterior determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES.

3.6.2 Procedimento COST INFOGEST para a avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares

Diferentemente do método UBM BARGE, o método COST INFOGEST consiste na digestão *in vitro* em uma etapa única de digestão, englobando a saliva, fluido gástrico, fluido duodenal e bile, sendo o tempo total de digestão de 4 h e 10 min, a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Para isso, inicialmente, 5 g de amostra foram pesado em tubos de 50 mL e posteriormente foram adicionados 4 mL de saliva e 1 mL de CaCl_2 7,5 mmol L⁻¹. Os frascos foram levados para aquecimento em banho-maria sob agitação durante 10 min.

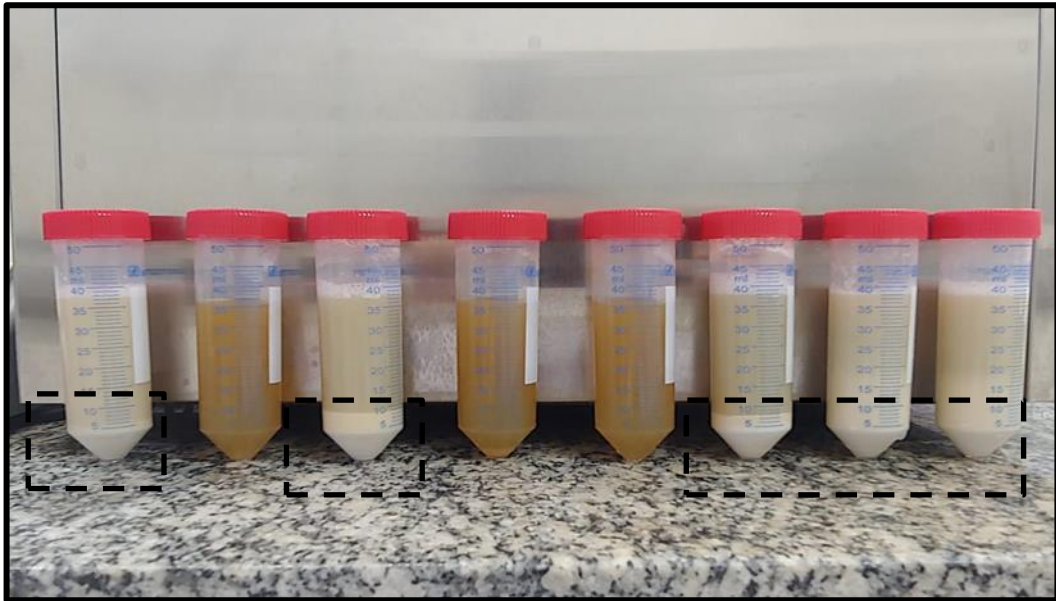
Após a primeira incubação, as amostras foram submetidas à segunda etapa que consiste na digestão gástrica, onde 9,1 mL de fluido gástrico e 0,7 mL CaCl_2 2 mmol L⁻¹ foram adicionados aos frascos e levados para aquecimento em banho-maria, sob agitação, durante 2 h. A última etapa consiste na digestão intestinal onde 18,5 mL de fluido duodenal e 1,35 mL de CaCl_2 9 mmol L⁻¹ foram adicionados aos frascos e levados para aquecimento, em banho-maria 37 °C, durante 2 h, com uma velocidade de agitação de 200 rpm. Após a última etapa de incubação, os extratos foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm por 30 min e filtrados para posterior determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES.

3.6.3 Avaliação do resíduo proveniente dos métodos de UBM BARGE e COST INFOGEST para avaliação da fração remanescente

O resíduo proveniente das extrações, mostrado na Figura 5 conforme método UBM BARGE e COST INFOGEST foi decomposto para se determinar a concentração elementar presente na porção remanescente após a digestão *in vitro* (fração não-bioacessível). A decomposição foi realizada utilizando 300 mg e 5 g do resíduo, respectivamente, para o método UBM BARGE e COST INFOGEST, e 6 mL HNO_3 concentrado.

Os frascos foram posicionados no rotor e submetidos ao seguinte programa de aquecimento: *i*) rampa de aquecimento de 10 min até uma potência máxima de 1000 W, *ii*) permanência de 15 min na potência de 1000 W e *iii*) resfriamento até atingir a temperatura de 50 °C. Após o programa de aquecimento, os digeridos foram avolumados a 25 mL com água purificada para posterior determinação por ICP OES.

Figura 5 - Resíduo proveniente do método COST INFOGEST



3.6.4 Avaliação da influência do aquecimento em meio aquoso (sem os reagentes dos protocolos) na extração de elementos de suplementos alimentares

Tendo em vista o uso de HCl em ambos os protocolos de avaliação de bioacessibilidade e a sua capacidade complexante (KRUG et al., 2016), foi avaliada a extração dos elementos essenciais e não essenciais nos suplementos alimentares utilizando somente HCl 1 mol L⁻¹, sem uso dos demais reagentes empregados. Para essa avaliação, as condições de massa de amostra, temperatura e tempo foram mantidas conforme os protocolos originais.

3.7 AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS

Em virtude da composição dos suplementos alimentares e dos digeridos obtidos nos protocolos de bioacessibilidade, foram avaliadas as interferências provenientes da matriz nas determinações por MIP OES. Para isso, foi feita a adição de 100 µg L⁻¹ de todos os analitos em diversas diluições (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 vezes e concentrado) do extrato da amostra BT-2 após o método COST INFOGEST, em HNO₃ 5%.

Para avaliação das concordâncias obtidas durante a avaliação das interferências foi utilizada a incerteza da repetitividade nas medidas por MIP OES (MULLER et al., 2015). Para isso, procedeu-se uma medida de 10 leituras de um branco proveniente do protocolo COST INFOGEST contendo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de todos os analitos, obtendo uma média de desvio-padrão relativo (RSD) de 9%. A seguir, a incerteza expandida foi estimada multiplicando a média dos valores do RSD por um fator de abrangência ($k=2,2$), obtendo-se uma incerteza expandida de 19%. Assim, para avaliação das interferências, a faixa de aceitação para a concordância dos analitos foi de 81 a 119%.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE C e Cl NOS EXTRATOS DE BIOACESSIBILIDADE

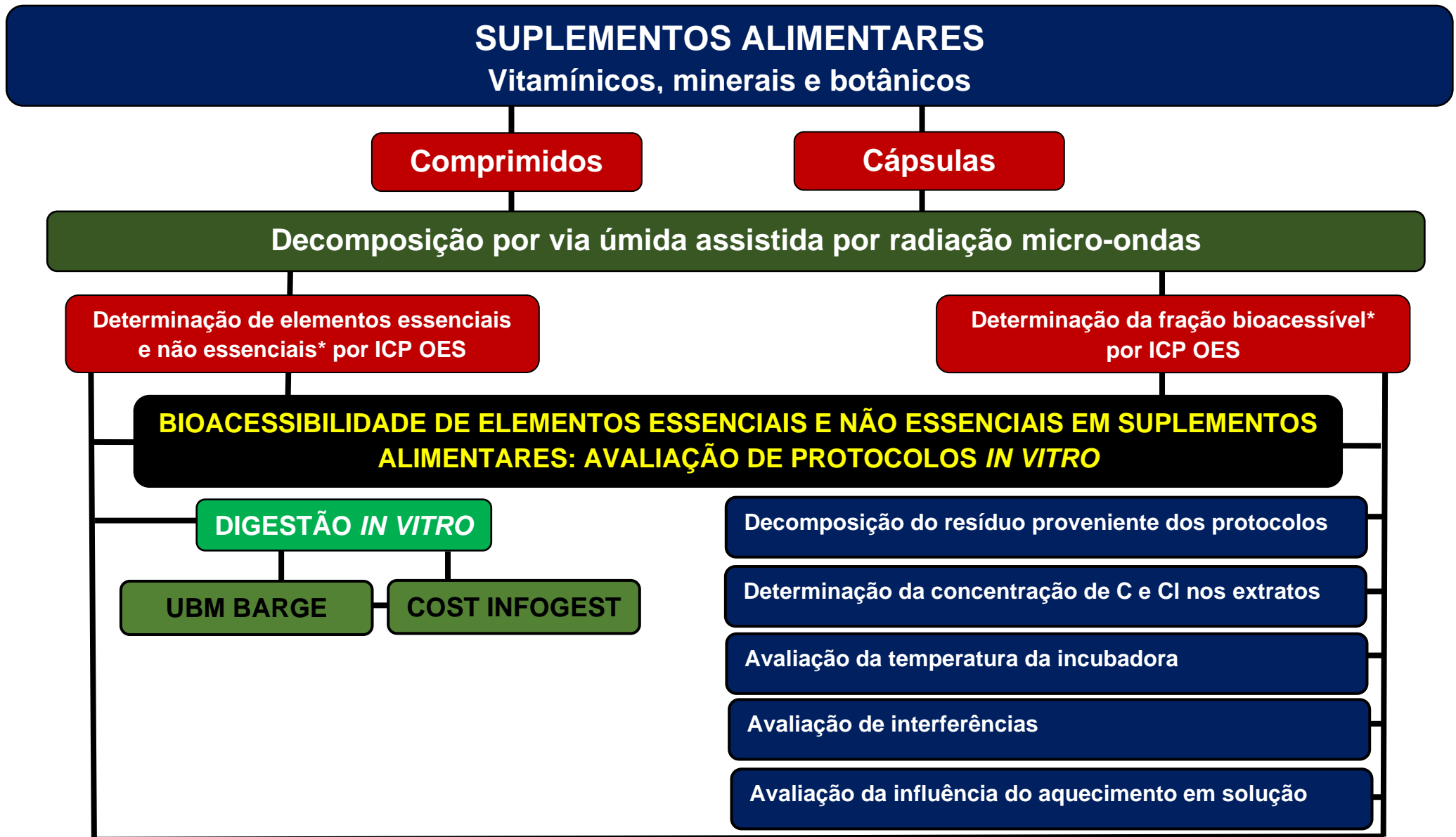
3.8.1 Procedimentos para determinação da concentração de C nos extratos de bioacessibilidade

A concentração de C foi determinada por ICP OES, utilizando uma curva de calibração contendo 5 a 500 mg L^{-1} de C, preparada a partir de uma solução de 1000 mg L^{-1} de C de ácido cítrico monohidratado (Labsynth, Brasil), em HNO_3 5%. Ítrio foi utilizado como padrão interno para a determinação de C, sendo adicionado 1 mg L^{-1} em todas soluções de calibração e amostras. Posteriormente, as amostras foram purgadas por 2 min com Ar, para eliminação de CO_2 dissolvido em solução. Esse procedimento foi realizado previamente à determinação de C por ICP OES, tanto para as soluções de calibração quanto para as amostras.

3.8.2 Procedimentos para determinação da concentração de Cl nos extratos de bioacessibilidade

A concentração de Cl foi determinada por ICP OES, utilizando uma curva de calibração com faixa entre 0,10 a 10 mg L^{-1} de Cl. As soluções foram preparadas em HNO_3 5%. No fluxograma apresentado na Figura 6 está mostrado um resumo dos procedimentos avaliados nesse trabalho.

Figura 6 - Fluxograma dos procedimentos executados nesse trabalho.



*Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Co, Cu, Cd, Cr, Fe, La, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para determinação da concentração total por ICP OES e da fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares por ICP OES utilizando os métodos in vitro UBM BARGE e COST INFOGEST. Um estudo de interferências para uso da MIP OES também apresentado, bem como apresentados e discutidos estudos adicionais para avaliação da influência dos reagentes dos protocolos de bioacessibilidade.

4.1 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA TEMPERATURA NA INCUBADORA

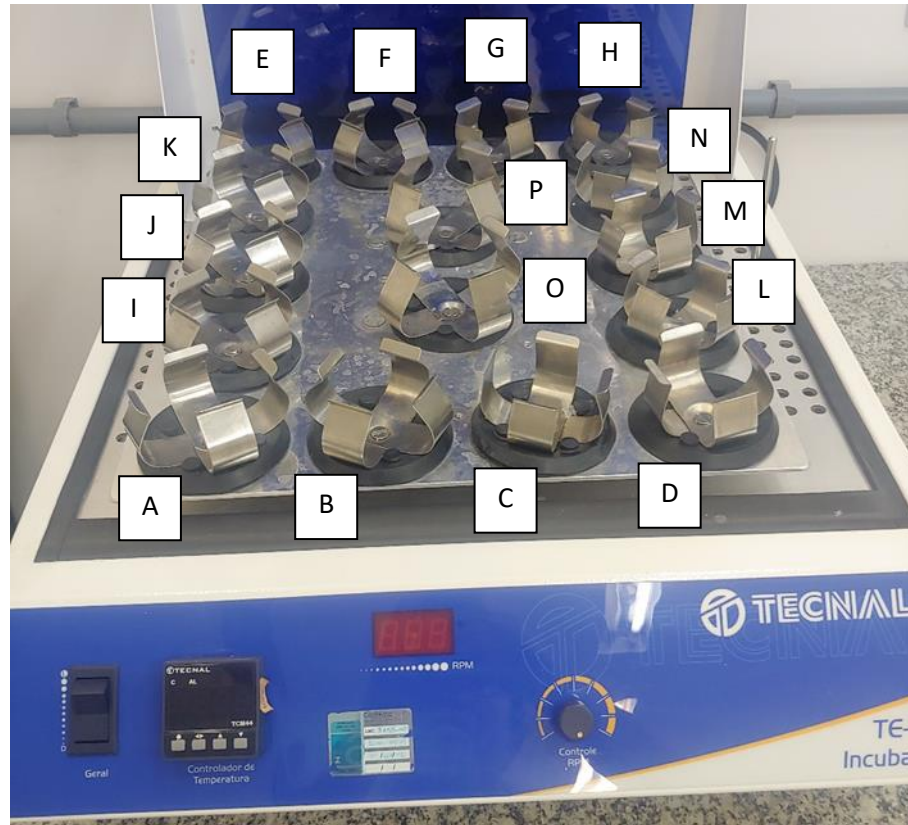
O controle da temperatura é considerado crucial quando se trabalha com avaliação da bioacessibilidade, pois em temperatura muito elevada pode levar a inativação de enzimas específicas utilizadas nos protocolos *in vitro*, além de não representar as condições reais (WRAGG e CAVE, 2002), assim como temperatura inferior também não reproduz a corporal. Sendo assim, considerando que a temperatura ideal para execução dos experimentos de bioacessibilidade deve estar em torno de 37 ± 2 °C, segundo os protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST, foi feita uma avaliação da exatidão do controlador analógico e da temperatura em diferentes locais da incubadora utilizada nesse trabalho.

Utilizando um béquer com água e um termômetro, foi possível observar que a temperatura real da incubadora não era a mesma definida inicialmente no controlador analógico. Sendo assim, foi feito um aumento de 10 °C na temperatura do controlador, configurando para torno de $\pm 47,5$ °C. Com esse aumento, a temperatura interna da incubadora ficou dentro da faixa necessária para aplicação dos protocolos, e se manteve estável durante o tempo para as extrações *in vitro* (4 h e 10 min para o método UBM BARGE e 6 h e 40 min para o método COST INFOGEST).

Após a padronização da temperatura no controlador analógico, a segunda avaliação realizada foi referente ao mapeamento das posições para aquecimento das soluções dentro da incubadora. Foram avaliadas 16 diferentes posições, apresentadas na Figura 7. As posições A, B, C, D, E, F, G e H atingiram e se mantiveram constante na temperatura desejada. As demais posições (I, J, K, L, M, N, O e P) apresentaram menor temperatura, não sendo utilizadas para o estudo.

Por fim, feitas as avaliações, foram padronizadas algumas condições, sendo elas a temperatura do controlador analógico de $\pm 47,5$ °C para que a temperatura interna da incubadora estivesse na faixa desejada (37 ± 2 °C), e as posições A, B, C, D, F, G e H foram definidas para o posicionamento dos meios reacionais.

Figura 7 - Posições de aquecimento na incubadora utilizadas para as etapas de aquecimento dos protocolos de bioacessibilidade



4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ICP OES

Inicialmente, para obtenção dos resultados da concentração total de elementos essenciais e não essenciais nos suplementos alimentares, as amostras foram decompostas baseadas em um método da literatura (BITENCOURT, 2021) para posterior determinação por ICP OES. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8. Observou-se uma maior prevalência de elementos essenciais, o que era esperado devido à composição das amostras, destinadas a complementar carências nutricionais. O Mg foi o elemento majoritário em todas as amostras, além de outros elementos que também apresentaram concentrações altas, como Fe, Mn e Zn.

A concentração de elementos essenciais em amostras de origem botânica pode variar devido ao tipo de planta originária, bem como se houve adição de algum ingrediente sintético ao produto, para fins de atingir o nível de suplementação esperado. Em relação aos elementos não essenciais observou-se que esses estão presentes em baixas concentrações em todas as amostras. O Al foi o elemento de maior concentração presente nos suplementos de origem botânica. As concentrações de Ag, As, Be, Co, Cd, La, Ni e Pb em todas as classes de suplementos ficaram abaixo dos LQs do método e, portanto, deixaram de ser avaliados no estudo da fração bioacessível.

Tabela 8 - Concentração total de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares, obtidos por ICP OES (média \pm desvio padrão, n=3)

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra			
	VM-1	VM-3	BT-2	MN-2
*Al	0,201 \pm 0,0017	0,083 \pm 0,002	0,459 \pm 0,005	0,074 \pm 0,003
Ba	26,6 \pm 0,632	1,79 \pm 0,02	31,3 \pm 0,576	33,3 \pm 3,06
*Ca	89,7 \pm 1,17	161 \pm 2,5	25,6 \pm 0,581	261 \pm 3,24
Cu	521 \pm 6,64	1481 \pm 81	8,92 \pm 1,42	105 \pm 7,91
Cr	24,3 \pm 1,05	91,8 \pm 3,2	1,76 \pm 0,06	15,6 \pm 0,75
*Fe	0,206 \pm 0,010	10,3 \pm 0,01	0,797 \pm 0,025	0,151 \pm 0,004
*K	0,259 \pm 0,018	0,122 \pm 0,002	10,43 \pm 2,20	13,7 \pm 0,92
*Mg	68,5 \pm 1,84	66,8 \pm 4,3	2,94 \pm 0,025	9 \pm 3,82
*Mn	1,640 \pm 0,011	2,90 \pm 0,11	0,034 \pm 0,0005	0,783 \pm 0,067
Mo	43,2 \pm 0,732	61,9 \pm 4,99	1,29 \pm 0,111	12,1 \pm 0,552
*Na	0,679 \pm 0,004	0,948 \pm 0,004	0,639 \pm 0,126	0,567 \pm 0,041
Sr	565 \pm 15,3	34,1 \pm 1,2	409 \pm 20	85,1 \pm 3,8
V	4,890 \pm 0,502	3,840 \pm 0,245	1,16 \pm 0,102	9,83 \pm 0,928
*Zn	10,14 \pm 0,077	11,1 \pm 0,36	0,016 \pm 0,0002	2,31 \pm 0,34

* mg g^{-1}

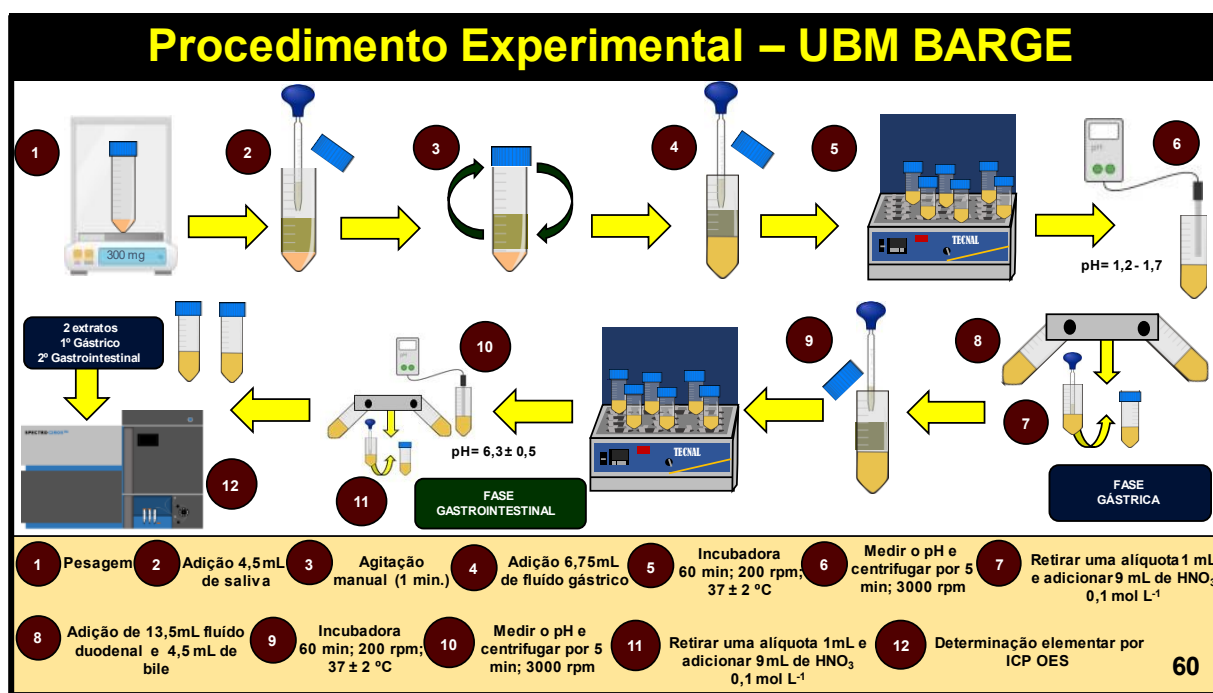
4.3 AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE ELEMENTAR

4.3.1 Determinação da bioaccessibilidade pelo método UBM BARGE

O método UBM BARGE para avaliação da fração bioacessível consiste em duas etapas, produzindo dois extratos distintos: a amostra retirada na primeira fase (fase gástrica) consiste em uma solução retirada do sistema após uma simulação da amostra em contato com saliva e fluido gástrico. Já na segunda fase (fase gastrointestinal), a solução é obtida após simulação do contato do digerido da primeira etapa com os compartimentos do intestino (saliva, fluido gástrico, fluido duodenal, bile) (INTOWONGSE e DEAN, 2006b; WRAGG e CAVE, 2011), conforme apresentado na Figura 6.

Desconsiderando, os elementos com concentração total abaixo do LQ, os demais Ba, Be, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Sr, V e Zn passaram a ser investigados no estudo de bioaccessibilidade. As frações bioacessíveis para elementos essenciais e não essenciais por ICP OES em suplementos vitamínicos, minerais, botânicos, utilizando o método de UBM BARGE na fase gástrica e na fase gastrointestinal, estão apresentadas na Figura 8 e 9 e nas Tabelas 9 e 10.

Figura 8 - Fluxograma representativo do procedimento experimental segundo o método UBM BARGE.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 9 - Frações bioacessíveis de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método UBM BARGE na fase gástrica (■) e na fase gastrointestinal (■). A linha tracejada representa a concentração total do elemento em cada amostra.

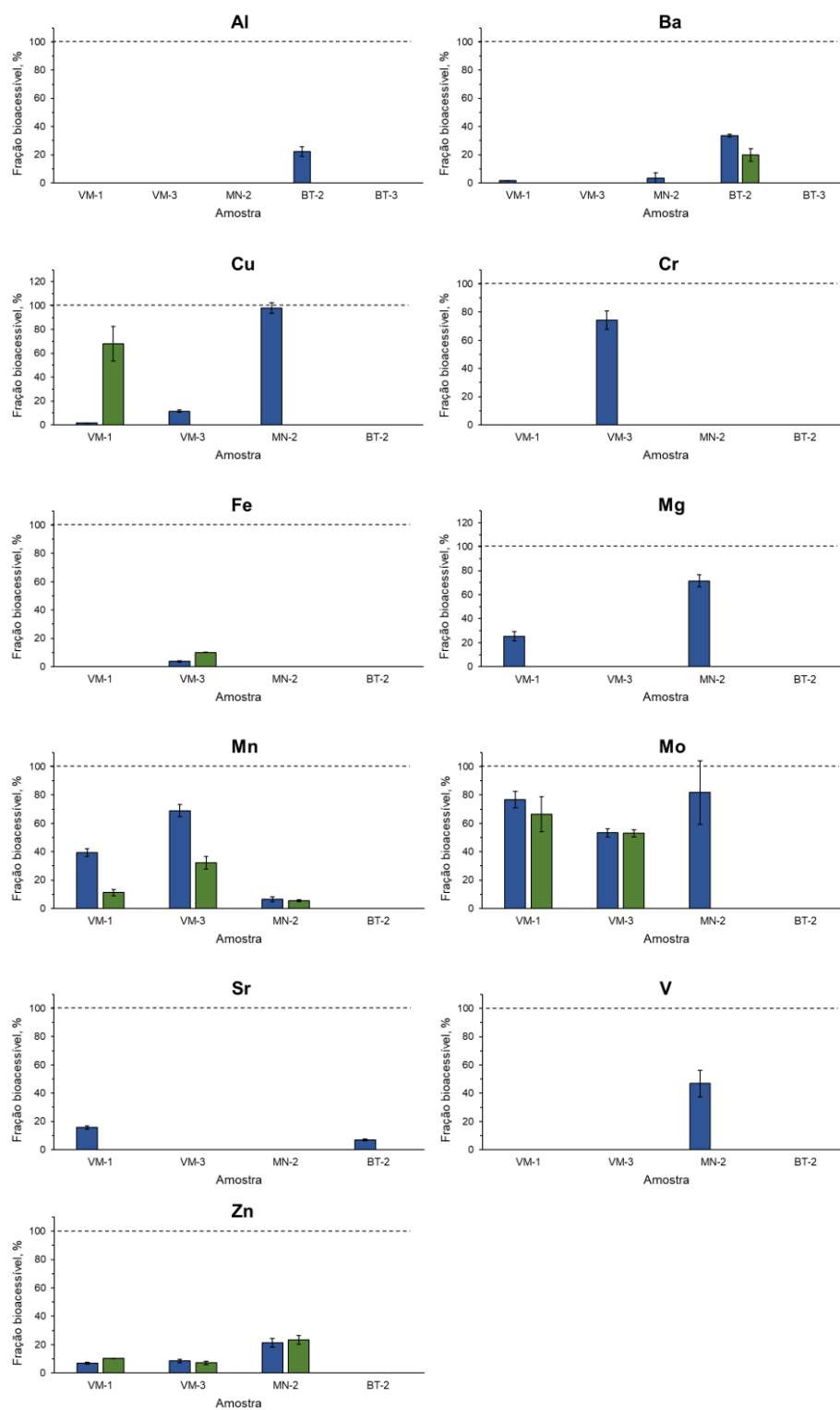


Tabela 9 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gástrica, utilizando o método UBM BARGE e posterior determinação por ICP OES (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Bioacessível (%)	VM-3	Fração Bioacessível (%)	BT-2	Fração Bioacessível (%)	MN-2	Fração Bioacessível (%)
Al	< 7,10	-	< 7,10	-	16,5 \pm 2,6	4	7,10	-
Ba	0,458 \pm 0,018	2	< 1,14	-	10,4 \pm 1,2	34	1,17 \pm 0,30	4
Cu	7,65 \pm 0,67	1	170 \pm 16	11	< 29	-	103 \pm 4,7	98
Cr	< 30	-	7,65 \pm 0,67	8	< 30	-	< 30	-
Fe	< 24,7	-	370 \pm 42	4	< 83	-	< 24,7	-
Mg	17393 \pm 2701	25	<3674	-	< 3674	-	69697 \pm 4998	71
Mn	647 \pm 43	39	2000 \pm 125	69	17,6 \pm 3,8	52	50,8 \pm 12,2	6
Mo	33,2 \pm 2,5	77	33 \pm 1,8	53	< 2,3	-	9,89 \pm 2,72	76
Sr	88,4 \pm 7,1	16	< 23	-	27,7 \pm 2,6	7	< 23	-
V	< 2,07	-	< 2,07	-	< 1,59	-	4,61 \pm 0,93	46
Zn	709 \pm 75	7	955 \pm 133	9	< 39,2	-	490 \pm 70	21

Tabela 10 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gastrointestinal, utilizando o método UBM BARGE e posterior determinação por ICP OES (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Bioacessível (%)	VM-3	Fração Bioacessível (%)	BT-2	Fração Bioacessível (%)	MN-2	Fração Bioacessível (%)
Al	< 5,59	-	< 5,59	-	< 5,59	-	< 5,59	-
Ba	< 0,457	-	< 0,457	-	6,17 \pm 1,43	4	< 0,457	-
Cu	354 \pm 76	68	<466	-	< 466	-	<466	-
Cr	< 183	-	< 183	-	< 183	-	< 183	-
Fe	< 83	-	1030 \pm 100	10	< 83	-	< 83	-
Mg	< 94024	-	< 94024	-	< 94024	-	< 94024	-
Mn	183 \pm 35	11	934 \pm 51	32	28,1 \pm 1,4	83	42,6 \pm 5,9	5
Mo	28,7 \pm 5,3	67	32,8 \pm 1,6	62	< 1,95	-	< 3,79	-
Sr	<405	-	<405	-	< 405	-	< 405	-
V	< 4,53	-	< 4,53	-	< 4,53	-	< 4,53	-
Zn	1039 \pm 212	10	793 \pm 137	7	< 114	-	535 \pm 71	23

De um modo geral, as maiores frações bioacessíveis observadas na fase gástrica foram para Cu (1 a 98%), Mg (25 a 71%), Mo (53 a 77%) e Mn (6 a 69%). Por outro lado, Cr apresentou baixa bioacessibilidade na fase gástrica, abaixo da capacidade de cálculo em função do limite de quantificação, com valor de 8%) para apenas uma amostra, o que pode estar associado à uma alta concentração de Fe, Zn e/ou Mn que interferem nesse processo (JOHNSON, SMITH, & EDMONDS, 1998). A fração bioacessível do Cu na amostra MN-2 foi elevada de 98%, o que pode estar relacionado à forma que esse elemento está presente (complexo de aminoácido de cobre). Esse complexo tende ser facilmente solubilizado na fração gástrica devido à forma da ligação, não sendo afetada pela presença de outros íons metálicos livres (ASHMEAD, 1985). A bioacessibilidade do Mo também foi elevada na fase gástrica (53 a 77%) para as amostras VM-1, VM-3 e MN-2, porém para BT-2 o valor não foi calculado pois a concentração ficou abaixo do LQ. Para V, foi possível avaliar a fração bioacessível apenas para a amostra MN-2 (46%).

Considerando a fase gastrointestinal (Tabela 10), as maiores frações bioacessíveis foram observadas para Cu (68%), Mo (62 a 67%) e Mn (83% para amostra BT-2). Observa-se que as frações bioacessíveis de alguns elementos, como Fe e Zn, foram semelhantes em ambas as fases. Isso indica que a contribuição do fluído gástrico na bioacessibilidade desses elementos é maior quando comparado com o fluído gastrointestinal. Em geral, o baixo pH do fluído gástrico, aliado à complexação da pepsina, pode aumentar consideravelmente a solubilidade de metais (INTOWONGSE e DEAN, 2006b; WRAGG e CAVE, 2011). Por outro lado, para Al (BT-2), Ba (VM-1, BT-2 e MN-2), Cr (VM-3), Cu (VM-3 e MN-2), Mn (VM-1 e VM-3), Mo (MN-2), Sr (VM-1 e BT-2) e V (MN-2), as frações bioacessíveis foram maiores na fase gástrica em comparação com a fase gastrointestinal, o que pode estar associado à precipitação desses elementos na forma de fosfatos e/ou carbonatos presentes na fase gastrointestinal (PELFRÊNE et al; 2011). Na amostra VM-1, o Cu apresentou maior bioacessibilidade na fase gastrointestinal do que na fase gástrica, o que pode estar associado à forma do elemento nessa amostra (não informada).

4.3.2 Determinação da fração não bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método UBM BARGE

Como pode ser observado nos resultados obtidos durante avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método UBM BARGE, somente uma parte da concentração total dos elementos presentes nos suplementos é liberada nas fases gástrica/gastrointestinal (fração bioacessível). Por conta disso, é esperado que uma fração do elemento permaneça no resíduo sólido da extração, o que foi considerado não bioacessível nesse trabalho

Portanto, com o intuito de conhecer melhor o comportamento das amostras, bem como dos elementos em suas diferentes formas frente aos protocolos de bioacessibilidade, foi feita a decomposição do resíduo proveniente da extração da amostra VM-3 utilizando o método UBM BARGE e posterior determinação por ICP OES. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados para a concentração elementar por ICP OES no resíduo da extração utilizando o método UBM BARGE (média ± desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra VM-3					
	Fase Gástrica	Fase Gastrointestinal	Resíduo	Somatório ($\mu\text{g/g}$)	Referência ¹ ($\mu\text{g/g}$)	% do elemento total
Al	< 7,10	< 5,59	78,4 ± 4,64	78,4 ± 4,64	83,7 ± 1,90	94
Ba	< 1,14	< 0,457	1,73 ± 0,110	1,73 ± 0,110	1,79 ± 0,02	97
Cu	170 ± 16	< 466	841 ± 120	1011 ± 136	1481 ± 81	68
Cr	7,65 ± 0,67	< 183	75,5 ± 5,69	83,1 ± 6,36	91,8 ± 3,2	91
Fe	370 ± 42	1030 ± 100	7714 ± 1060	9114 ± 1202	10286 ± 11	89
Mg	< 3674	< 94024	39335 ± 528	39335 ± 528	66780 ± 4265	59
Mn	2000 ± 125	934 ± 51	235 ± 32	3169 ± 208	2903 ± 110	109
Mo	33,0 ± 1,8	32,8 ± 1,6	18,4 ± 0,9	84,2 ± 4,3	66,8 ± 4,3	126
Sr	< 23,0	< 405	27,7 ± 1,4	27,7 ± 1,4	34,1 ± 1,2	81
V	< 2,07	< 4,53	2,33 ± 0,16	2,33 ± 0,16	2,63 ± 1,01	89
Zn	955 ± 133	793 ± 137	8278 ± 470	10026 ± 740	11108 ± 360	90

¹ Concentração total de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares, obtida por ICP OES

De um modo geral, o balanço de massas entre os elementos na fração bioacessível e não bioacessível se aproximou a 100% para todos os elementos avaliados nesse método. Em alguns casos, como para Cu e Mg, menores valores foram observados. Porém, nesses casos, a fração bioacessível encontrada em uma ou em ambas as frações ficou abaixo do LQ do método de bioacessibilidade (que considerou diluições na etapa de medida).

4.3.3 Determinação da bioacessibilidade pelo método COST INFOGEST

O método COST INFOGEST consiste em duas etapas, produzindo apenas um extrato: a primeira (fase salivar) consiste em uma simulação da amostra em contato com a saliva. Já a segunda fase (fase gastrointestinal) simula o efeito do fluido gástrico, fluido duodenal e bile) na bioacessibilidade dos elementos (WRAGG e CAVE, 2011 e DO NASCIMENTO DA SILVA et al., 2018), conforme apresentado na Figura 8

As frações bioacessíveis para os elementos essenciais e não essenciais em suplementos vitamínicos e/ou minerais e botânico, utilizando o método COST INFOGEST e determinação por ICP OES, estão apresentadas na Figura 10 e 11 e na Tabela 12.

Figura 10 - Fluxograma representativo do procedimento experimental segundo o método COST INFOGEST.

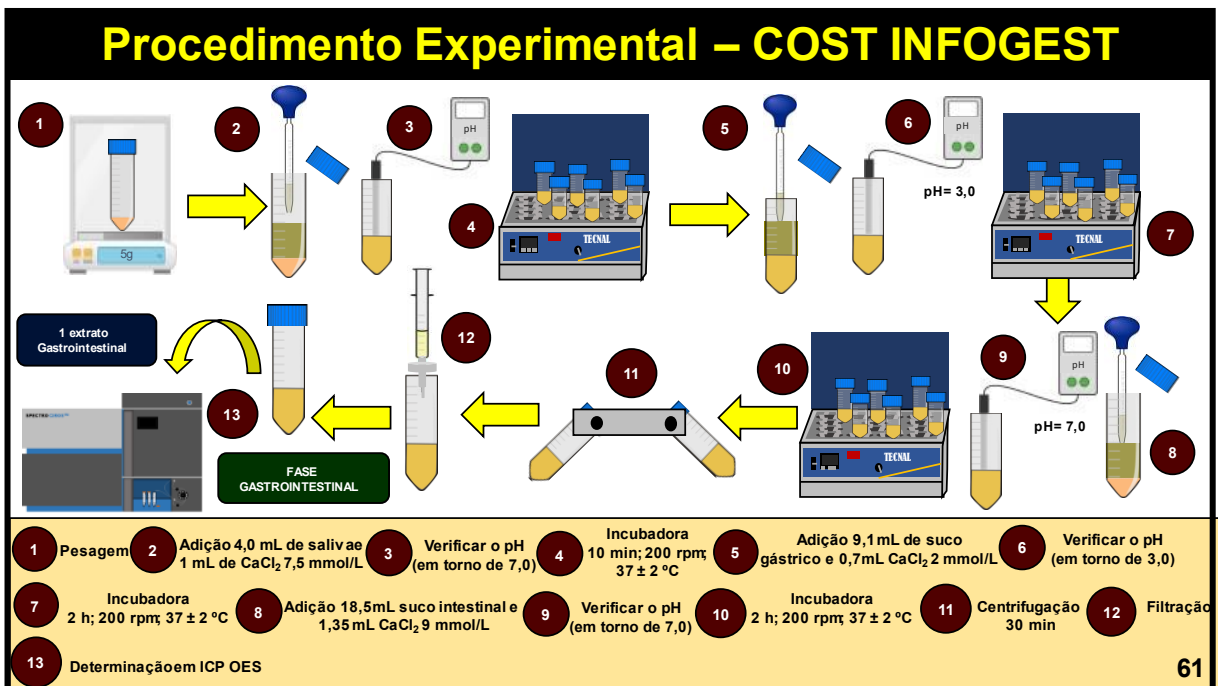


Figura 11 - Frações bioacessíveis de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método COST INFOGEST na fase gastrointestinal (■). A linha tracejada representa a concentração total do elemento em cada amostra.

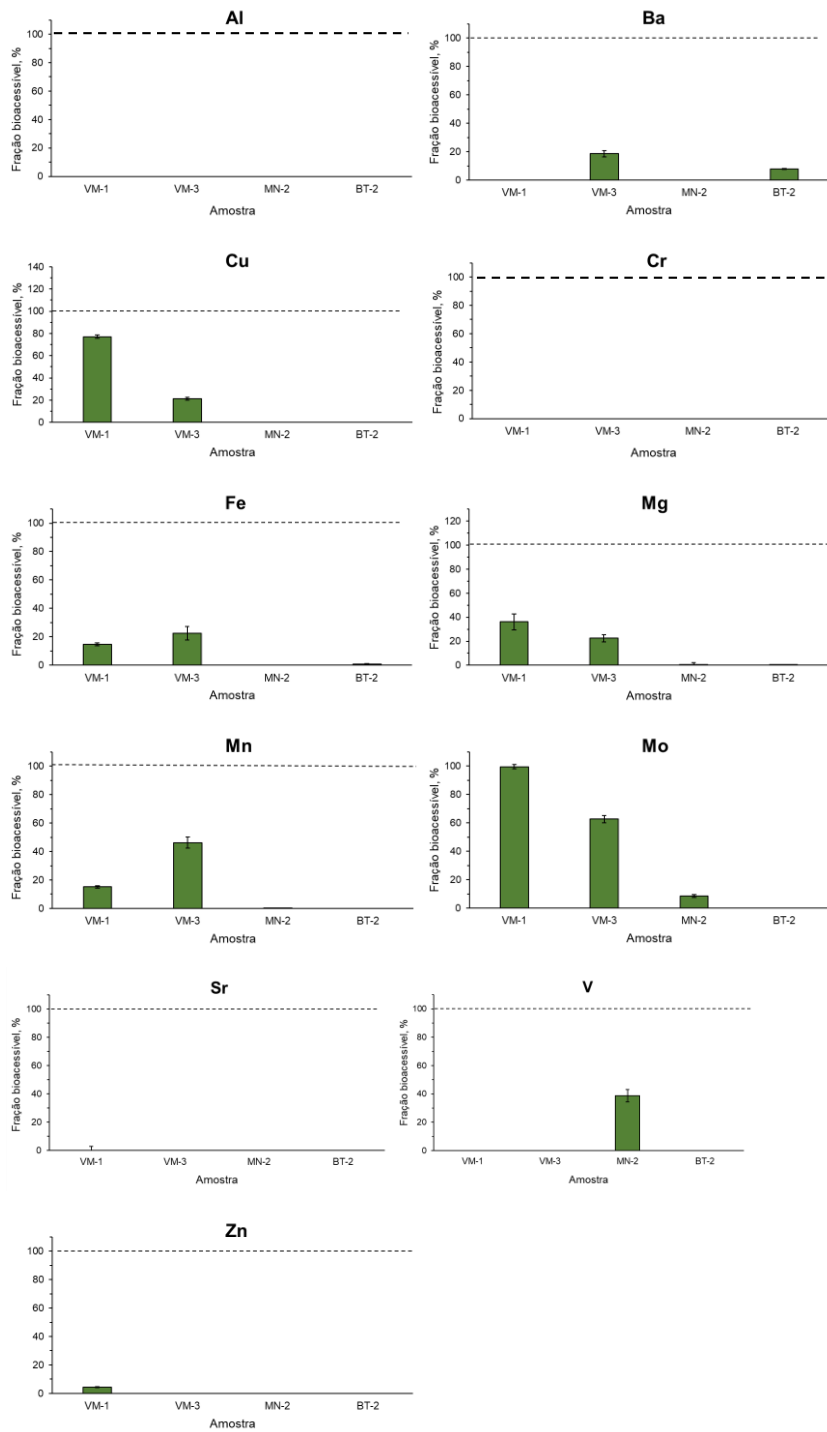


Tabela 12 - Fração bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na fase gastrointestinal, utilizando o método COST INFOGEST e posterior determinação por ICP OES (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Bioacessível (%)	VM-3	Fração Bioacessível (%)	BT-2	Fração Bioacessível (%)	MN-2	Fração Bioacessível (%)
Al	< 52	-	< 31	-	< 157	-	< 581	-
Ba	< 0,240	-	0,333 \pm 0,038	19	2,41 \pm 0,11	8	< 0,057	-
Cu	402 \pm 7,8	77	315 \pm 19,5	22	<231	-	<1057	-
Cr	< 127	-	< 178	-	< 187	-	< 110	-
Fe	30 \pm 2,15	15	2312 \pm 494	20	7,46 \pm 0,859	1	<3,18	-
Mg	24795 \pm 4514	36	15084 \pm 1989	22	<68299	-	< 160270	-
Mn	248 \pm 12	15	1343 \pm 115	46	5,66 \pm 0,225	17	1,04 \pm 0,121	0,13
Mo	43 \pm 0,669	1	38,8 \pm 1,65	63	< 0,549	-	< 0,818	-
Sr	< 302	-	< 159	-	<96	-	< 2,364	-
V	< 0,454	-	< 0,454	-	< 0,473	-	3,81 \pm 0,423	38
Zn	453 \pm 37	5	< 5249	-	< 3,94	-	< 162	-

As maiores frações bioacessíveis observadas nesse método foram para Cu (22 a 77%) e Mo (1 a 63%), Ba (8 a 19%), Mg (22 a 36%), Mn (0,13 a 46%) e V (38%) resultaram em frações intermediárias, enquanto que para Fe e Zn as frações foram consideradas baixas. Conforme relatado na literatura, a bioacessibilidade do Zn é muitas vezes menor em amostras de origem botânica/vegetal (AMMERMAN et al., 1995, LONNERDAL, 2000), o que está inversamente correlacionada com a quantidade de fitatos presentes em amostras de origem botânica/vegetal (DO NASCIMENTO DA SILVA et al.; 2018, KHOUZAM et al.; 2011). As frações bioacessíveis utilizando o método COST INFOGEST foram superiores em relação às da fase gastrointestinal pelo método UBM BARGE para Cu, Fe, Mg, Mn para as amostras VM-1 e VM-3. Para Ba foram superiores na amostra VM-3. Observa-se que as frações bioacessíveis para Ba (BT-2) e Mn (BT-2 e MN-2) foram menores ao serem comparadas com a mesma fração proveniente do método UBM BARGE. O mesmo fato acontece para Mo (VM-1) e para Zn (VM-1, VM-3 e MN-2)

4.3.4 Determinação da fração não bioacessível de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares utilizando o método COST INFOGEST

Assim como avaliado para o método UBM BARGE, a fração dos elementos remanescente no resíduo sólido da extração utilizando o método COST INFOGEST foi determinada a partir da decomposição do resíduo da amostra VM-3 e posterior determinação por ICP OES. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados para a concentração elementar por ICP OES no resíduo da extração utilizando o método COST INFOGEST (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra VM-3				
	Fase Gastrointestinal	Resíduo	Somatório ($\mu\text{g/g}$)	Referência ¹ ($\mu\text{g/g}$)	% do elemento total
Al	< 31	< 0,719	-	83,7 \pm 1,90	-
Ba	0,333 \pm 0,038	1,02 \pm 0,04	1,35 \pm 0,08	1,79 \pm 0,02	75
Cu	315 \pm 19	493 \pm 57	808 \pm 77	1481 \pm 81	55
Cr	< 178	0,234 \pm 0,053	0,234 \pm 0,053	91,8 \pm 3,2	0,3
Fe	2312 \pm 494	< 1,04	2312 \pm 494	10286 \pm 11	22
Mg	15084 \pm 1989	49129 \pm 6266	64213 \pm 6455	66780 \pm 4265	96
Mn	1343 \pm 115	59,7 \pm 11,9	1403 \pm 127	2903 \pm 110	48
Mo	38,8 \pm 1,6	2,21 \pm 0,25	40,7 \pm 1,9	66,8 \pm 4,3	61
Sr	< 159	22,8 \pm 0,3	22,8 \pm 0,3	34,1 \pm 1,2	67
V	< 0,454	< 0,080	-	2,63 \pm 1,01	-
Zn	< 5249	653 \pm 127	653 \pm 127	11108 \pm 360	6

¹ Concentração total de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares, obtida por ICP OES

De um modo geral, a soma das concentrações se aproximou a 100% para a grande parte dos elementos no método COST INFOGEST. Porém, para alguns elementos, houve baixa concordância com o valor de referência, como Fe (22%) e Zn (6%). A baixa concordância para o Cr (0,3%) pode ser explicada pela fração bioacessível ter ficado abaixo do LQ do método. Considerando a concentração total de Cr amostra ($92 \mu\text{g g}^{-1}$) e o LQ do método de bioacessibilidade ($178 \mu\text{g g}^{-1}$), pode-se considerar que a maior parte do elemento estava na fração bioacessível.

Ao trabalhar com avaliação da bioacessibilidade, sugere-se que determinar a fração bioacessível mediante a medida indiretamente no resíduo possa ser uma estratégia para evitar interferências nos protocolos de bioacessibilidade.

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AQUECIMENTO EM MEIO AQUOSO ÁCIDO SOBRE A LIXIVIAÇÃO DOS ANALITOS

É conhecido que o HCl é um ácido com características complexantes, e, por conta disso, é utilizado para auxiliar na extração/solubilização de diversos elementos em métodos de preparo de amostra (NOVAES et al., 2016). A partir disso, considerando que o HCl está presente em grande parte dos fluídos utilizados nos métodos UBM BARGE e COST INFOGEST, foi avaliada a hipótese de estar acontecendo uma extração dos analitos em meio ácido. Nesse caso nenhum reagente adicional foi utilizado. Segundo SCHULTE et al., 2014, a escolha da composição da solução tem sido o foco de muitos trabalhos dedicados à otimização das condições para a extração, essa mistura deve garantir que os analitos sejam solúveis e sejam retidos em solução de forma estável para análise. O uso do HCl 1 mol/L na composição da mistura ácida (cerca de 5%) foi adequada para as recuperações completas, bem como para evitar efeitos de memória.

Para isso, todas as etapas dos procedimentos de ambos os métodos foram realizadas somente com solução de HCl, sem os demais reagentes empregados. Os resultados para o método UBM BARGE podem ser visualizados na Tabela 14 e 15, e para o método COST INFOGEST na Tabela 16.

Tabela 14 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares elementos na etapa que simula a fase gástrica (só com HCl 1 mol/L), utilizando o método UBM BARGE (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Extraída (%)	VM-3	Fração Extraída (%)	BT-2	Fração Extraída (%)	MN-2	Fração Extraída (%)
Al	< 6,32	-	7,77 \pm 0,99	9	< 27,1	-	< 1,67	-
Ba	1,22 \pm 0,18	5	1,38 \pm 0,07	77	1,70 \pm 0,12	5	1,13 \pm 0,04	3
Cu	< 209	-	< 209	-	< 296	-	<171	-
Cr	< 1,306	-	18,34 \pm 0,825	20	< 3,599	-	< 1,047	-
Fe	< 246	-	3279 \pm 258	32	< 167	-	< 49,2	-
Mg	39145 \pm 1297	57	8827 \pm 668	13	< 1779	-	24470 \pm 2625	25
Mn	< 63,3	-	2325 \pm 240	80	< 11,1	-	49,4 \pm 3,3	6
Mo	< 1,70	-	40,3 \pm 1,91	65	< 3,15	-	<1,90	-
Sr	41,3 \pm 4,4	7	14,4 \pm 0,9	42	2,4 \pm 0,12	0,60	10,9 \pm 0,34	13
V	< 1,380	-	< 1,380	-	< 1,814	-	3,71 \pm 0,43	37
Zn	< 4610	-	4206 \pm 323	38	< 240	-	< 1053	-

Tabela 15 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares elementos na etapa que simula a fase gastrointestinal (só com HCl 1 mol/L utilizando o método UBM BARGE (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Extraída (%)	VM-3	Fração Extraída (%)	BT-2	Fração Extraída (%)	MN-2	Fração Extraída (%)
Al	< 3,45	-	11,37 \pm 1,73	14	< 8,51	-	< 33,84	-
Ba	< 0,243	-	1,41 \pm 0,157	78	3,12 \pm 0,10	10	2,93 \pm 0,31	9
Cu	< 444	-	< 444	-	< 204	-	< 204	-
Cr	< 1,876	-	55 \pm 3,53	60	< 1,517	-	< 11,85	-
Fe	< 52,0	-	< 52,0	-	< 6,76	-	< 676	-
Mg	43966 \pm 3030	64	18749 \pm 418	28	< 2467	-	40325 \pm 3476	41
Mn	< 63,3	-	< 63,3	-	< 23,4	-	335 \pm 2	43
Mo	< 3,93	-	< 3,93	-	< 2,86	-	< 14,12	-
Sr	383 \pm 41	68	< 132	-	< 2,48	-	32,8 \pm 3,2	39
V	< 3,89	-	< 3,89	-	< 3,16	-	6,02 \pm 0,636	60
Zn	1355 \pm 156	13	< 65	-	< 460	-	< 460	-

Utilizando o método UBM BARGE, as frações extraídas para Al na primeira etapa (fase gástrica) foram semelhantes às observadas na “fase gastrointestinal”, indicando que é na primeira fase que são extraídos, enquanto praticamente não há contribuição na segunda etapa. Para os demais elementos como Ag, As, Be, Cd, Co, Cu, La, Ni e Pb as concentrações estavam abaixo do LOQ na etapa.

Para Fe (32%), Mo (65%) e Zn (38%) as frações extraídas foram maiores na primeira etapa em comparação com a segunda (fase gastrointestinal). De um modo geral, as maiores frações extraídas observadas na “fase gástrica” foram para Ba (5-77%), Mn (6-80%), Mo (65%) e Sr (0,60-42%). Para Mg (57%) a extração foi considerada intermediária na fase gástrica para a amostra VM-1, bem como a de V (37%) para a amostra MN-2.

As maiores frações extraídas na “fase gastrointestinal” em comparação com a “fase gástrica” foram para Cr (60%), Mg (28-64%) e Sr (39-68%). A extração foi considerada baixa para Zn (14%) na amostra VM-1, Al (14%) na amostra VM-3 e Ba (9% e 10%) nas amostras BT-2 e MN-2 respectivamente.

Conforme observado nos resultados obtidos, é possível confirmar que ocorrem lixiviações de alguns elementos durante a aplicação do protocolo UBM BARGE somente com solução de HCl para ambas as frações (gástrica e gastrointestinal). Esse fato se tornou mais evidente para alguns elementos como Ba, Cr, Mg, Mn, Mo, Sr e V, onde foi possível observar extrações significativas apenas com aquecimento em solução (sem os reagentes dos protocolos). De forma geral para Ba, Cr, Mg, Mn, Mo, Sr e V, as concentrações extraídas foram maiores que a fração bioacessível na “fase gastrointestinal” em relação a “fase gástrica” para as amostras VM-1 e VM-3.

As frações extraídas na “fase gástrica” foram menores que a fração bioacessível para Al e Sr (VM-3 e VM-1), Ba (VM-1, BT-2 e MN-2), Cr (VM-3), Mg (VM-3 e MN-2), Mn (MN-2) e V (MN-2). As frações extraídas na “fase gastrointestinal”, em comparação com a fração bioacessível, foram menores para Cu (VM-1 e BT-2), Fe (VM-3), Mn (VM-1, VM-3, BT-2), Mo (VM-1 e VM-3) e Zn (VM-3 e MN-2)

Tabela 16 - Avaliação da influência do aquecimento em solução aquosa ácida (sem os reagentes dos protocolos) para elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares na etapa que simula a fase gastrointestinal (só com HCl 1 mol/L utilizando o método COST INFOGEST (média \pm desvio-padrão, n=3).

Analito, $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra							
	VM-1	Fração Bioacessível (%)	VM-3	Fração Bioacessível (%)	BT-2	Fração Bioacessível (%)	MN-2	Fração Bioacessível (%)
Al	< 0,382	-	11,2 \pm 0,390	13	1,99 \pm 0,021	0,43	< 3,69	-
Ba	3,76 \pm 0,416	14	1,15 \pm 0,05	64	0,669 \pm 0,012	2	0,303 \pm 0,032	0,92
Cu	< 3,47	-	723 \pm 60,6	49	1,383 \pm 0,041	16	2,28 \pm 0,102	-
Cr	< 0,255	-	16,7 \pm 0,211	18	< 0,216	-	< 0,588	-
Fe	< 30,2	-	6664 \pm 883	65	< 10,5	-	< 14,5	-
Mg	43664 \pm 2519	64	12263 \pm 408	19	< 110	-	< 790	-
Mn	13,1 \pm 1,61	0,80	2540 \pm 121	88	0,818 \pm 0,008	-	5,09 \pm 0,161	0,65
Mo	0,661 \pm 0,03	2	43,1 \pm 6,24	70	< 0,281	-	< 0,260	-
Sr	189 \pm 0,923	34	17,5 \pm 1,28	52	< 3,75	-	< 18,6	-
V	0,321 \pm 0,081	7	0,804 \pm 0,079	21	< 0,286	-	0,592 \pm 0,037	6
Zn	971 \pm 84,1	10	5226 \pm 457	47	< 13,1	-	26,9 \pm 0,442	1

Utilizando o método COST INFOGEST, as frações extraídas consideradas foram considerada altas para Ba (0,92-64%), Fe (65%), Mg (19-64%), Mn (0,65-80%) e Mo (2-70%), intermediárias Cu (16-49%), Sr (34-52%) e Zn (1-47%) e baixas para Al (0,43-13%), Cr (18%) e V (6-21%). As frações extraídas na "fase gastrointestinal" utilizando esse método foram maiores em comparação com a "fase gastrointestinal" no método UBM BARGE para Zn (1-47%) para amostra VM-1, Fe (65%), Mn (0,65-88%), Mo (2-70%) e V (21%) para a amostra VM-3. De um modo geral, os LQs no método UBM BARGE foram maiores que o método COST INFOGEST para Al, Ba, Cr, Mg, Mn e Sr. Ainda, as concentrações encontradas utilizando o método UBM BARGE foram maiores que as obtidas pelo método COST INFOGEST.

Outro estudo realizado, foi em relação a influência do ajuste do pH da solução de HCl 1 mol L⁻¹, onde foi avaliada a hipótese de ocorrer alguma diferença durante a extração dos analitos em meio ácido, para isso foi utilizada a amostra VM3. Cabe destacar que ambos os protocolos apresentam distintas faixas de pH durante a realização das extrações, conforme indicado nas Figuras 8 e 10.

Conforme observado nos resultados obtidos durante as determinações foi possível observar que para grande parte dos elementos, em ambos protocolos, foram obtidas maiores frações bioacessíveis após o ajuste do pH (acima de 90%) dependendo do elemento. Para Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Sr, V e Zn na fase gastrointestinal através do método UBM BARGE e para Fe e Mg através do protocolo COST INFOGEST, os resultados não se mostraram diferentes dos obtidos sem o ajuste do pH, ou seja, abaixo do LQ. Portanto, de acordo com os resultados obtidos é possível verificar que o ajuste do pH conforme indicado nos protocolos poderá afetar as conclusões, a depender do elemento de interesse.

Os resultados para o método UBM BARGE e COST INFOGEST podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 17 - Avaliação da influência do ajuste do pH da solução de HCl 1 mol L⁻¹ para ambos os protocolos.

AMOSTRA VM3						
Analito, µg g ⁻¹	UBM BARGE		COST INFOGEST			
	Fase Gástrica	Fração Bioacessível (%)	Fase Gastrointestinal	Fração Bioacessível (%)	Fase Gastrointestinal	Fração Bioacessível (%)
Al	11,1 ± 0,52	13	14,7 ± 1,9	18	16,3 ± 1,3	19
Ba	< 1,06	-	1,74 ± 0,23	97	1,31 ± 0,02	73
Cu	546 ± 41	37	<14,2	-	834 ± 46	56
Cr	28,1 ± 1,2	31	67,6 ± 4,7	74	24,8 ± 0,9	27
Fe	3442 ± 153	33	< 51	-	6864 ± 745	67
Mg	9154 ± 767	14	19567 ± 454	29	13564 ± 476	20
Mn	2645 ± 265	91	< 7,1	-	2709 ± 87	93
Mo	47,9 ± 1,1	72	< 10,1	-	51,5 ± 0,7	77
Sr	12,4 ± 0,44	36	< 2,24	-	27,0 ± 0,4	70
V	< 14,6	-	< 42,8	-	1,5 ± 0,2	59
Zn	3500 ± 200	32	< 173	-	5794 ± 476	52

4.5 AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS USANDO A MIP OES PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM PROTOCOLOS DE BIOACESSIBILIDADE

Dada sua simplicidade e robustez, a MIP OES pode ser uma alternativa como técnica de determinação para protocolos de bioacessibilidade. Em virtude do uso de N₂ como gás do plasma na técnica de MIP OES, a temperatura é em torno de 5000 K. Devido à essa menor, interferências causadas pela matriz da amostra podem ser mais pronunciadas. Por conta disso, considerando a carga de reagentes utilizados nos protocolos, e a grande quantidade de EIEs, além da complexidade da matriz de suplementos alimentares, que contém alguns elementos em concentrações relativamente elevadas, foi feita uma avaliação das interferências provenientes da matriz nas determinações por MIP OES. Os resultados provenientes dos elementos em concentrações relativamente elevadas, nos digeridos da decomposição total das amostras e determinação por ICP OES, estão apresentados na Tabela 18.

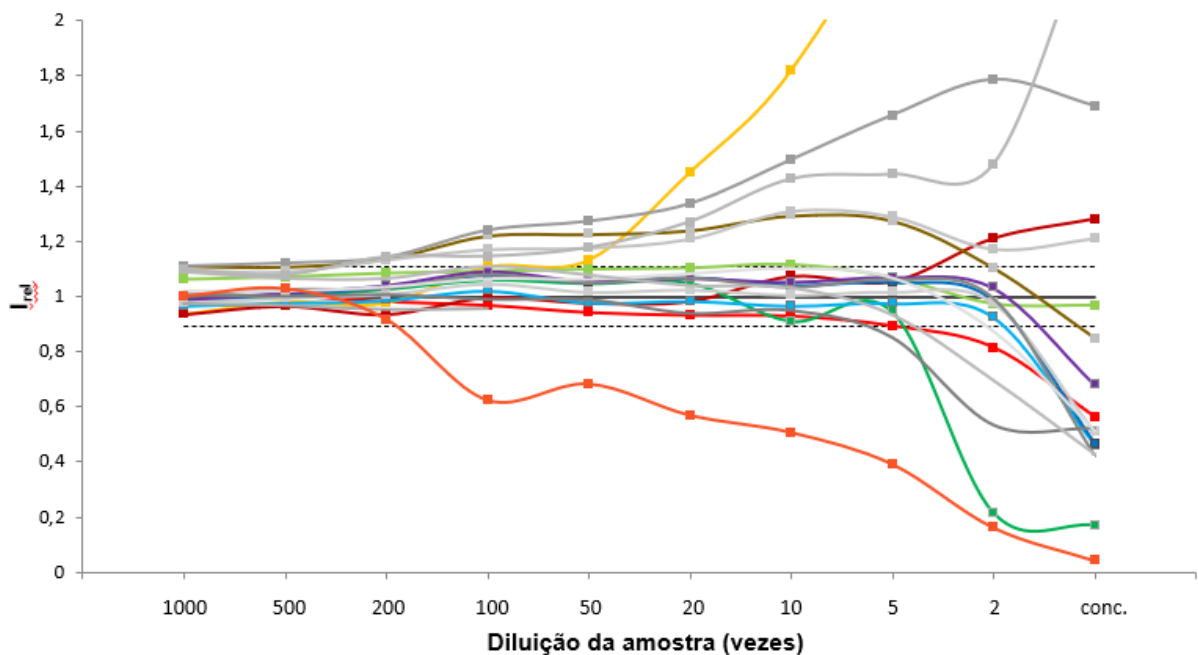
Tabela 18 - Resultados para Ca, K, Na e Mg nos digeridos da decomposição total

Analito, mg g ⁻¹	Amostra			
	VM-1	VM-3	BT-2	MN-2
Ca	89,7 ± 1,17	161 ± 2,5	25,6 ± 0,581	261 ± 3,24
K	0,259 ± 0,02	0,122 ± 0,002	10,43 ± 2,20	13,7 ± 0,92
Na	0,679 ± 0,004	0,948 ± 0,004	0,639 ± 0,126	0,567 ± 0,410
Mg	68,5 ± 1,84	66,8 ± 4,3	2,94 ± 0,024	97,4 ± 3,82

Para isso, foi feita a adição de 100 µg L⁻¹ de todos os analitos em diversas diluições (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 vezes e concentrado) do extrato da amostra BT-2 após o método COST INFOGEST. Essa escolha foi feita pois os extratos provenientes do método COST INFOGEST apresentaram maiores concentrações de elementos, bem como de C e Cl.

Os resultados obtidos foram avaliados segundo suas intensidades relativas (*I_{rel}*), comparando as intensidades obtidas nas diversas diluições com aquela obtida com uma solução contendo os analitos em HNO₃ 5%. Como critério de avaliação intensidades obtidas entre 81 e 119% foram consideradas como isentas de interferências (Item 3.6). O resultado dessa avaliação pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Efeitos provocados pela matriz proveniente do método COST INFOGEST na determinação de Pb (■), Mo (■), La (■), V (■), Zn (■), As (■), Cd (■), Mn (■), Fe (■), Be (—), Sr (■), Cu (■), Ag (■), Co (—), Ni (■), Ba (■), Mg (■), Cr (■) e Al (■) por MIP OES. A linha preta contínua representa a resposta obtida para a solução de referência em HNO₃ 5% (100%) e a linha preta pontilhada representa o desvio-padrão expandido (19%), $I_{rel} =$ Intensidade do analito na solução de diluição do digerido em relação a solução de referência.



A partir dos resultados obtidos, é possível observar que elementos como Co, Cu, não sofreram nenhum efeito, independente da diluição da amostra. Os elementos que tiveram seus sinais intensificados foram: Cr e Sr (a partir da diluição 200 vezes), Mo, Cu e Al (a partir da diluição de 100 vezes) e La (a partir da diluição de 5 vezes). Por outro lado, os elementos que tiveram seus sinais suprimidos foram: Mg (a partir da diluição de 200 vezes), Zn (a partir de 10 vezes), Ag, Ba, Pb e V (a partir de 5 vezes), As, Be, Cd, Fe, Mn e Ni (a partir de 2 vezes).

No estudo de interferências, observou-se o impacto que alguns elementos podem ocasionar nas determinações por MIP OES. Por conta disso, para garantir a exatidão dos resultados, definiu-se o fator de diluição mínimo na amostra nas quais a concentração dos interferentes não prejudiquem as medidas.

Utilizando o método COST INFOGEST, a partir dos resultados obtidos, é possível determinar que o fator mínimo de diluição deve ser: 10 vezes para Mn, Fe, Ni e Ba; 100 vezes para Sr e Al; 200 vezes para Cu e Mg e 500 vezes para Cr. Esses mesmos fatores de diluição foram aplicados para as demais amostras.

Considerando que o equipamento de MIP OES necessitou de uma manutenção durante os experimentos do trabalho, não foi possível realizar a avaliação das interferências utilizando os extratos obtidos pelo método UBM BARGE. Por conta disso, a diluição mínima necessária para evitar interferências nas determinações por MIP OES utilizando esse método foi estimada a partir da concentração de Na no branco do procedimento. Essa abordagem foi definida a partir da elevada concentração de Na nos extratos provenientes do método COST INFOGEST (utilizado para a avaliação das interferências). A partir dos resultados obtidos é possível determinar que o fator de diluição mínimo deve ser de 4 vezes para Al; 10 vezes para Cu e Mg; 20 vezes para Cr na fase gástrica. Na fase gastrointestinal deve ser de 10 vezes para Al e Sr; 20 vezes para Cu e Mg e 50 vezes para Cr.

4.5.1 Determinação da concentração de C nos extratos de bioacessibilidade

Elevados teores de carbono dissolvido em solução podem ocasionar diversos problemas na determinação por técnicas espectrométricas baseadas em plasma (LECLERCQ et. al., 2015). As interferências causadas pelo C podem promover supressão ou aumento do sinal analítico para alguns elementos, e estão relacionadas com alterações no mecanismo de ionização no plasma ou no transporte do analito até plasma (GRINDLAY, G. et. al., 2008). Considerando os métodos para avaliação da bioacessibilidade empregados e a grande quantidade de reagentes utilizados, incluindo diversos compostos orgânicos, bem como a etapa de aquecimento em meio ácido, a concentração de carbono em solução nos extratos obtidos pelos protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST foi determinada por ICP OES. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Concentração de carbono em digeridos de suplementos alimentares via protocolos de bioacessibilidade (média \pm desvio padrão, n=3).

Amostra	C, mg L ⁻¹		
	UBM BARGE		COST INFOGEST
	Fase gástrica	Fase gastrointestinal	
VM-1	124 \pm 4	416 \pm 55	10494 \pm 631
VM-3	327 \pm 15	485 \pm 22	15889 \pm 647
BT-2	440 \pm 32	546 \pm 65	20421 \pm 463
MN-2	159 \pm 11	425 \pm 19	10952 \pm 567

Como pode ser observado, a concentração de carbono em solução proveniente da fase gastrointestinal no método UBM BARGE foi superior ao extrato da fase gástrica para todas as amostras. Isso pode estar relacionado com a adição do fluido duodenal e da bile na fase gastrointestinal, somando os compostos orgânicos presentes nessas fases com aqueles já adicionados na fase gástrica, provenientes dos fluídos salivar e gástrico. Para a amostra BT-2, maior concentração de carbono foi observada na fase gástrica, o que pode ser explicado pela composição da amostra ser de origem botânica, contendo compostos mais facilmente oxidáveis.

As concentrações de carbono em solução nos extratos resultantes do método COST INFOGEST foram significativamente superior quando comparadas com o método UBM BARGE, alcançando 20 g L⁻¹ para a amostra BT-2. Esse aumento na concentração de carbono pode estar relacionado com o fato de que o procedimento resulta em um único extrato final contendo todos os compostos orgânicos presentes nos fluídos adicionados no decorrer do protocolo.

Além disso, durante o procedimento UBM BARGE, os extratos provenientes das fases gástrica e intestinal são diluídos previamente às determinações, reduzindo a concentração de carbono em solução. O tempo de aquecimento também pode ter influenciado nessa diferença. No método UBM BARGE, os extratos permanecem sob aquecimento por 4 h e 10 min, enquanto no método COST INFOGEST os extratos permanecem sob aquecimento num período total de 6 h e 40 min.

Segundo os resultados do estudo de interferências causadas pelo carbono nas determinações por MIP OES realizado por BITENCOURT (2021), observou-se uma relativa boa robustez para concentrações elevadas de carbono, visto que somente Co e Mo sofreram supressão de seus sinais para uma solução contendo 5000 mg L⁻¹ de C. Para todos os demais analitos não houve diferença estatística significativa entre as intensidades obtidas e as intensidades de referência (test *t-student*, nível de confiança de 95%).

Foi constatado por SERRANO et al., 2021, boa tolerância da técnica de MIP OES em relação às interferências causadas por carbono. Não foram observados efeitos provocados pela presença de carbono no sinal de As, Co, Cu, Mg, Mn, Mo, Sc, Se, Sr e Zn em uma solução contendo 50 mg L⁻¹ dos analitos e glicerol 5% m m⁻¹ (aproximadamente 20 g L⁻¹ de C). Quando os resultados obtidos por MIP OES foram comparados com aqueles obtidos na determinação da mesma solução por ICP OES, observou-se uma maior robustez da MIP OES à presença de carbono, uma vez que elementos com energia de excitação menor que 6 eV (Cu, Co, Mg, Mn, Mo, Sc, Sr e Zn) sofreram uma significativa supressão do sinal por ICP OES.

Ao considerar as concentrações encontradas para o método COST INFOGEST devido à elevada concentração de carbono, um fator de diluição de 10 vezes deve ser aplicado, para evitar interferências, e esta necessidade também foi observada.

4.5.2 Determinação da concentração de Cl nos extratos de bioacessibilidade

Tendo em vista o uso de diversos reagentes na forma de cloreto em ambos os métodos para avaliação da bioacessibilidade (como, por exemplo, CaCl₂, NaCl), bem como na formulação dos suplementos alimentares, e considerando que muitos analitos podem precipitar na forma de cloreto dependendo das condições, foi feita a determinação de Cl nos extratos provenientes de ambos os protocolos. Os resultados estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Concentração de cloro em digeridos de suplementos alimentares para protocolos de bioacessibilidade (média \pm desvio padrão).

Amostra	Cl, mg L ⁻¹		
	UBM BARGE		COST INFOGEST
	Fase gástrica	Fase gastrointestinal	
VM-1	114 \pm 3	241 \pm 2	2625 \pm 108
VM-3	90 \pm 22	257 \pm 11	1458 \pm 32
BT-2	90 \pm 1	229 \pm 9	2827 \pm 13
MN-2	113 \pm 3	202 \pm 1	3254 \pm 135

Observa-se que para o método UBM BARGE a concentração de cloro foi menor para todas as amostras na etapa gástrica em relação à gastrointestinal, para qual se obteve as maiores concentrações. A partir dos resultados obtidos através do método COST INFOGEST é possível observar que os valores obtidos para a concentração de cloro foram superiores ao método UBM BARGE, devido ao fato deste método utilizar quantidades maiores de reagentes de contém cloro para o preparo dos constituintes de cada fase.

Os valores obtidos para a concentração de cloro pelo método COST INFOGEST foram superiores aos obtidos pelo método UBM BARGE, devido ao fato deste método utilizar quantidades maiores de reagente que contém cloro para o preparo dos constituintes de cada fase. Conforme o estudo de interferências realizado por BITENCOURT (2021), não são esperadas interferências nas determinações por MIP OES com concentrações de até 5000 mg L⁻¹ de Cl em solução e, portanto, nenhuma diluição seria necessária, por causa deste elemento.

5 CONCLUSÕES

Os suplementos alimentares têm sido amplamente utilizados, visando a suplementação da dieta, tornando-se uma prática comum para reposição de diversos nutrientes essenciais para a vida humana. Apesar de ser extremamente importante conhecer a concentração desses elementos adicionados aos suplementos alimentares, somente essa informação não fornece o real benefício de um elemento químico no organismo, portanto é necessário conhecer a bioacessibilidade de um composto bioativo.

Nesse trabalho, foi avaliada a técnica de ICP OES para determinação de elementos essenciais (Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn) e não essenciais (Ag, Al, Ba, Be, Cd, Cr, La, Ni, Pb, Sr e V) em suplementos alimentares utilizando os protocolos UBM BARGE e COST INFOGEST. Para o método UBM BARGE, as maiores frações bioacessíveis observadas na fase gástrica foram Cu (1 a 98%), Mg (25 a 71%), Mo (53 a 77%) e Mn (6 a 69%). Considerando a fase gastrointestinal, as maiores frações bioacessíveis foram observadas para Cu (68%) e Mo (62 a 67%) e Mn (83%) para amostra BT2. Observa-se que as frações bioacessíveis de alguns elementos, como Fe e Zn, foram semelhantes em ambas fases. Isso indica que a contribuição do fluido gástrico na bioacessibilidade desses elementos é maior quando comparado com o fluido gastrointestinal. Para os demais elementos como Ag, As, Be, Cd, Co, La, Ni e Pb as concentrações estavam abaixo do LQ do método para ambos métodos.

As maiores frações bioacessíveis observadas para o método COST INFOGEST foram para Cu (22 a 77%) e Mo (1 a 63%). Bário (8 a 19%), Mg (22 a 36%) e Mn (0,13 a 46%) apresentaram frações intermediárias, enquanto que para Fe e Zn as frações foram consideradas baixas. As frações bioacessíveis utilizando o método COST INFOGEST foram superiores em relação àquelas da fase gastrointestinal pelo método UBM BARGE para Cu, Fe, Mg, Mn e Mo para as amostras VM-1 e VM-3. Para Ba foram superiores na amostra VM-3. Observa-se que as frações bioacessíveis para Ba (BT-2) e Mn (BT-2 e MN-2) foram menores ao ser comparadas com a mesma fração proveniente do método UBM BARGE, o mesmo fato acontece para Mo (VM-1) e para Zn (VM-1, VM-3 e MN-2).

Considerando que o HCl está presente nos fluídos utilizados nos métodos UBM BARGE e COST INFOGEST, foi avaliada a extração dos analitos em meio ácido, sem o uso dos demais reagentes. A partir do método UBM BARGE, esse fato se tornou mais evidente para alguns elementos como Ba, Cr, Mg, Mn, Mo, Sr e V onde foi possível extrações significativas apenas com aquecimento em solução (sem os reagentes dos protocolos). Utilizando o método COST INFOGEST, as frações extraídas consideradas foram considerada altas para Mn (1-94%), Ba (2-79%) e V (5-74%), intermediárias para Mo (2-68%), Mg (20-62%), Sr (35-61%), Cu (2-59%), Fe (57%) e Zn (1-48%) e baixas para Al (0,32-11%) e Cr (20%). Diante disso, é possível considerar que alguns elementos são lixiviados (alguns em elevada concentração) utilizando somente a solução de HCl.

Por conta de elevados teores de carbono dissolvido em solução, que podem ocasionar diversos problemas na determinação por técnicas espectrométricas baseadas em plasma, bem como o uso de diversos reagentes na forma de cloretos em ambos os métodos para avaliação da bioacessibilidade, foi feita a determinação da concentração de C e Cl nos extratos e avaliação de sua influência nas determinações. Da mesma forma, foi avaliada a influência da matriz dos extratos (altos teores de Ca, K, Na e Mg nas determinações).

Em virtude da complexidade da matriz dos suplementos alimentares, fez-se necessário avaliar as possíveis interferências que podem ocorrer, utilizando o extrato do método COST INFOGEST. Para o estudo de interferências, foram adicionados 100 µg L⁻¹ de todos os analitos em diluições sequenciais de um extrato obtido a partir dos protocolos COST INFOGEST e UBM BARGE (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 vezes e sem diluições), sendo os resultados avaliados de acordo com as suas intensidades relativas.

Considerando o estudo das interferências, foram observados efeitos de supressão e de intensificação. Os resultados obtidos a partir do protocolo COST INFOGEST mostraram que os elementos com sinais intensificados foram Cu, Cr e Sr (diluição de 200 vezes), Mo e Al (a partir de 100 vezes) e La (a partir de 5 vezes). Por outro lado, os elementos que tiveram seus sinais suprimidos foram Zn (a partir de 20 vezes), Ag, Ba, Pb e V (a partir de 5 vezes), e As, Be, Cd, Fe, Mn e Ni (a partir de 2 vezes).

Relativamente aos resultados obtidos com o protocolo UBM BARGE, o As, Ba, Be, Cu, Cd, Cr, Fe, La, Mn, Ni, Pb e V não tiveram efeitos em nenhuma das fases, independentemente da diluição da amostra. Na fase gástrica, os elementos que tiveram seus sinais intensificados foram os seguintes: Al e Mo (de 2 vezes), e Sr (de 20 vezes). Por outro lado, a supressão de sinal foi observada apenas para Ag e Zn a partir da diluição de 50 vezes.

Considerando a fase gastrointestinal, ocorreu intensificação do sinal para Al (de 10 vezes), Cu e Mo (de 2 vezes), e Sr (de 50 vezes), enquanto Zn (de 50 vezes) teve seu sinal suprimido. Elevada concentração de C, Ca, Na e K (concentração máxima de 20, 25, 0,7 e 10 g L⁻¹, respetivamente) foi encontrada nos extractos de ambos os protocolos (compreendendo tanto a concentração da amostra quanto a dos reagentes do protocolo), o que provavelmente induziu os efeitos observados. Assim, de modo a garantir a exatidão dos resultados obtidos após a extração pelo procedimento COST INFOGEST, foi definido um fator de diluição mínimo dos extractos, variando entre 500 (Cr e Al) e 2 vezes (Fe e Mn). Da mesma forma, mas de forma menos expressiva, foi definido um fator de diluição mínimo para os extractos provenientes do procedimento BARGE, variando entre 50 (Sr e Zn) e 2 vezes (Al, Co e Mo) para ambas as fases.

Observou-se o impacto que alguns elementos podem ocasionar nas determinações por MIP OES. Por conta disso, para garantir a exatidão dos resultados, é necessário um fator de diluição mínimo nas amostras para evitar interferências nas medidas, o que foi definido para cada elemento, a partir dos resultados deste estudo. Dessa forma, a avaliação feita nesse estudo permitiu visualizar que a MIP OES é uma alternativa viável para determinação elementar e da bioacessibilidade em suplementos alimentares aliado aos métodos de digestão *in vitro*, possibilitando o uso de uma instrumentação robusta, desde que com cuidados em relação às interferências, e alternativa ao uso de outras técnicas como ICP OES.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. M.; BALMANT, B.D. Avaliação do hábito alimentar pré e pós - treino e uso de suplementos em praticantes de musculação de uma academia no interior do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. Vol. 11. Num. 62. 2017. p.104-117.

AMMERMAN, C.B., Methods for estimation of mineral bioavailability. In: Bioavailability of Nutrients for Animals. Academic Press, NY, pp. 83-94, 1995

ANDERSON, D. Male-mediated developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, v.207, n.2, p. 506-513, 2005.

ANDRADE, K. C., Bioaccessibility of Zinc from Yogurt and Determination of Total Concentration Using Slurry Sampling and Flame Atomic Absorption Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc*, v. 30, n. 12, p. 2721-2730, 2019

ARAÚJO, A. C. M.; SOARES, Y. N. G. Perfil de utilização de repositores protéicos nas academias de Belém, Pará. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 12, n. 1, p. 5-19, jan./abr., 1999.

ASHMEAD HD, Graff DJ, Ashmead HH. Intestinal absorption of metal ions and chelates. Springfield IL Charles C Thomas, 1985:76-77

AVULA, B., et al. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 127, n. 1, p. 54-62, 2011.

BITENCOURT, G. R.; Determinação elementar e avaliação da geração química de vapor para determinação simultânea de As e Hg em suplementos alimentares por MIP OES. Dissertação de Mestrado, **Programa de Pós-Graduação em Química**, Universidade Federal de Santa Maria, 2021, pp.159

BIZZI, C. et al. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, p. 1448-1466, 2017.

BOSSO, S. T., ENZWEILER, J. (2008). Ensaio para determinar a (Bio) disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**, 31(2), 394–400.

BRASIL, ANVISA. IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(g).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. **Diário Oficial da União, Brasília**, n. 79, Seção 1. p. 211, 28 abr. 2010

BROADWAY, A., et al. Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. **Science of The Total Environment**, 409(2), 267–277, 2010

BRODKORB, A., et al. COST INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, 14 (4). pp. 991-1014, 2019. ISSN 1754-2189.

COSTA, J. G., et al. Contaminants: a dark side of food supplements?. **Free Radical Research**, v. 53, n. S1, p. 1113-1135, 2019.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. 1ª Edição. Barueri, SP: Manole, 2005.

Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. São Paulo, v. 9, n. 2, p. 43- 56, 2003.

Disponível em: <http://www.rbne.com.br/index.php/rbne/article/view/740>. Acesso em: 10/08/2022

DO NASCIMENTO DA SILVA, A.B. Leme, M. Cidade, S. Cadore Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. **Talanta**, 117 (2013), pp. 184 188.

DO NASCIMENTO DA SILVA, E., Farias, L.O., Cadore, S., 2018. The total concentration and bioaccessible fraction of nutrients in purées, instant cereals and infant formulas by ICP OES: a study of Dietary Recommended Intakes and the importance of using a standardized in vitro digestion method. *J. Food Compos. Anal.* 68, 65–72

FAO/WHO 1998. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. **Thailand: Bangkok**.

FAVIER A 1991. Les oligoéléments en nutrition humaine. In: CAPPUIS, P. (Ed) Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris: **Editions médicales Internationales**, p. 41-74

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. (2014). Skin protection against UV light by dietary antioxidants. **Food & Function**, 5(9), 1994.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., et al. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.

FLORES, É. M. D. M. Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination. Elsevier Science, 2014. 400 p.

GALANAKIS, C. M. Nutraceutical and Functional Food Components. **Academic Press**, 2017. 364 p.

GONÇALVES, D. A., et al. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 31, n. 5, p. 1097-1104, 2016a.

GRINDLAY, G. et.al., Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimical Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 2, p. 234-243, 2008.

HIRSCHBRUCH MD, et al. Consumo de Suplementos por Jovens Frequentadores de Academias de Ginástica em São Paulo. **Rev Bras Med Esporte**, 2008;14(6): 539-543.

HU Z., et al. Speciation of selenium in brown rice fertilized with selenite and effects of selenium fertilization on rice proteins. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3494.

INTAWONGSE, M., Dean. R. J ,Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract, *Food Additives & Contaminants*, 23:1, 36-48, 2006.

JACOBS et al. 2021. Avaliação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva de cultivares tannat e cabernet sauvignon por mip oes. *Quim. Nova*, V. 44, N. 5, p.547-552, 2021.

JANKOWSKI, K. J.; RESZKE, E. Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry. The Royal Society of Chemistry, 2011. 248 p.

JIN, Q., et al. Recent advances in microwave plasma torch atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 13, n. 5, p. 377-384, 1998.

JOHNSON, M. A., et al. Copper, iron, zinc, and manganese in dietary supplements, infant formulas, and ready-to-eat breakfast cereals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 1035–1040, 1998.

JUSTA NEVES, D. B., & Caldas, E. D. (2015). Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 93-104.

KHAN S., et al. Concentrations and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater-irrigated soil using in vitro gastrointestinal test. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2008;15:344–353

KHOUZAM, R. B., Pohl, P., & Lobinski, R. (2011). Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. *Talanta*, 86, 425–428.

KRAWCZYK, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 88, p. 377-384, 2014.

KREJČOVÁ, A., et al. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. *Food Chemistry*, v. 98, n. 1, p. 171-178, 2006.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar. 2 ed., São Paulo: EditSBQ, 2016. 572 p.

KRUG, F.J. Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Edição. Piracicaba, SP: CENA/USP, 2010.

LECLERCQ, A., et al. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations. **Analytica Acta**, v.885, p.33-56, 2015.

LÖNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition*, v.130, p.1378S-1383S, 2000.

MARTINS, D.G., et al. Estudos toxicológicos, microbiológicos e in vitro de *Achyroclinesatureioides*. X **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, São Paulo, Resumo 29, Anais do Congresso, p.719, 1988.

MESTER, Z.; STURGEON, R. Sample Preparation for Trace Element Analysis. v. 41, **Elsevier Science**, 2003. 1338 p.

MINEKUS, M., et al 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—**An international consensus Food Funct.**, 5 (2014), pp. 1113-1124,2014.

MINEKUS, M.; et al standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* 2014, 5, 1113–1124, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais. Diário Oficial da União 1998; 15 jan.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 24, de 14 de junho de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Diário Oficial da União 2014; 14 jun.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União 2014; 13 mai.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre alimentos para atleta. Diário Oficial da União 2010; 28 abr.

MULLER, A. L. H., et al. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. *Talanta*, v. 136, p. 161-169, 2015.

MÜLLER, A., et al. Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 35, n. 10, p. 2113-2131, 2020a.

NOVAES, C. G. et al. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical journal**, v. 128, p. 331-346, Sept. 2016.

OLESIK, J. W.; WILLIAMSEN, E. J. Easily and Noneasily Ionizable Element Matrix Effects in Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry. *Applied Spectroscopy*, v. 43, n. 7, p. 1223–1232, 1 set. 1989.

OOMEN, A.G., et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. **Environ. Scien. Techn.**, v. 36, p. 3326- 3334, 2002.

PELFRÊNE, A., et al. Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (northern France). *Environ. Geochem. Health* 33, 477–493, 2011.

PEREIRA, C., at al. Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blue-berries and strawberries. *Journal of Food Composition and Analysis* (in press), v.56, p. 58-65, 2016.

PEREIRA, R. M., et al. Multitechnique determination of metals and non-metals in sports supplements after microwave-assisted digestion using diluted acid. *Microchemical Journal*, v. 145, p. 235-241, 2019.

PINHEIRO, F. C., et al. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 471-478, 2019.

POHL, P., et al. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chemistry*, 134(1), 392–396, 2012.

REIS, C., et al. Conhecimento nutricional de usuários não usuários de suplementos alimentares em academias de uma cidade do oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo, v. 6, n. 34, p. 250-260, jul/ago. 2012.

ROMERO, X.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Influence of the operating conditions on the efficiency of internal standardization in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 52, n. 4, p. 487–493, abr. 1997a.

ROMERO, X.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. The effect of sodium on analyte ionic line intensities in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: influence of the operating conditions. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 52, n. 4, p. 495–502, abr. 1997b.

SANTOS, D. C. M. B. Estratégias para determinação espectrométrica de ozônio em águas e de elementos traço em leite de coco. Tese (Doutorado em Química) – **Programa de Pós-Graduação em Química**, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SCHULTE, P., et al. Stauch, Influence of HCl pretreatment and organo-mineral complexes on laser diffraction measurement of loess–paleosol-sequences, *Catena*. 137 (2016) 392–405.

SERRANO, R., et al. Evaluation of calcium-, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: comparison with ICP-OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 34, n. 8, p. 1611-1617, 2019.

SERRANO, R., et al. Insight into the origin of carbon matrix effects on the emission signal of atomic lines in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 177, p. 106070, 2021.

SILVA, M. L. S. Avaliação do comportamento de elementos traço essenciais e não essenciais em solo contaminado sob cultivo de plantas. **Tese de Doutorado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. Piracicaba, 2006.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica, **Editora Thomson**, tradução da 8ª edição, 2006.

SMICHOWSKI, P.; LONDONIO, A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: **A review. Microchemical Journal**, v. 136, p. 113-120, 2018.

SOUZA, A. O., et al. Determination of concentration and bioaccessible fraction of metals in infant cereals by MIP OES. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.77, p. 60-65, 2019.

SULIBURSKA J., et al. Dietary intake and serum and hair concentrations of minerals and their relationship with serum lipids and glucose levels in hypertensive and obese patients with insulin resistance. *Biol. Trace Elem. Biol.* 139, 137-150, 2011.

TODOLÍ, J. L. et al. Elemental matrix effects in ICP-AES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 17, n. 2, p. 142–169, 30 jan. 2002

TOKALIOĞLU, S. et al. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by unified BARGE method. *Food Chemistry*, v.150, n. p. 321-327, 2014.

TUMIR. H., et al. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 885-889, 2010.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. DMMA in dietary supplements.

Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm292362.pdf>. Acesso em: 10/08/2022.

WRAGG, J.; CAVE, M. In-vitro Methods for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in Soils: A Critical Review. R&D Technical Report P5-062/TR/01. **Environment Agency and the British Geological Survey**. 2002.

ZACHARIADIS, G. A.; OLYMPIOU, A. F. Use of slurry suspension sample introduction technique in fast multielement analysis of multimineral and multivitamin formulations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, n. 3, p. 541-546, 2008.

ZHANG, Z.; WAGATSUMA.; K. Matrix effects of easily ionizable elements and nitric acid in high-power microwave-induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry**. v. 57, n. 8, p. 1247-1257, 2002