UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

VALÉRIA MARIA OLIVEIRA DA SILVA

Desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação de Cr (III) e Cd (II) em suplementos alimentares empregando a espectrometria de absorção atômica com chama

Orientador(a): Profª Drª Sulene Alves Araújo

Co-Orientador (a): Profª Drª Anaildes Lago Carvalho

JEQUIÉ/BA

OUTUBRO DE 2016

VALÉRIA MARIA OLIVEIRA DA SILVA

Desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação de Cr (III) e Cd (II) em suplementos alimentares empregando a espectrometria de absorção atômica com chama

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador(a): Profª Drª Sulene Alves Araújo

Co-Orientador (a): Profª Drª Anaildes Lago Carvalho

JEQUIÉ-BA

OUTUBRO/2016

Silva, Valéria Maria Oliveira da.

S585 Desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação de Cr (III) e Cd (II) em suplementos alimentares empregando a espectrometria de absorção atômica com chama/ Valéria Maria Oliveira da Silva.- Jequié, UESB, 2016.

95 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientadora: Profª. Drª. Sulene Alves Araújo.

1. Cádimo (Cd (II)) Em amostras de suplementos alimentares

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual nº 16.825 de 04.07.2016
Programa de Pós-Graduação em Química

BAHIA GOVERNO DO ESTADO

Valéria Maria Oliveira da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **07/10/2016.**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Sulene Alves de Araújo (UNESP, São Paulo-SP, 2003)
(Orientadora)

Profa. Dra. Anaildes Lago de Carvalho (UFBA, Salvador-BA, 2014)
(Coorientadora)

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UFBA, Salvador-BA, 2006)

Profa. Dra. Débora de Andrade Santana (UFBA, Salvador-BA, 2014)

Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho
CEP: 45.208-091 - Jequié – Bahia
Telefone: (73) 3528-9630 Email: ppgquimica@uesb.edu.br

PGQUI

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Senhor Deus que me proporcionou esta vitória e muitas outras pelas quais não conseguiria sem suas bênçãos. O que não consegui ainda, o Senhor sabe o momento certo para realizá-las e me dará forças para alcançá-las.

Agradeço à Deus por ter me concedido a maior vitória da minha vida , que é meu filho Arthur Miguel, pelo qual sem eu saber esteve comigo no fim das minhas pesquisas e na construção desta defesa. Agradeço à Deus também pelos meus dois Anjos da Guarda, que eu tive a graça de nascer como filha deles: Edmílson e Joanita, vocês são os melhores pais do universo! Oro à Deus todas as noites para que eu Vinícius sejamos, pelo menos, a metade dos pais que vocês são. Eu não conseguiria nunca alcançar meus sonhos se não fosse pelo amor, carinho e apoio de vocês. Mesmo quando eu já tinha desistido de mim, vocês jamais desistiram. Mais de 80% do que sou é graças à sua educação. Obrigada por me guiarem, me protegerem, me iluminarem, ensinaram os caminhos a seguir. Obrigada por não desistirem de mim. Esta vitória é sua Painho e Mainha. Outras mais virão, e elas todas ofereço aos dois!

A meu esposo Vinícius por compreender os dias e noites em que não pude estar ao seu lado, e pela compreensão, me apoiando para a conclusão deste trabalho. Aos meus irmãos Júnior e Éder por me incentivarem e inspirarem com seus exemplos de irmãos e homens dignos que são. Agradeço aos demais familiares por me apoiarem também.

Jamais poderia deixar de agradecer às minhas duas orientadoras, mãe Sulene e Anaildes por se disponibilizarem em me ajudar no mestrado. As duas foram mais que orientadoras de pesquisa, me orientaram em tudo e em todos os momentos. Puxaram minha orelha (merecidamente), me ajudaram quando precisei, tiveram muita, mas muita paciência comigo. Enfim, sou muito sortuda em ter essas ter me orientado.

Agradeço ao professor Valfredo, por disponibilizar o espaço do laboratório para fazer minha pesquisa. Sem sua ajuda não conseguiria tal feito. Além disso, por ter contribuído com minha formação acadêmica. Ao pessoal do LQA, sempre animando todos os dias, fazendo da pesquisa algo divertido. À Mirela, Jucy e Márcio

por me ajudarem e socorrerem quando precisei. À Washington que foi o meu segundo operador, me ajudou muito, valeu pessoal!

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UESB, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos órgãos de fomento Conselho Nacionais de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao pessoal do laboratório de Genética Molecular, ao pessoal da Coordenação de Laboratórios, ao pessoal dos Serviços Gerais, os outros laboratórios que me ajudaram também. Aos meus colegas, amigos e a todos que contribuíram para meu sucesso meu muito obrigado!

Figura 1-	Modelo regulatório brasileiro para várias possibilidades de enquadramento de suplementos alimentares.	3
Figura 2-	Aminoácidos essenciais: leucina, isoleucina e valina.	5
Figura 3-	Representação esquemática de uma extração em ponto nuvem convencional.	20
Figura 4-	Otimização do pH para a pré-concentração do íon Cd (II)	24
Figura 5-	Otimização do pH para a pré-concentração do íon Cr (III)	25
Figura 6-	Otimização do complexante PAN para a pré-concentração do íon Cd (II)	26
Figura 7-	Otimização do complexante PAN para a pré-concentração do íon Cr (III)	26
Figura 8-	Otimização do volume do reagente PAN para a pré-concentração dos íons Cd (II)	27
Figura 9-	Otimização do volume do reagente PAN para a pré-concentração dos íons Cr (III).	28
Figura 10-	Otimização da temperatura do banho-maria para Cd (II)	29
Figura 11-	Otimização da temperatura do banho-maria para Cr (III)	29
Figura 12-	Otimização do tempo do banho maria para o Cd (II)	30
Figura 13-	Otimização do tempo do banho maria para o Cr (III)	30
Figura 14-	Otimização do estudo do eletrólito para o Cd (II)	31
Figura 15-	Otimização do estudo do eletrólito para o Cr (III)	32
Figura 16-	Otimização do estudo do volume do eletrólito para o Cd (II)	32
Figura 17-	Otimização do volume do eletrólito para o Cr (III)	33

Figura 18-	Otimização do tipo do solvente extrator para os metais Cd (II) e Cr (III)	34
Figura 19-	Otimização do volume do solvente extrator para Cd (II) e Cr (III)	35
Figura 20-	Otimização do tempo de centrífuga para o Cd (II)	36
Figura 21-	Otimização do tempo de centrífuga para o Cr (III)	36
Figura 22-	Tempo de otimização de resfriamento para o Cd (II)	37
Figura 23-	Tempo de otimização do resfriamento para o Cr (III)	38
Figura 24-	Otimização do volume adicionado do tampão borato para o Cd (II)	40
Figura 25-	Otimização do volume adicionado do tampão amoniacal para o Cr (III)	40
Figura 26-	Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando absorvância como variável dependente para Cd (II)	46
Figura 27	Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando absorvância como variável dependente para Cr (III)	46
Figura 28	Embalagem de suplemento alimentar indicando a quantidade de cromo presente no produto	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estudos utilizando diferentes técnicas para determinação de Cd (II), Cr (III) e de outros metais em matrizes de suplementos	12
Tabela 2-	Estudo inicial do pH para pré- concentração dos íons Cd (II) e Cr (III) na EPN	23
Tabela 3-	Parâmetros estudados para otimização da concentração do HNO_3 para digestão de amostras	38
Tabela 4-	Características Analíticas do Método Proposto para Cd (II) e Cr (III)	41
Tabela 5-	Coeficiente de variação da repetitividade do método para os metais Cd (II) e Cr (II).	42
Tabela 6-	O RSD obtido para diferentes analistas, em diferentes dias e diferentes pontos utilizados na avaliação da precisão intermediária para determinação de Cd (II).	43
Tabela 7-	O RSD obtido para diferentes analistas, em diferentes dias e diferentes pontos utilizados na avaliação da precisão intermediária para determinação de Cr (III)	43
Tabela 8-	Matriz do planejamento fatorial completo(2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento para Cd (II)	44
Tabela 9-	Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento para Cr (III).	45
Tabela 10-	Determinação de Cd (II) e Cr (III) nas amostras de suplementos alimentares, BCAA's e termogênicos.	48
Tabela 11-	Resultados do ensaio de recuperação de Cd (II) nas amostras de suplementos, para os BCAA's (1 e 5)e termogênicos (2 e 5) para avaliar a exatidão do método.	50
Tabela 12-	Resultados do ensaio de recuperação de Cr (III) nas amostras de suplementos, para os BCAA's (3 e 4)e termogênicos (1 e 4) para avaliar a exatidão do método.	51
Tabela 13-	Efeito de vários íons que interferem na determinação de Cd (II) e Cr (III) usando o método proposto	53
Tabela 14-	Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança	62

dos Alimentos (AESA).

Tabela 15- Ingestão Diária Recomendada. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Dietética Americana
AI	Ingestão Adequada
AESA	Autoridade Europeia Para A Segurança Dos Alimentos
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCAA	Aminoácido de Cadeia Ramificada
CONTAM	Contaminantes da Cadeia Alimentar
DRI	Ingestões Dietéticas de Referência
EPN	Extração em Ponto Nuvem
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica Em Chama
FE	Fator de Enriquecimento
FI	Injeção de Fluxo
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
PAN	1-(2-Piridilazo)-2-Naftol
RDA	Doses Diárias Recomendadas
RSD	Desvio Padrão Relativo
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
Triton X-14	Octilfenoxipolietoxietanol
UL	Limite Superior Tolerável de Ingestão

Desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação de Cr(III) e Cd(II) em suplementos alimentares empregando a espectrometria de absorção atômica com chama

Valéria Maria oliveira da silva

Profª Drª Sulene Alves de Araujo (Orientadora)

Profª Drª Anaildes Lago Carvalho (Co-Orientadora)

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um método empregando a pré-concentração em extração em ponto nuvem (EPN) e detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) para determinação de Cd(II) e Cr(III) em amostras de suplementos alimentares comercializados na cidade de Jequié-BA. No presente trabalho, para pré-concentração dos íons Cd(II) e Cr(III) utilizou-se como reagente complexante o 1-(2-Piridilazo)-2-Naftol (PAN), o surfactante Triton X-114 5% (v;v) utilizado para a formação da micela, o eletrólito KCl 6% (m/v) para separação de fases e HNO_3 como solvente dispersor. A EPN é uma técnica de separação e pré-concentração amplamente difundida na Química Analítica devido a segurança operacional; baixa inflamabilidade do surfactante; baixa toxicidade para o analista e para o ambiente. Estudos foram aplicados para otimizar as variáveis em estudo: pH, concentração do PAN, temperatura do banho-maria, concentração doHNO_3 do solvente dispersor. Sob condições otimizadas o método apresentou faixa linear dinâmica de 2,33 a 100µg g^{-1}, LD de 0,080µg g^{-1}, LQ de 0,233 µg g^{-1}, um fator de enriquecimento de 17,0 e um índice de consumo de 0,60 mL, para o Cd(II). Para o Cr (III), a linearidade apresentou valores de 10,82 à 700 µg g^{-1} , LD de 0,361 µg g^{-1} , LQ de 1,08 µg g^{-1} , um fator de enriquecimento de 22,0 e índice de consumo de 0,5 mL. A exatidão do método foi testada através da adição e recuperação, variando de 84,2 à 108,5 % recuperados para Cd (II) e 509 a 4.094 % para Cr (III). A precisão foi testada através de testes de repetitividade e reprodutibilidade, calculando o RDS (%) das medidas e verificou que está abaixo de 20 %, onde neste trabalho foi encontrado com valores de RSD de 2,12 e 2,43 % para Cd(II) e para Cr (III) foram 0,86, 0,5 e 1,0 %. As concentrações de Cd(II) foram de 0,92 ± 0,6 à 2,39 ± 0,10 µg g^{-1} e para o Cr (III) foram de 1,69 ± 0,8 à 35,35 ± 0,4 µg.g^{-1}.

Palavras Chaves: Cádmio, Cromo, suplementos alimentares, Extração em Ponto Nuvem e F AAS.

Development of an analytical procedure for determination of Cr (III) and Cd (II) in food supplements using the atomic absorption spectrometry with flame

Valéria Maria oliveira da silva

Profª Drª Sulene Alves de Araujo (Orientadora)

Profª Drª Anaildes Lago Carvalho (Co-Orientadora)

ABSTRACT

This research developed an approach using cloud point extraction (CPE) and preconcentration of Cd(III) and Cr (III) as well the determination of these elements by flame atomic absorption spectrometry in samples of food supplements traded in the city of Jequié-Brazil. For the preconcentration of the ions Cd (II) and Cr (III) were used the 1- (2-Pyridylazo) -2-Naphthol (PAN) as the complexing reagent, the 5% Triton X-114 surfactant V; v) used for the micelle formation, 6% KCl electrolyte (m / v) for phase separation and HNO_3 as the dispense solvent. The CPE is a widely used separation and preconcentration approach in Analytical Chemistry due to its operational safety, low flammability of the surfactant, low toxicity to the analyst and the environment. Studies were applied to optimize the variables under study: pH, PAN concentration, water bath temperature, HNO_3 concentration in the dispense solvent. Under optimized conditions the method presented a linear dynamic range of 2,33 to 100 ug g^{-1}, LD of 0,080 ug g^{-1}, LD of 0,0080 ug g^{-1}, 0,2 of 0,233 ug g^{-1}, an enrichment factor of 17,0 and a consumption index of 0,60 mL for Cd (II). For the Cr (III), the linearity presented values from 10,82 to 700 ug g^{-1}, LD of 0,361 ug g^{-1}, LQ of 1,08 ug g^{-1}, an indicator of 22,0 and consumption index of 0,5 mL. The accuracy of the method was tested through addition and recovery, ranging from 84,2 to 108,5% recovered for Cd (II) and 509 to 4,094% for Cr (III). The accuracy was tested by repeatability and reproducibility tests, calculating the RDS (%) of the measurements and it was verified that it is below 20%. In this paper, it was found RSD values of 2,12 and 2,43% for Cd (II) and Cr (III) were 0.86, 0,5 and 1.0%. The concentrations of Cd (II) were from 0,92 ± 0,6 to 2,39± 0,10 ug g^{-1} and for Cr (III) were from 1,69 ± 0,8 to 35,35 ± 0.4 ug g^{-1}.

Keywords: Cadmium, Chromium, food supplements, cloud point extraction and F AAS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA 3

2.1 Suplementos Alimentares 3

2.1.1 BCAA's 4

2.2 Termogênicos 5

2.3 Toxicidade do cádmio em alimentos 6

2.4 Determinação de Metais em Suplementos Alimentares 9

2.5 Determinação de Cd (II) e Cr (III) em suplementos alimentares utilizando técnicas espectroanalíticas e extração em ponto nuvem 14

3. OBJETIVOS 17

3.1. Objetivos Gerais 17

3.2. Objetivos Especificos 17

4. PARTE EXPERIMENTAL 18

4.1. Equipamentos e materiais utilizados 18

4.2. Reagentes e soluções 18

4.2.1.Soluções de Cd (II) e Cr (III) 18

4.2.2. Soluções-tampão 18

4.2.3. Soluções do reagente complexante PAN 19

4.2.4. Solução do surfactante Triton X-114 5% (v/v) 19

4.2.5. Solução do eletrólito KCl 6%(v/v) 19

4.3. Amostras de suplementos 19

4.4. Preparo das amostras de suplementos alimentares 19

4.5. Procedimento para extração em ponto nuvem 20

4.6. Validação dos métodos analíticos 20

4.6.1. Linearidade 20

4.6.2. Limites de detecção e quantificação 21

4.6.3. Precisão 21

4.6.4. Exatidão 22

4.6.5. Adição e Recuperação 22

4.6.6. Efeito dos íons interferentes 22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23

5.1. Otimizações para Cd (II) e Cr (III) 23

5.1.1 Otimizações do pH 23

5.1.2. Otimizações para as concentrações do complexante 1-(2-Piridilazo)-2-Naftol (PAN) 25

5.1.3. Otimização do volume do reagente PAN 26

5.1.4. Otimização da temperatura e o tempo do banho-maria 28

5.1.5. Otimização do estudo do tipo de eletrólito e de seu volume 31

5.1.6 Otimização do estudo do tipo de solvente extrator e seu volume 33

5.1.7. Otimização do tempo de centrifugação 35

5.1.8. Otimização do tempo do resfriamento 36

5.1.9. Otimização da concentração de HNO_3 para digestão das amostras 38

5.2.Digestão de amostras 38

5.3.Volume da solução tampão 39

6. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS E DETERMINAÇÃO 41

7. PRECISÃO 42

7.1 Repetividade 42

7.2 Precisão Intermediária 43

8. ROBUSTEZ 44

9. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO 47

9.1 Exatidão 48

9.2 Adição e Recuperação 48

9.3 Efeito dos Íons Interferentes 52

10. CONCLUSÃO 54

11. REFERÊNCIAS 55

12. ANEXOS 62

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento sócio econômico e tecnológico, a sociedade atual tem se preocupado muito com a forma física e a qualidade de vida. Porém, muitas pessoas limitam-se apenas à busca do corpo ideal sem atentar-se com o que consomem para alcançar tal objetivo, correndo riscos à saúde por ingerirem substâncias que são tóxicas ao organismo.

Define como suplementos alimentares**,** produtos constituídos por fontes concentradas de substâncias tais como vitaminas, minerais, fibras, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos (como o ômega 3), ervas e extratos, probióticos, bem como outras substâncias, incluindo enzimas, carotenoides, fitoesteróis, entre outras. A partir de sua composição, podem apresentar efeitos nutricionais, metabólicos e/ou fisiológicos que se destinam a complementar a alimentação normal em casos em que a ingestão desses componentes seja insuficiente. O produto pode ser apresentado nas formas sólida, semi sólida, líquida e aerossol, como tabletes, drágeas, pós, cápsulas, granulados, pastilhas mastigáveis, líquidos e suspensões.

Pessoas de diferentes faixas etárias fazem excessivas atividades físicas e consomem indiscriminadamente produtos alimentares suplementados para estarem de acordo com os padrões estéticos ditados pela indústria cultural do momento. Os seguimentos das indústrias de suplementos nutricionais lucram muito com todo esse culto, e a mídia propõe, indiretamente, soluções para a obtenção de corpos belos e esculturais em pouco espaço de tempo.

O hábito de uma alimentação saudável é de grande importância para a redução do risco de doenças e para a manutenção de uma saúde ótima. Por outro lado, uma série de fatores pode representar grande desafio para a manutenção de uma alimentação balanceada e variada, por exemplo: falta de tempo para o preparo de refeições; opção por conveniência e praticidade; omissão ou substituição das refeições principais; realização de refeições fora de casa [1].

Suplementos vitamínicos e minerais são facilmente encontrados e comercializados livremente sem uma necessidade de prescrição e orientação médica, preocupando assim as unidades de saúde. Pesquisas têm demonstrado que uma inadequada ingestão de suplementos pode ocasionar mais danos que benefícios ao corpo humano [2].

Durante o processo de fabricação desses suplementos podem ocorrer contaminações, introduzindo elementos que são prejudiciais à saúde humana, ou a adulteração do produto com a adição de drogas sintéticas [3].

Consumir suplementos nutricionais com o objetivo de melhorar o desempenho, aumentar a massa muscular, entre outros motivos, virou uma febre no meio dos praticantes de atividades físicas em academias, com ênfase para os praticantes de musculação [4].

Ocorre que nem sempre se procura profissionais da área de nutrição para orientação e acompanhamento, sendo que o mais comum são indicações variadas, ou mesmo a procura na internet ou em lojas de suplementos. Se esta prática é decidida e feita por conta própria, os consumidores não levam em conta as possibilidades, por exemplo, do aparecimento de problemas hepáticos e renais. O consumo de suplementos nutricionais é preocupante, visto que este segmento tem crescido no mercado.

A orientação dietética individualizada é defendida por nutricionistas a fim de se obter refeições adequadas e equilibradas, também somando à prática da atividade física orientada e regular, pois, tais ações podem levar a resultados satisfatórios como a melhora do sistema imunológico.

Este trabalho está dividido em tópicos. O primeiro tópico envolve uma revisão bibliográfica sobre a determinação de cromo e cádmio em suplementos , nesse mesmo tópico é apresentado a toxicidade dos metais cádmio e cromo em amostras de BCAA’s e termogênicos. São apresentadas também as técnicas e métodos para determinação de tais metais.

Nos tópicos subseqüentes são apresentados objetivos, parte experimental e os resultados e discussão encontrados para o método proposto.

2. REVISÃO BIBLIOGÁFICA

2.1. SUPLEMENTOS

A alimentação através de suplementos pode ser útil quando a seleção de alimentos em uma dieta possui carências nutricionais. Os suplementos alimentares contêm diversas substâncias em sua composição. Destacam-se as vitaminas, sais minerais, proteínas, carboidratos e fibras [4]. Podem ser usados com a finalidade de atingirem as Doses Diárias Recomendadas (DDR). Com tudo, a Associação Dietética Americana (ADA) preconiza que a melhor estratégia nutricional para reduzir riscos de doenças crônicas e promover a saúde é através da variação de alimentos para obter nutrientes [5]. Segundo a ADA, os suplementos de nutrientes não devem ser utilizados como substitutos de uma dieta saudável, pois algumas evidências sugerem que pessoas consomem menos nutrientes do que aqueles que não usam suplementação [5]. Segundo a Gerência Nacional de Alimentos, órgão que faz parte da ANVISA, existe uma ausência de regulamentação específica para uma definição clara do que sejam suplementos alimentares. Além de existirem diferentes abordagens de regulação e várias possibilidades de enquadramento como: alimento ou medicamento, como mostrado na **Figura1** (Gerência Geral de Alimentos).

Figura 1: Modelo regulatório brasileiro para várias possibilidades de enquadramento de suplementos alimentares.

(**Fonte:** Adaptada. [6])

Atualmente, sabe-se que muitos são os fatores para a melhora da performance em esportes e atividades físicas. Além de programas de treinamentos e características psicológicas positivas, a adequação alimentar é um dos principais fatores [7]. A literatura e meios de comunicação referenciam a importância da alimentação equilibrada, e cresce a preocupação com a adequação da ingestão de nutrientes [8]. Muitos suplementos são comercializados com informações nos rótulos sobre consequências da sua utilização; no entanto, poucas são as comprovações científicas sobre os benefícios do uso destes produtos [4].

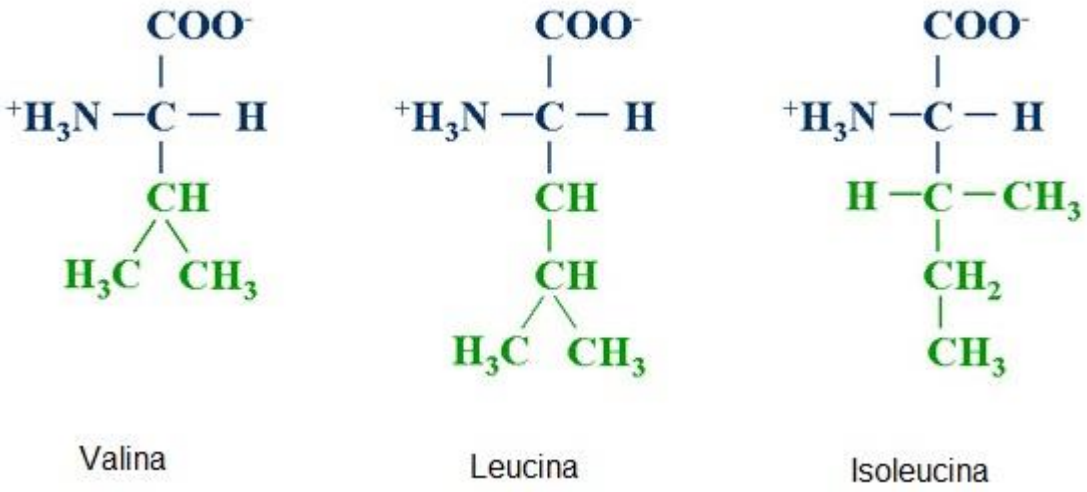
Os suplementos utilizados para este trabalho são os *proteicos Branch Chain Amino Acids* (BCAAs) e os termogênicos, pois trabalham com dois extremos, o primeiro em ganhar massa corporal e o outro em perder peso principalmente gordura.

2.1.1. BCAAs

Os BCAA's, abreviação de "Branch Chain Amino Acids" ou "aminoácidos de cadeia ramificada", estão entre os suplementos mais importantes para qualquer programa nutricional esportivo. Constituem 35% da massa muscular corporal e são indispensáveis para manutenção e crescimento dos músculos. Dentre os aminoácidos essenciais, temos: leucina, isoleucina e valina (**Figura 2**). Esses três aminoácidos não são produzidos pelo corpo, por isso, existe a necessidade de serem ingeridos pela dieta. Eles são encontrados em fontes proteicas de origem animal, como carnes, ovos, leite e derivados, porém a proteína isolada do soro do leite é uma das fontes mais ricas.

Os Branch Chain Amino Acids ou aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) são amplamente utilizados para a prática esportiva, sendo oxidados de forma rápida e preferencialmente pelo músculo esquelético durante exercícios de intensidade moderada/alta e de longa duração, situação na qual se observa na queda em suas concentrações plasmáticas, provocada pelo maior desvio desses aminoácidos para a produção de energia durante o exercício. Sabe-se que eles atuam como importante fonte de energia muscular durante o estresse metabólico. Os BCAAs estimulam a produção de insulina, fazendo com que os aminoácidos penetrem mais facilmente nas células musculares para que possam servir de matéria-prima na construção dos músculos.

Figura 2: Aminoácidos essenciais: leucina, isoleucina e valina.



Estudos com suplementação de BCAA demonstram que essa estratégia nutricional pode ser efetiva na promoção do anabolismo proteico muscular e na diminuição da lesão muscular pós-exercício [9].

2.2. TERMOGÊNICOS

Termogênicos são substâncias que têm a capacidade de acelerar o metabolismo, promovendo uma queima maior de calorias e reduzindo o apetite. Por isso, essas substâncias são conhecidas como queimadoras de gordura, uma vez que são úteis na sua metabolização, transformando-as em energia. Alimentos termogênicos possuem um efeito térmico ou de termogênese, que induz o corpo a gastar certa quantidade de energia durante o processo digestivo. A ação termogênica significa a propriedade de transformar nutrientes em energia, principalmente as calorias provenientes da gordura corporal. Estas características favorecem não só quem quer perder peso, mas auxiliam nos casos de falta de energia. Os termogênicos otimizam o metabolismo para que a pessoa tenha uma maior queima calórica ao longo do dia, mesmo durante o descanso (metabolismo basal), não permitindo depósitos de outras reservas de gordura. Para entender o que são e como agem os termogênicos é necessário entender o que é o metabolismo.

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que as substâncias sofrem no interior dos organismos vivos para mantê-los funcionando. Ou seja: é a quantidade de calorias que o corpo queima para se manter ativo. A velocidade na

qual o corpo queima essas calorias é chamada de “taxa metabólica”, que é determinada basicamente por fatores genéticos. Metabolismo lento significa que o organismo reserva as gorduras e vai queimando-as aos poucos, o que resulta em dificuldade para emagrecer. Já um metabolismo rápido, comum a poucas pessoas, resulta em melhor aproveitamento energético das substâncias ingeridas, o que ocasiona facilidade para emagrecer, ou até mesmo uma dificuldade em manter-se com o peso ideal.

A importância de se determinar cádmio e cromo em suplementos alimentares decorre justamente pelo consumo de pessoas, em sua maioria praticante de atividades físicas, muitas vezes sem saber de fato o que estão ingerindo e as consequências que isso pode trazer ao organismo [10].

Neste trabalho, a determinação dos metais cádmio e cromo em suplementos alimentares, mostra de forma quantitativa os níveis traço desses elementos presentes nas amostras

2.3. TOXICIDADE DE CÁDMIO E CROMO EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Em 2011 foi publicado o regulamento técnico do MERCOSUL sobre os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Esse regulamento contempla os limites de Cd em carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, sendo iguais a 0,1 mg kg^{-1}. Quando se trata de amostras de fígado desses animais, os limites são iguais a 0,5 mg kg^{-1} para Cd , já que se trata de um órgão reconhecidamente acumulador de toxinas [11]. O cádmio está presente em todos os alimentos e bebidas, mas, encontra-se mais concentrado em mariscos, ostras e peixes de água salgada, alguns tipos de chá e na fumaça do cigarro. Outras fontes incluem pinturas, soldas, pigmentos, ripas galvanizadas, baterias, combustão dos automóveis, e em alguns suplementos naturais, como: dolomita e medula óssea (tutano). Aparentemente, não existe sistema que regule o metabolismo de absorção e excreção de cádmio. Uma das formas que o cádmio entre no nosso organismo é através dos pulmões quando presente na fumaça do cigarro ou em forma de pó oxidado. O cádmio inativa numeroso sistemas enzimáticos, por ligar-se aos grupos sulfidril das moléculas de proteína [12].

A toxicidade depende dos níveis orgânicos dos íons protetores zinco, cobre, ferro e cálcio, que pelas ausências podem causar doenças como: fibrose e edema pulmonar; enfisema pulmonar; doenças renais com proteinúria e glicosúria; hipertensão arterial sistêmica; diminuição da produção de anticorpos; anemia; diminuição da testosterona [12]. A concentração do metal nos rins é aproximadamente 10 mil vezes mais alta que a da corrente sanguínea (PROC. Nº 3254/13 PLL Nº 360/13/ EXPOSIÇÃO DE MOTIVOS em anexos).

O Programa para o Ambiente das Nações Unidas incluiu o cádmio em sua lista dos dez contaminantes mais perigosos. Plantas como a alface, a espinafre e o repolho absorvem facilmente o cádmio do solo. Também o pasto comido pelo gado é absorvido com facilidade, assim as pessoas acabam ingerindo cádmio através das saladas e da carne bovina consumidas [13]. O cádmio ainda se acumula no leite, ovos e carne, sendo que sua concentração nos tecidos é proporcional a sua ingestão [14].

Em decorrência de sua meia vida longa, é essencial que tomemos atitudes preventivas à exposição ao cádmio que é um metal pesado: uma adequada alimentação, baseada em alimentos orgânicos, com níveis suficientes de zinco, cobre, ferro, cálcio e selênio, mostra-se efetiva na diminuição da absorção deste metal pesado, já que o Cd ocupa sítio de ação das metalotioneínas, que, inicialmente deveriam ser ocupadas por minerais. Portanto, se os seus níveis estiverem adequados, a ligação do Cd a essas enzimas é impedida e com isso, sua excreção, facilitada [15].

O cádmio foi responsável por problemas renais em pacientes humanos, induzindo osteomalácia pela atrofia no túbulo proximal com alterações na reabsorção de fósforo [16].

A ANVISA (Agência Nacional De Vigilância Sanitária) determina o cádmio como contaminante em alguns alimentos de acordo com o Decreto nº 55.871, de 26 de Março de 1965. A comissão do CODEX ALIMENTARIUS (1995) [17] (anexos) definiu contaminantes como sendo qualquer substância adicionada involuntariamente ao alimento e que está presente nesse como resultado da produção.

Entre os elementos considerados tóxicos, alguns possuem atividades biológicas essenciais para o funcionamento do corpo humano. Entre estes

elementos está o cromo, sua forma iônica Cr (III) [18 e 19]. No entanto, se estes elementos ultrapassarem a faixa ótima de concentração, tornam-se tóxicos para o organismo. O intervalo entre carência e toxicidade dos elementos considerados essenciais, varia de elemento para elemento, dependendo da sua natureza e da função fisiológica que possuem no organismo [20].

O objetivo de se sugerir o cromo como componente do suplemento alimentar, voltado para o esportista, não decorre apenas da preocupação da ocorrência de deficiência do organismo, mas principalmente porque o cromo pode favorecer a via anabólica por meio do aumento da sensibilidade à insulina, que, por sua vez, estimula a captação de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese protéica, aumentando a resposta metabólica adaptativa decorrente do próprio treinamento. Isto pode acarretar em aumento do componente corporal magro devido ao ganho de massa muscular. Ainda existe a especulação de um efeito lipolítico causado pelo cromo, porém os resultados de estudos em humanos ainda são controversos. Por outro lado, a suplementação de cromo pode auxiliar no controle da glicemia de indivíduos diabéticos engajados em atividade física [21-27]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) [28], por outro lado, não estabelece um valor seguro exato para a ingestão de cromo, mas relata que dosagens de 125 a 200 µg/dia além da dieta habitual podem favorecer o controle glicêmico e melhorar o perfil lipídico.

O cromo é encontrado em baixas concentrações em vegetais frescos, frutas, carnes e grãos, contudo métodos de processamento, armazenagem e preparação podem alterar tanto a forma química quanto as concentrações deste elemento. Alimentos em meio ácido podem apresentar altos níveis de cromo quando em contato com materiais de aço inoxidável. Os vegetais frescos, por exemplo, apresenta de 30 a 140 µg kg^{-1} de cromo, enquanto algumas amostras enlatadas podem conter até 230 µg Kg^{-1}; frutas frescas apresentam de 90 a 190 µg Kg^{-1} de cromo e frutas enlatadas podem chegar até 510µg. Kg^{-1} [29].

Em seres humanos, a espécie trivalente atua como um nutriente essencial. O Cr (III) potencializa a ação da insulina desempenhando, assim, um papel importante no metabolismo de compostos como a glicose, proteínas e gorduras. Um complexo formado entre o Cr (III) e o ácido picolínico, o picolinato de cromo (III), tem sido usado como um suplemento alimentar devido às suas supostas propriedades antidiabéticas e como acelerador do metabolismo [30]. Também é atribuído ao

cromo um efeito lipolítico que, somado a seus possíveis efeitos anabólicos, estimula principalmente o público esportista ao uso do cromo como suplemento na dieta para obtenção de efeitos desejáveis sobre a composição corporal [22].

Segundo a RESOLUÇÃO 269, DE SETEMBRO DE 2015 da ANVISA [31], define valores para Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais para adultos, a **Tabela 15**, em anexos, mostra valores permitidos pela ANVISA para cromo e para outros elementos de 35 $\mu g.g^{-1}$ de cromo.

Porém, ainda não foi definido nenhum limite superior tolerável de ingestão (UL), ou seja, o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece nenhum efeito adverso à saúde em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou gênero [32].

Durante o exercício o cromo é mobilizado de seus estoques do organismo para aumentar a captação de glicose pela célula muscular, mas sua secreção é muito mais acentuada em presença de insulina. O aumento da concentração de glicose sanguínea induzida pela dieta estimula a secreção de insulina que, por sua vez, provoca maior liberação do metal. Ele em excesso no sangue não pode ser reabsorvido pelos rins, sendo, conseqüentemente, excretado na urina. É comum observar concentrações altas de cromo na urina após grande ingestão de carboidratos, principalmente na forma de açúcares [21].

O íon Cr (III) não é a forma mais tóxica encontrada, porém esta forma quando oxidado na forma de Cr (VI) é extremamente tóxica ao organismo quando ingerida em dosagens elevadas, segundo a OMS 0,05 $mg.K^{-1}$, pelo qual os graves problemas de intoxicação estão relacionados. Uma possível contra-indicação da ingestão de altas doses de Cr (III) para o organismo refere-se ao prejuízo no estado nutricional relativo ao ferro, devido ao fato de o cromo competir com o ferro pela ligação com a transferrina (proteína responsável pelo transporte de ferro recém absorvido) [32 e33].

2.4. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Alguns trabalhos foram feitos para a determinação de Cd (II), Cr (III) e de outros elementos em suplementos alimentares e em amostras sanguíneas de pessoas que utilizavam suplementos, utilizando técnicas espectroanalíticas. Referindo às necessidades e/ou toxicidade desses elementos para o ser humano.

DOLAN et al (2003) [34], determinaram as concentrações de Cd, Pb, As e Hg em uma variedade de suplementos alimentares com um ênfase sobre produtos à base de extratos de plantas, com limite de detecção 18, 25, 8,2 e 140 ng/L, respectivamente, através da Espectrometria de Massas Com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP- MS). A ingestão de arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo foram avaliados e os níveis estão dentro do que são considerados seguros e toleráveis descritos por várias organizações de saúde pública e nacional.

TUMIR, et al, (2009) [35], determinaram Pb, Cd, As, Hg, Cr, Ni e Zn em suplementos alimentares que contenham vitaminas e /ou minerais (14 amostras), erva e medicamentos à base de ervas (14 amostras), produtos à base de mel (1 amostra), e produtos de origem animal (1 amostra) através do G FAAS e vapor frio. Os valores encontrados não são considerados altos e não afetam a saúde humana.

Para a determinação de K, Na, Mg, Al, Ca, Mn, Fe, V, Cr, Co, Ni, Se, Cd, Hg e Pb, AVULA et al (2010) [36], utilizaram a técnica de ICP-MS na análise de amostras de suplementos dietéticos e plantas. O LD foi encontrado na faixa de de 0,005-1,09 ng / mL . Entre os elementos, K foi o mais abundante com 30,2 ng/mL , seguido por Na, Mg, Al, Ca, Mn, e Fe, enquanto que V, Cr, Co, Ni, Se, Cd, Hg, Pb e estavam presentes em baixas concentrações na maioria das amostras.

MELQUIADES, F.L et al (2010) [37], determinaram a sensibilidade de detecção na forma de óxidos mono elementares de Ca, Mn, Fe, Cu e Zn em suplementos vitamínicos e minerais através do sistema portátil de fluorescência de raio –X (PXRF). Fazendo a comparação dos resultados obtidos com os resultados descritos na embalagem. Então se constatou que os valores encontrados estão abaixo dos que estão no rótulo das amostras.

MORET.S et al (2011) [38], determinaram As, Cd, Hg e Pb em amostras de suplementos de creatina, por meio de ICP-MS. Apenas o mercúrio estava presente em quantidades detectáveis (em níveis mais baixos do que 1 mg / kg).

PATLAR et al (2010) [39], determinaram Co, B,Cd, Cr, Ni, Mn, S, Zn, Fe e K, utilizando a técnica de ICP OES em amostras de sangue de atletas praticantes de Taekendor, onde relata os efeitos de 6 semanas a administração de 300 mg / dia de vitamina E. Sete atletas do sexo masculino, pelos quais usavam suplementos vitamínicos.

KEATING et al (2011) [40], determinaram teores de chumbo em amostras de sangue de crianças nigerianas que ingeriram suplementos à base de cálcio, através do ICP OES. Os níveis de chumbo encontrados não foram considerados tóxicos.

No trabalho proposto por BOURGOIN et. al.[41] foram determinados Cd e Pb em suplementos de cálcio usando ICP-MS, F AAS, GF AAS e voltametria de redissolução anódica (ASV). Os valores de concentração obtidos pelas diferentes técnicas não apresentaram diferenças significativas. O LD para Cd foi 0,010, 0,024, 0,006 e 0,035 µg g^{-1} para ICP-MS, ASV, GF AAS e F AAS, respectivamente. Para chumbo o LD foi 0,010; 0,120; 0,120 e 0,5 µg g^{-1} para ICP-MS, ASV, GF AAS e F AAS, respectivamente.

SCELFO E FLEGAL (2000) [42], determinaram Cd em amostras de antiácidos e suplementos de cálcio empregando ICP-MS. O limite de quantificação obtido foi de 0,06 µg g^{-1}. Para o limite de detecção os valores encontrados foram baixos.

A **Tabela1** mostra maiores detalhes de trabalhos que foram realizados com diferentes técnicas para a determinação de Cd, Cr e outros metais em amostras de suplementos.

Tabela 1: Estudos utilizando diferentes técnicas para determinação de metais em suplementos alimentares.

Elementos	Tipo de suplementos	Técnica de determinação	Método de digestão das amostras	LD	Referência
As, Cd, Hg e Pb	Vitamina A,D e Cálcio	ICP-MS	Digestão por microondas	8,2; 18; 140; 25(ng/L)	[34]
Pb ,Cd, As ,Hg ,Ni ,Cr e Zn	Vitaminas e minerais	GF AAS	Digestão por microondas	____	[35]
Cd, Co, Cr, Se, Mn, Hg, Rb, Pb, Sr, Cu, Ni, Ba, As, V, Zn, Mg, Fe, Al, Na, Ca e K	Suplementos alimentares	ICP-MS	Digestão por microondas	0,005; 0,006; 0,007; 0,02; 0,08;0,011; 0,013;0,015;0,026; 0,028; 0,034; 0,038; 0,079; 0,0104; 0,30; 033; 0,34; 0,53; 0,78; 1,09 e 30,23 (µg/L)	[36]
Ca, Mn,Fe, Cu e Zn	Vitaminas e minerais	Fluorescência de Raio-X	Diluição em ácido bórico	_____	[37]
As, Cd, Hg e Pb	Creatina	ICP-MS	Digestão por microondas	Somente o Hg está dentro do Limite De detecção: 1,0 mg /Kg. Os demais elementos estão abaixo do LD	[38]
Co, B, Cd, Cr e	Suplementos	ICP-OES	_____	_____	[39]

Continuação da Tabela 1: Estudos utilizando diferentes técnicas para determinação de metais em suplementos alimentares.

Ni	alimentares				
Pb	Suplementos alimentares	Espectrofotômetro de UV/Vis e ICP-OES	_____	11,1 ± 7,8 µg/dL	[40]
Cd e Pb	Suplementos de cálcio	ICP-MS, ASV, GF AAS e F AAS		0,010; 0,024; 0,006 e 0,035; 0,010, 0,120, 0,120 e 0,5 (µg g^{-1})	[41]
Cd	Suplementos de cálcio	ICP-MS		----------	[42]

*Digestão com HCl e submetida ao refluxo.

A determinação de impurezas em diferentes etapas do processo de obtenção de produtos farmacêuticos é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final, bem como para prevenir riscos à saúde humana. Entre as impurezas que podem estar presentes nos fármacos estão os metais pesados, que podem ser introduzidos por diversas fontes durante o processo de fabricação dos medicamentos [43]. Elementos tais como o chumbo, cádmio e mercúrio apresentam toxicidade mesmo quando presentes em baixas concentrações [44].

2.5. DETERMINAÇÃO DE Cr (III) E Cd (II) POR F AAS UTILIZANDO O MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO POR EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM

A extração em ponto nuvem (EPN) tem sido utilizada para a pré-concentração de espécies de diferentes naturezas [45-47]. Este método se baseia na propriedade de soluções aquosas micelares de surfactantes tornarem-se turvas quando alteradas algumas condições, como temperatura, adição de sais [48]. Desta forma, a solução micelar aquosa separa-se em duas fases isotrópicas: uma fase rica em surfactante e de pequeno volume e uma fase pobre (aquosa). Qualquer componente que se liga ao agregado micelar em solução pode ser extraído da solução original, sendo assim concentrado no volume da fase rica [47].

Surfactantes são substâncias tensoativas formadas por moléculas anfifílicas, ou seja, que possui em sua estrutura duas regiões bem definidas: uma de caráter hidrofílico e outra de caráter hidrofóbico. A região polar dessas moléculas é usualmente conhecida como cabeça (hidrofílica) e a região apolar é denominada como cauda (hidrofóbicas) [48].

Os surfactantes são classificados segundo sua polaridade em: não iônicos (não apresentam cargas), iônicas ou anfóteros (com cargas positivas ou negativas na molécula) e zwitteriônicos. A característica oposta (cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica) em uma mesma molécula leva a um fenômeno de associação espontâneo, a partir de uma determinada concentração do tensoativo, que é conhecida como concentração micelar crítica (CMC) [49-51]. Acima dessa concentração são formados agregados conhecidos como micelas. Entre os surfactantes, o mais empregado é o octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114, um surfactante não iônico) devido ao seu baixo custo.

A CMC não é uma concentração única, mas sim uma estreita faixa de concentração acima da qua algumas propriedades são alteradas. A estrutura do surfactante (tamanho da cadeia hidrocarbônica) é um fator que a CMC depende [52]. A presença de eletrólitos pode interferir na formação das micelas, dependendo das características do eletrólito.

Dentre as vantagens da EPN pode-se citar que é um procedimento experimental relativamente fácil, de baixo custo, com bons fatores de pré-concentração e ecologicamente apropriados. Assim, a EPN visa o uso de métodos analíticos envolvendo substâncias não tóxicas e gera baixas quantidades de resíduos.

A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), é uma técnica comumente empregada para a detecção dos elementos investigados após a pré-concentração com uso da EPN.

A espectrometria de absorção atômica por chama é o mais utilizado de todos os métodos espectroanalíticos. É raro encontrar um laboratório de análise de rotina que não possua um espectrômetro de absorção atômica com chama. Sua popularidade decorre por características como simplicidade, robustez, seletividade, ampla faixa linear e baixo custo. Pode-se fazer uso de tal método diferentes formas de leitura direta ou pré-concentração.

Diante das vantagens do método de pré-concentração da EPN, este método foi utilizado para o desenvolvimento deste trabalho para obtenção de resultados satisfatórios na detecção dos íons metálicos Cd (II) e Cr (III) e amostras de suplementos alimentares.

A eficiência de nebulização da técnica do F AAS, pode aumentar com os surfactantes (raramente são tóxicos) durante a EPN. Cujas vantagens são a simplicidade, rapidez e eficiência na pré-concentração de íons metálicos em solução [51]. A quantidade de reagentes utilizados é pequena, o que reduz os custos e a quantidades de resíduos produzidos. As maiores dificuldades estão relacionadas à escolha do complexante mais adequado para reagir seletivamente com o elemento de interesse e ao controle de pH do meio.

O trabalho publicado por Chen e Teo,(2001) [52] descreve a determinação de Cd, Pb, Cu e Zn por F AAS em diversas amostras de água submetidas a EPN utilizando como agente complexante o 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) e Triton X-114 como surfactante.

No trabalho proposto por KELKÓLÉVAI, et al, (1999) [53], foram determinados Cd, Co, Ni e Pb em amostras de açúcares, sorbitol, manitol, paracetamol, amidopirina, hidrato de cloral.

CHUAN et. al, (2000) [54], desenvolveram uma metodologia para a determinação de Pb, Cd, As, Hg, Cu, Co e Mn em diversas plantas medicinais chinesas utilizando diferentes técnicas espectrométricas (espectrometria de absorção atômica com chama - F AAS; espectrometria de absorção atômica com forno de grafite - GF AAS; espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos - HG AAS; espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio - CV AAS).

MATOS et al, (2009) [55], utilizaram a extração em ponto nuvem, com intuito da especiação de cromo (Cr (III)/Cr (VI)), complexando o Cr (III) com o reagente PAN , em seguida fez-se a extração com Triton X-114 e determinação por F AAS. A concentração de Cr (VI) foi calculada pela diferença entre a concentração de Cr-total e de Cr (III). O método foi aplicado com sucesso para amostras de efluentes de indústria de couro.

SUSSULINE & ARRUDA (1980) [56], determinaram cromo em amostras de água por FAAS após EPN com 8-hidroxiquinolina como complexante e Triton X-114 como surfactante. Um limite de detecção de 0,21 $\mu g.L^{-1}$ foi obtido utilizando uma solução de 5% m/v de NaCl como agente de separação de fases.

PALEOLOGOS et al(2001) [57], aplicaram a EPN para a especiação redox de cromo em amostras de água por FAAS. Como agente complexante foi utilizado o APDC, e como surfactante o Triton X-114. Variando o pH e a temperatura de complexação e utilizando uma solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para eliminar as interferências de alguns concomitantes,geralmente o Fe (III), que competem com o cromo na reação com APDC, foi possível a determinação de Cr (III) e Cr (VI) pela diferença entre o teor de cromo total e Cr (VI) determinados pelo método.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver um método de extração e pré-concentração empregando o ponto nuvem para determinação de Cd (II) e Cr (III), em suplementos alimentares, através da espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).

- **3.2. Específicos**
- Otimizar as condições (pH da solução, concentração do reagente complexante PAN , temperatura do banho-maria, tempo de centrifuga e tempo de resfriamento) do método de extração em ponto nuvem;
- Validar a metodologia desenvolvida através da obtenção de suas figuras de mérito como limite de detecção, precisão, exatidão e robustez;
- Aplicar o método desenvolvido para determinação de Cd (II) e Cr (III) em amostras de suplementos alimentares.

4.PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Equipamentos e materiais utilizados

- Espectrômetro de absorção atômica com chama ar/acetileno, da marca PERKIN ELMER, modelo Analyst 200;
- Chama: gás oxidante ar;
- Fontes de radiação foram usadas lâmpadas de cátodo oco de cádmio e cromo, cujos comprimentos de onda (λ) são 288,8 nm e 357,9 nm, respectivamente;
- Slit (fenda): 2,7/0,8 nm;
- Fluxo de gás oxidante (L/min.): 10,00;
- Fluxo do gás acetileno (L/min.): 3,30;
- Balança analítica SARTORIUS, modelo BL D105;
- Centrífuga BioEng, modelo BE 5000;
- Tubos de 10 mL para centrífuga;
- Micropipetas;
- Estufa EuroBras;
- Geladeira Consul Slim 170
- Medidor de pH digital QUIMIS;
- Equipamento para banho Maria Soc Fabel Ltda, modelo 110;
- Sistema para purificação de água QUIMIS, São Paulo, Brasil;

4.2. Reagentes e soluções

4.2.1. Soluções de Cd (II) e Cr (III)

- As soluções de cádmio foram preparadas diariamente a partir de uma solução estoque de 1.000 $\mu g.mL^{-1}$ e a partir desta diluiu-se para 25 $\mu g.L^{-1}$ de Cd (II) e 500 $\mu g.L^{-1}$ para o Cr (III).

4.2.2. Soluções-tampão

Para fazer a pré-concentração dos metais Cd (II) e Cr (III) variando os valores de pH com as soluções tampão acetato de sódio/ ácido acético de pH 3,8; 4,5; 5,0; 6,0, solução tampão borato de sódio de 7,5; 8,0 e 8,5 e solução tampão amoniacal preparado

a partir do sal anidro NH_4Cl e a solução de hidróxido de sódio, NaOH de pH 9,0; 9,5, 10 e 11, todos com na concentração 0,1 mol/L e o pH foi ajustado com as soluções de NaOH e HCl.

4.2.3. Soluções do reagente complexante PAN

A solução de do agente complexante PAN foi preparada a partir da pesagem de 0,0797664 g. Esta massa foi solubilizada em etanol P.A, e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, diluindo até obter as concentrações $6,4x10^{-2}$ para o Cr (III) e 1,28 x 10^{-2} mol.L^{-1} para o Cd (II).

4.2.4. Solução do surfactante Triton X-114 a 5%(v/v)

Preparou-se uma solução de Triton X-114 a 5%(v/v) a partir de uma solução de 100% e diluiu-se para 100 mL.

4.2.5. Solução do eletrólito KCl a 6% (m/v)

Preparou-se uma solução de KCl a 6%(m/v), para isso pesou-se 6,073 g do reagente sólido em um béquer, solubilizou-se e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, em seguida transferiu-se para um recipiente com o mesmo volume.

4.3. Amostras de suplementos alimentares

As amostras dos suplementos alimentares, BCAA e Termogênicos, foram adquiridos em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Jequié-BA.

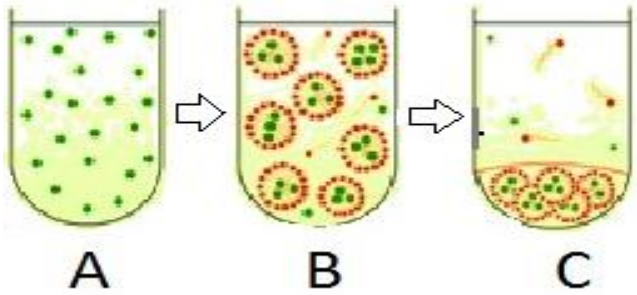
4.4. Preparo das amostras de suplementos alimentares

As amostras dos BCAA's e termogênicos, foram devidamente pesadas aproximadamente 0,1 g, em seguida adicionando 2 mL do ácido nítrico a 4,0 mol.L^{-1} e logo adicionando 0,5 mL de H_2O_2 em bombas de teflon. Passando por aquecimento na estufa por 4 horas na temperatura de 160º C. Ao serem retiradas da estufa, deixou-se esfriar à temperatura ambiente e depois ajustou-se o pH e fez-se a pré-concentração com as condições já otimizadas.

4.5. Procedimento para extração no ponto nuvem

Uma solução de 100 mL, contendo Cd (II) ou Cr (III) tendo seu pH ajustado para 8,5 e 9,5, respectivamente, foi retirada alíquotas em tubos com volume final de 10 mL. A esses tubos foi acrescentado 200 e 300 µL do reagente PAN, posteriormente 500 µL do surfactante Triton X-114 a 5% (v/v), e 500 e 700 µL do eletrólito KCl a 6% (m/v) para Cd (II) e Cr (III), em seguida, o tubo foi submetido ao banho-maria por 10 e 20 minutos respectivamente, logo após foi levado a centrifuga, A rotação utilizada pela centrifuga foi de 3500 rpm, por 10 minutos para o Cd(II) e 20 minutos para o Cr (III). O tubo foi levado ao sistema de refrigeração por 7 e 18 minutos para o Cd (II) e Cr (III), respectivamente. Em seguida, descartou-se a fase aquosa e a fase rica em surfactante foi adicionada com 700 µL de HNO_3 a 0,1 mol/L. Para realização dos brancos seguiram o mesmo procedimento já descrito acima. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. O procedimento da EPN é mostrado através do esquema na **Figura 3**.

Figura 3: Representação esquemática de uma extração em ponto nuvem convencional: (A) Solução original com o analito em baixa concentração, (B) Adição de surfactante na solução da amostra para a formação do meio micelar e captura do analito no núcleo hidrofóbico, (C) Separação da fase micelar após aquecimento e centrifugação [58].



4.6. Validação dos métodos analíticos

4.6.1. Faixa dinâmica linear

As faixas de estudo para a construção das curvas analíticas tiveram as seguintes concentrações: 0,0; 10; 15; 25; 40; 50; 75 e 100 µg g^{-1}, para Cd (II) e 0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600 e 700 µg g^{-1} para Cr (III).

As faixas dinâmicas lineares do método proposto obtiveram os seguintes valores: para o Cd (II) 2,33 a 100 µg g^{-1}com (R^2= 099901) e Cr (III) 10,85 a 700 µg g^{-1}, com (R^2=0,9993).

4.6.2. Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar e/ou detectar a quantidade mínima do analito.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com as equações 01 e 02 através do método baseado em parâmetros da curva analítica [57].

$$LD = 3{,}3 \times \frac{s}{S}$$ (Equação 01)

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$ (Equação 02)

Sendo s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e S das médias o coeficiente angular das curvas analíticas.

4.6.3. Precisão

A precisão do método proposto foi avaliada através da repetividade e da precisão intermediária. Para a repetitividade, 10 replicatas da amostra de suplemento foram analisadas pelo mesmo analista utilizando o mesmo procedimento e o mesmo equipamento no mesmo dia. Já para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram analisadas por diferentes analistas utilizando o mesmo procedimento (1º, 5º e 8º dia para o Cd, 1º, 3º e 9º dia para o Cr). Os resultados obtidos foram expressos como desvio padrão relativos.

RSD (%) ou CV(%)=$\frac{s}{\bar{x}} \times 100$ (Equação 03)

A estimativa do desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (RSD).

4.6.4. Exatidão

4.6.5. Adição e recuperação

A exatidão do método foi avaliada através da adição e recuperação de Cd e Cr em concentrações conhecidas nas amostras de suplementos. Com adição de 20, 40 e 60 µg/L para Cd (II) e 200, 400 e 600 µg/L de Cr (III).

4.6.6. Estudo de interferentes

As soluções utilizadas para teste de interferentes foram preparadas pela dissolução das soluções padrão dos íons interferentes em frascos de 100 mL cada com ácido nítrico 5% (v/v) e completadas com água desionizada. Onde foram adicionados às soluções de Cd (II) e Cr (III) a 25 µg/L e 500 µg/L, respectivamente. Variando as concentrações nas proporções de 1: 1 até 1: 10.000.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimizações para os metais Cd (II) e Cr (III)

5.1.1. Otimizações do pH

A influência do pH na complexação dos íons metálicos com o reagente PAN crítica em EPN. Geralmente os agentes complexantes são bases de Lewis (doam pares de elétrons) ou bases de Brönsted (recebem prótons), logo o pH controla a interação dos íons metálicos com o agente complexante. Assim otimização na EPN, o pH foi variado na faixa de 3,0 a 11, utilizando soluções-tampão acetato (3,0 - 6,0), borato (7,0 - 8,5) e amoniacal (9,0 - 11,0). A **Tabela 2**, mostra o resultado do efeito do pH na extração de Cd (II) e Cr (III) pelo qual se observou a formação da turbidez da solução.

Tabela 2: Estudo do pH para pré-concentração dos íons Cd (II) e Cr (III) na EPN na formação da turbidez com o uso do reagente PAN.

pH	Formação da turbidez Cr (III)	Formação da turbidez Cd (II)	
3,8	Não	Não	Tampão acetato
4,75	Não	Não	
5,0	Não	Não	
6,0	Não	Não	
7,0	Sim	Sim	Tampão borato
7,5	Sim	Sim	
8,0	Sim	Sim	
8,5	**Sim**	**Sim**	
9,0	**Sim**	**Sim**	Tampão amoniacal
9,5	**Sim**	**Sim**	
10,0	Sim	Sim	
11,0	Sim	-----	

Foram feitos testes, em triplicata, para encontrar o pH ideal para a pré-concentração dos íons Cd (II) Cr (III) na EPN. Com o intuito de estudar qual o melhor para a extração dos metais em ponto nuvem. O pH ótimo foi 8,5 e 9,5, nesses pH promoveram uma melhor extração do analito. Isso pode ser observados através das **Figuras 4 e 5** onde foram obtidas as extrações máximas dos analitos estudados. Escolheu-se 9,25 para Cr (III) porque assim garantiu uma máxima sensibilidade. Observa-se um decréscimo da extração em pHs abaixo de 9,0 e acima de 9,5.

Figura 4: Otimização do pH para a pré-concentração do íon Cd (II).

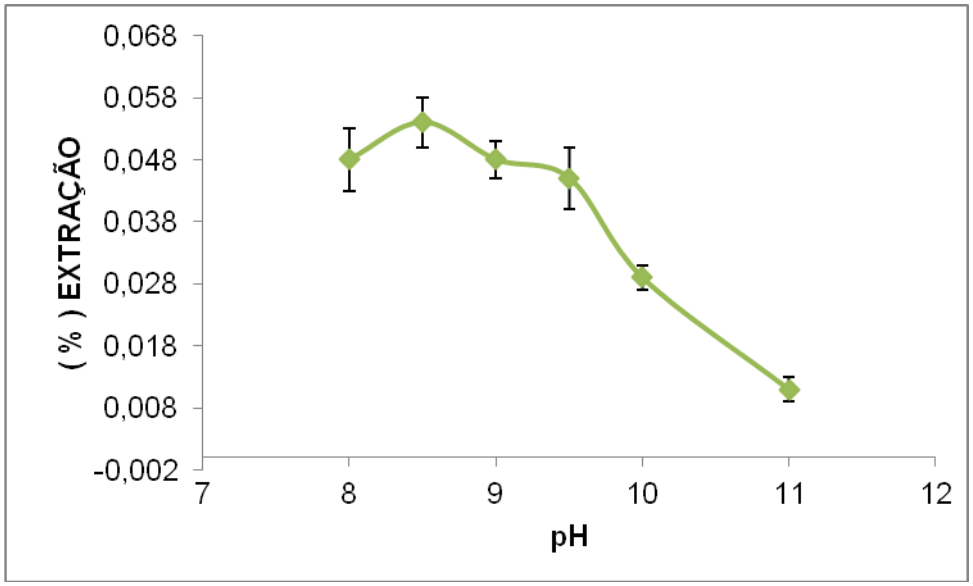
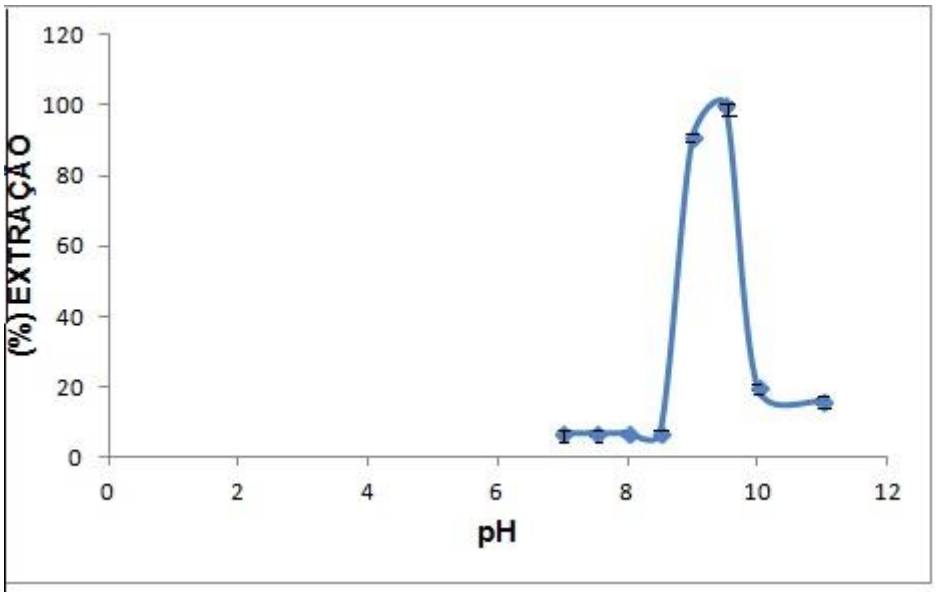


Figura 5: Otimização do pH para a pré-concentração do íon Cr (III)



5.1.2. Otimização da concentração do reagente complexante 1-(2-Piridilazo)-2-Naftol (PAN)

O reagente complexante 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), foi escolhido pela ampla faixa de pH entre 2,5 e 12 e complexa com muitos elementos, formando complexos coloridos onde muitos insolúveis em água. A otimização da concentração de PAN para extração de Cd (II) e Cr (III), é mostrada nas **Figuras 6 e 7**.

O estudo da quantidade do agente complexante na EPN para extração dos íons metálicos de interesse foi realizado variando-se a concentração do reagente complexante na faixa de $4{,}5x10^{-2}$ mol L^{-1} a $5{,}12\times10^{-1}$ mol L^{-1}. As maiores quantidades de metal extraídas foram observadas quando as concentrações do PAN foram de $6{,}4\times10^{-2}$ mol L^{-1} para Cd (II) e $1{,}28x10^{-1}$ mol L^{-1} para Cr (III).

Uma diminuição da extração foi observada quando utilizados valores superiores a $6{,}4\times10^{-2}$ mol L^{-1} e $1{,}28x10^{-1}$ mol L^{-1}. Este resultado pode ser explicado pela diminuição da solubilidade do agente complexante PAN. A solubilidade do PAN pode ser influenciada pelo pH, temperatura, e a concentração do sal utilizado. A esse efeito denomina-se *salting in*.

. Em quantidades menores, observa-se uma extração menor, pois não há uma concentração do agente complexante suficiente para complexar todos os íons metálicos em solução.

Figura 6: Otimização do complexante PAN para a pré-concentração do íon Cd (II).

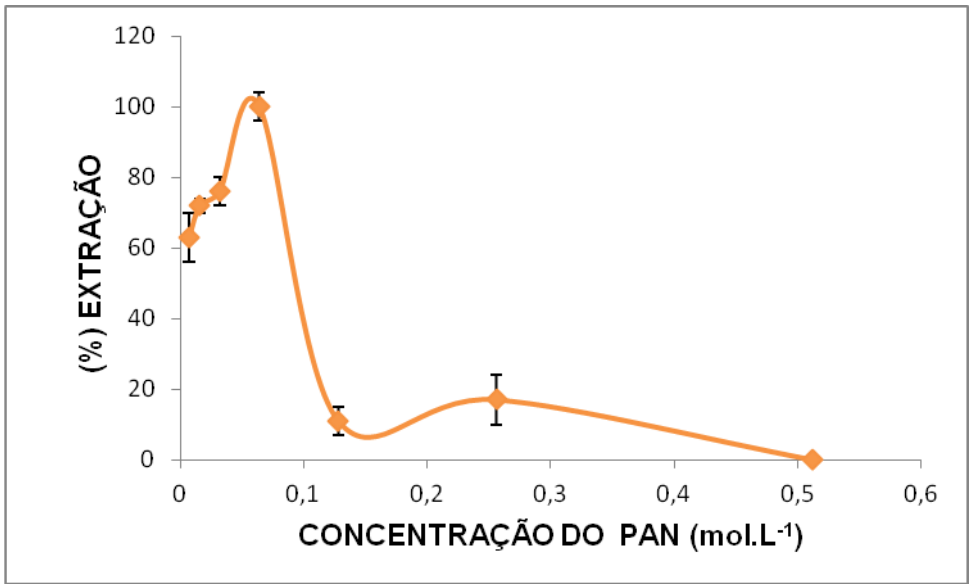
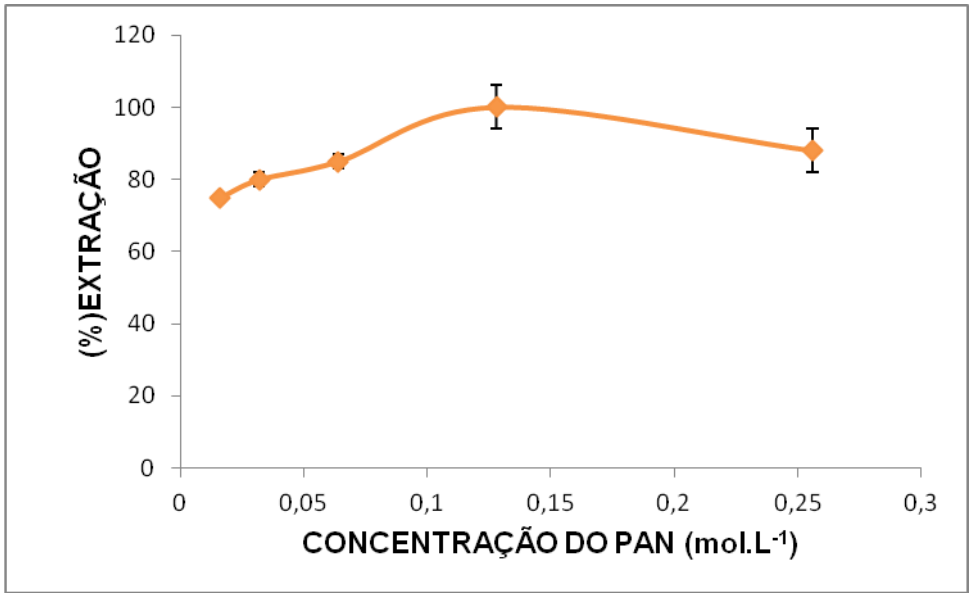


Figura 7: Otimização do complexante PAN para a pré-concentração do íon Cr (III).



5.1.3. Otimização do volume do reagente PAN

Para se estabelecer o volume ótimo para o volume do reagente complexante PAN para os íons Cd (II) e Cr (III) para melhor extração dessas espécies, foram

feitos testes em triplicata. Observou-se que (**Figuras 8 e 9**), foi o volume de 300 µL considerado o ótimo para ambos os íons. Pois, as melhores extrações foram referentes a esse volume. Volumes menores que 300 µL obtiveram extrações inferiores, isso devido ao fato de não conter quantidade de reagente suficiente para complexar os íons metálicos em solução. Para volumes maiores que o escolhido, a quantidade de reagente estava em excesso na solução e com isso estava adicionando álcool, causando maior solubilidade e como consequência aumentando a viscosidade (efeito *salting in*).

Figura 8: Otimização do volume do reagente PAN para a pré-concentração dos íons Cd (II).

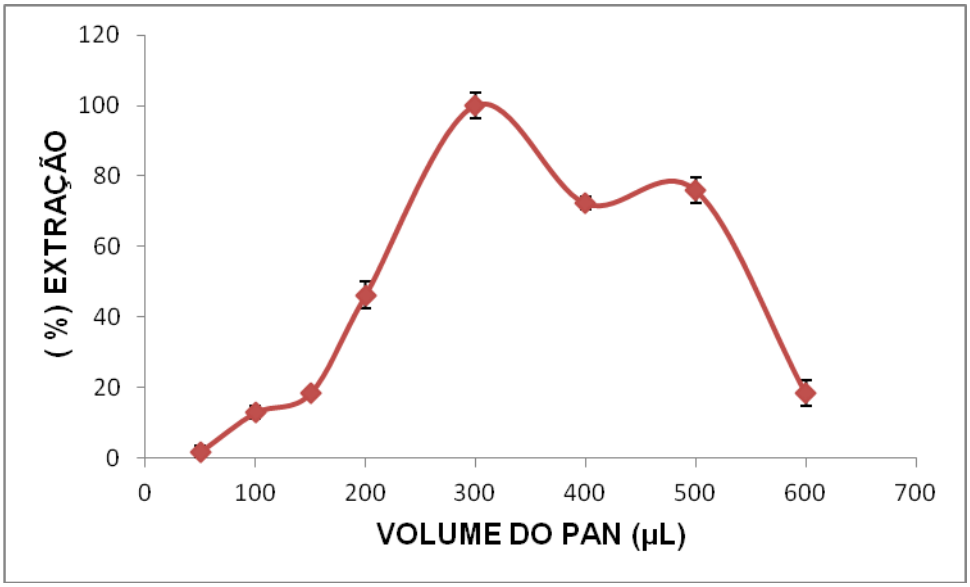
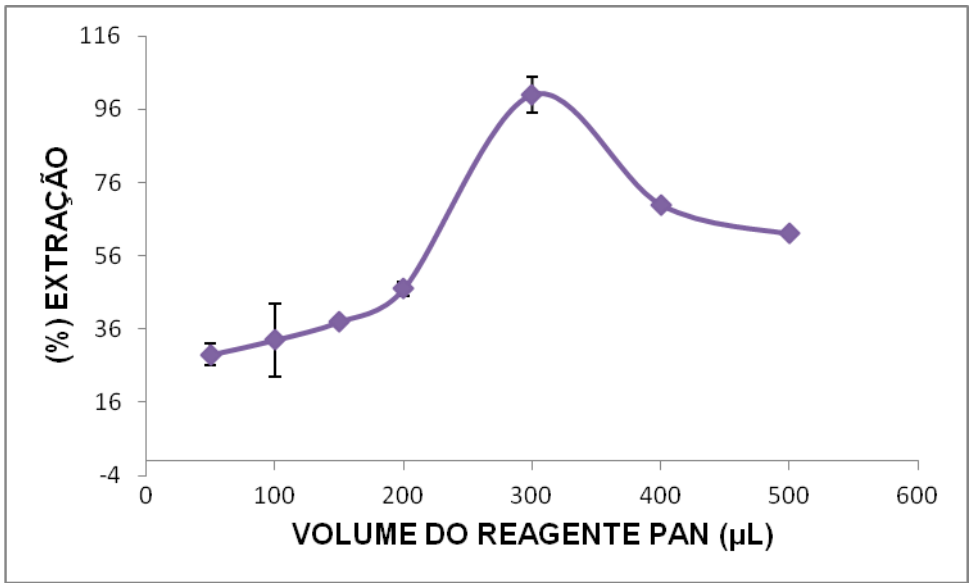


Figura 9: Otimização do volume do reagente PAN para a pré-concentração dos íons Cr (III).



5.1.4. Otimizações da temperatura e o tempo de banho-maria

Os procedimentos de extração no ponto nuvem que geralmente utilizam, Triton X-114 como surfactante, necessitam de uma etapa de aquecimento para atingirem o ponto nuvem, pelo qual é conduzido por banho-maria utilizando uma chapa de aquecimento, microondas doméstico ou ainda o próprio sistema de banho maria.

Os valores obtidos para a otimização da temperatura do banho-maria para o cádmio e cromo, foram estabelecidos através de testes e triplicata. Variando a temperatura de 0 a 120 ºC para ambos os metais. Os valores considerados ótimos foram de 35ºC para o Cd (II) e de 40ºC para o Cr (III), pois obtiveram as melhores extrações. Para temperaturas inferiores as percentagens de extração foram inferiores, pois não foram suficientes para se alcançar o ponto nuvem. Já as temperaturas maiores aumentam a formação das micelas e isso aumenta a viscosidade. Os valores otimizados são demonstrados nas **Figuras 10 e 11**.

Figura 10: Otimização da temperatura do banho-maria para Cd (II).

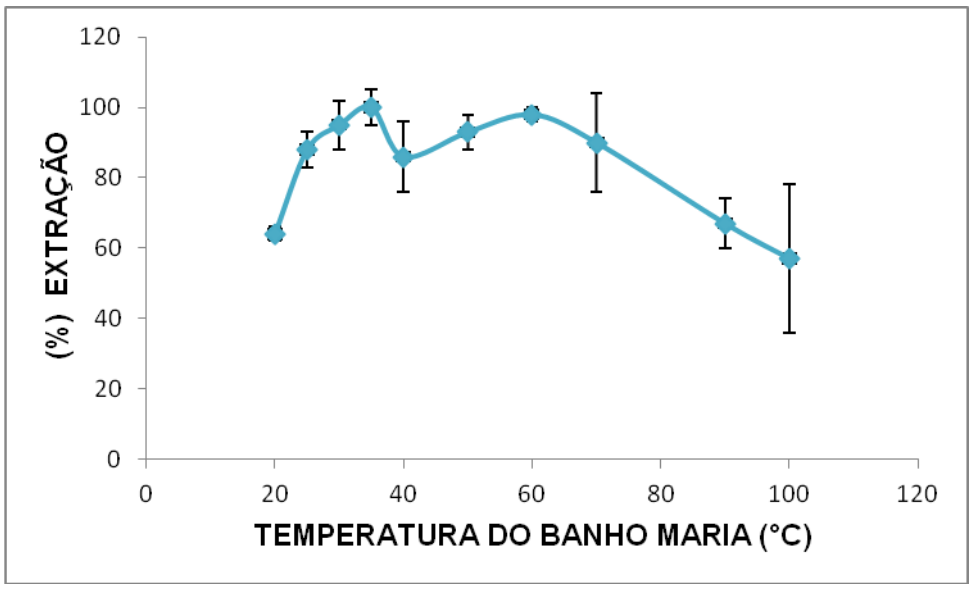
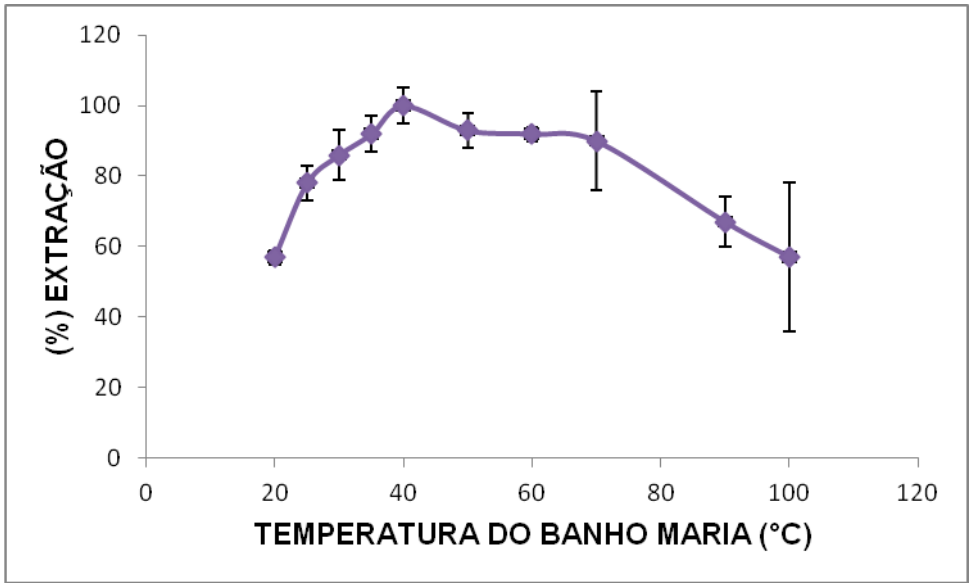


Figura 11: Otimização da temperatura do banho-maria para Cr (III).



Para o estudo do tempo do banho maria, foram estudados e os valores ótimos estudados para Cd (II) e Cr (III). Eles foram 10 e 20 minutos, respectivamente, pois apresentaram maiores extrações dos dois íons. Além disso, tempos mais elevados poderiam decompor as amostras com a elevação do tempo e da temperatura e consequentemente perder os analitos, além de aumentar a

temperatura do ponto nuvem, formando mais micelas e aumentando a viscosidade da solução. Tempos inferiores poderiam não ser suficientes para alcançarem o ponto-nuvem e obter as extrações necessárias. As **Figuras 12 e 13** mostram os valores já otimizados.

Figura 12: Otimização do tempo do banho maria para o Cd (II).

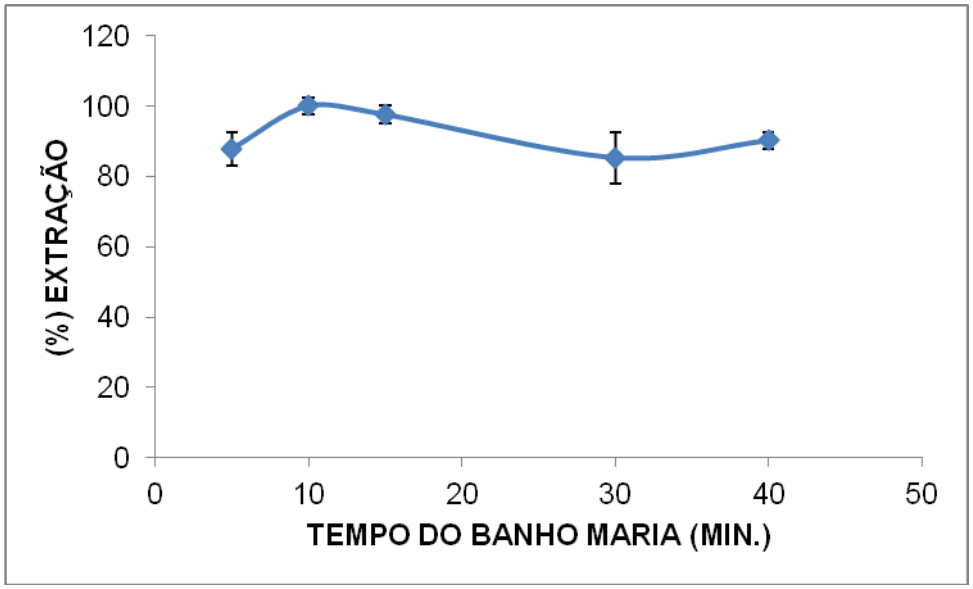
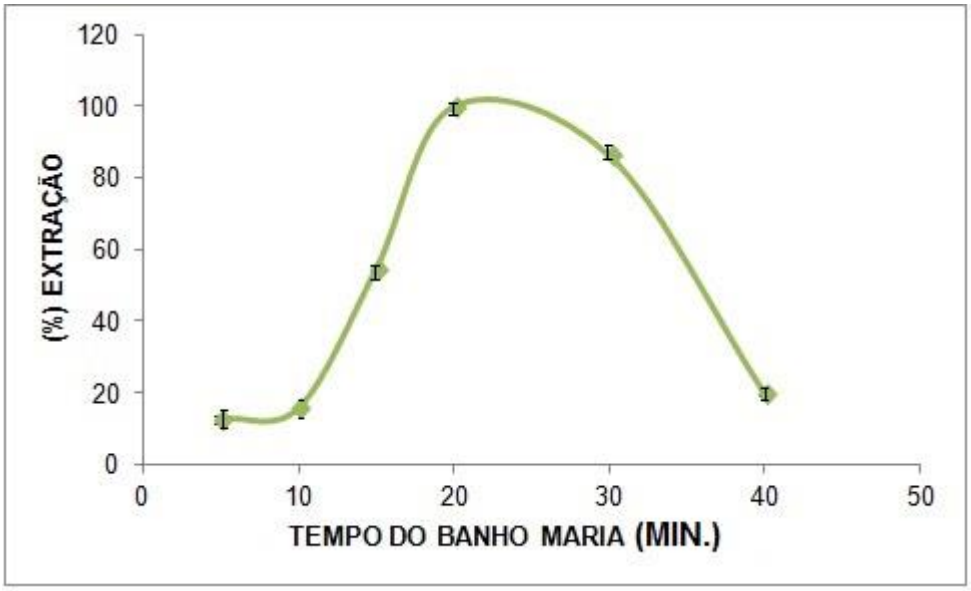


Figura 13: Otimização do tempo do banho maria para o Cr (III).



5.1.5. Estudo do tipo e do volume de eletrólito

A adição de eletrólitos à solução pode interferir na formação das micelas, dependendo das características do eletrólito. Neste método de extração por ponto Nuvem a adição de eletrólito é muito importante, já que, sem em adição do eletrólito, a temperatura do sistema diminui e após a centrifugação, toda a solução volta a ser monofásica, onde o surfactante e o complexo metálico regressam para o meio aquoso, fazendo com que a eficiência da extração diminua [58]. O eletrólito pode interferir na formação das micelas, dependendo de suas características. Eletrólitos como cloretos, sulfatos e carbonatos possuem efeito *salting-out*, o que faz reduzir a temperatura do ponto nuvem, consequentemente facilitando o processo de separação de fases. Testes com eletrólitos foram feitos para observar qual agiu como agente separador de fases. Assim foram o KCl, NaCl, Na_2SO_4 e sem adição de sal, todos realizados em triplicata.

Para ambos os metais o melhor eletrólito estudado foi o KCl,pois apresentou melhores, pois os demais sais não aumentaram a força iônica o suficiente para que haja separação de fases. As **Figuras 14 e 15** mostram os resultados da otimização.

Figura 14: Otimização do estudo do eletrólito para o Cd (II).

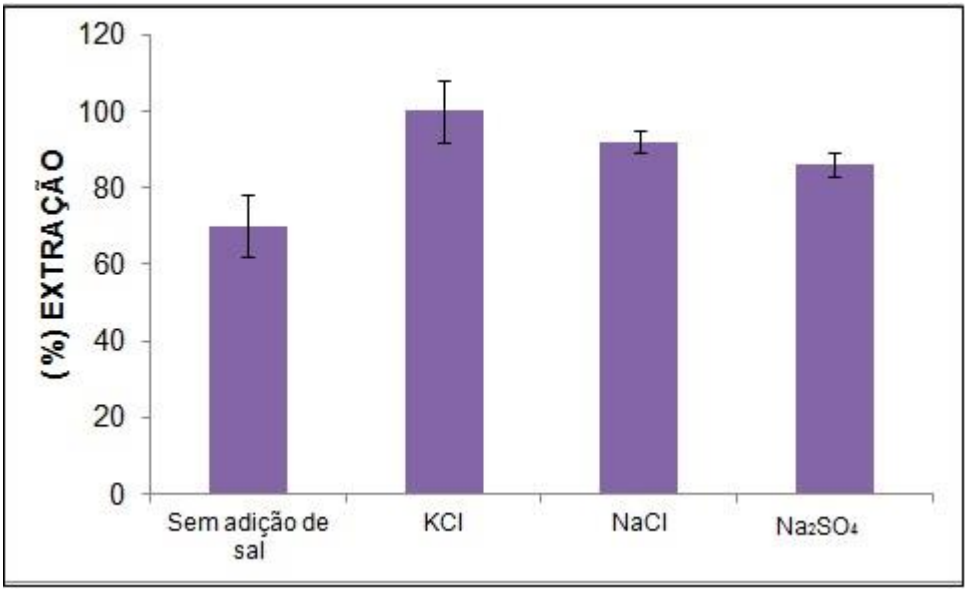
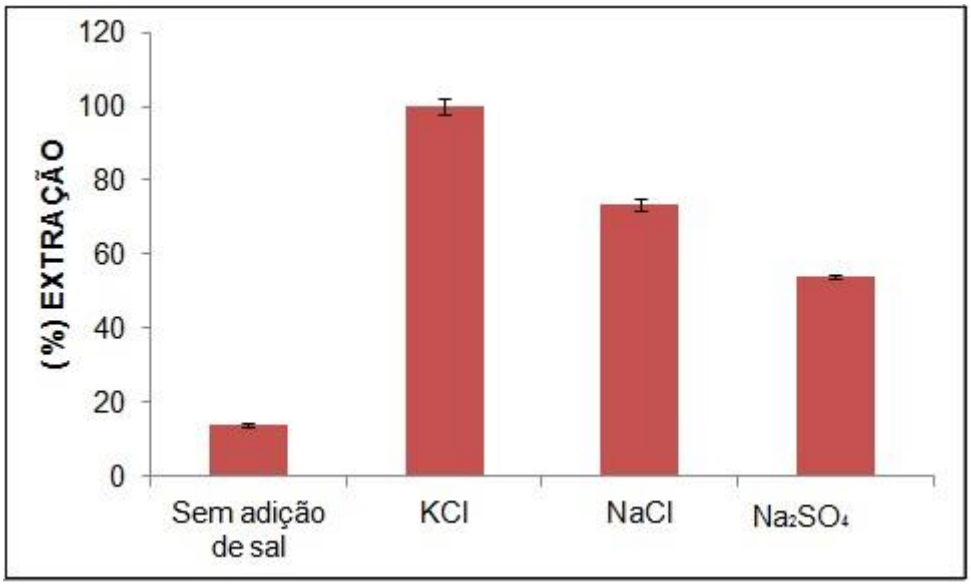


Figura 15: Otimização do estudo do eletrólito para o Cr (III).



O estudo do volume do eletrólito, foi feito variando os volumes de 100 a 1000 µL na concentração do KCl a 6 % (m/v) para os metais Cd (II) e Cr (III), este experimento foi feito em triplicata. As **Figuras 16 e 17** mostram que os volumes ótimos do eletrólito para o Cd (II) e Cr (III) foram 800 e 500 µL, respectivamente. Volumes maiores se observou a queda na extração devido ao aumento da viscosidade da solução, pois houve um excesso de eletrólitos na solução, aumentando a salinidade. Enquanto que volumes menores que o estabelecido não teve o mesmo efeito, pois não teriam força iônica suficiente para separar as fases e não ocorreria uma extração eficiente.

Figura 16: Otimização do volume do eletrólito para o Cd (II).

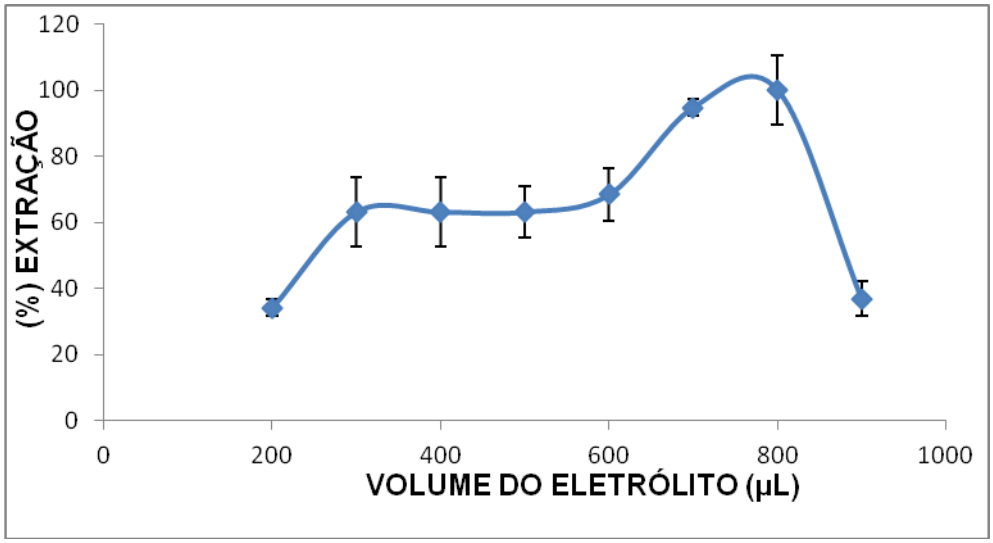
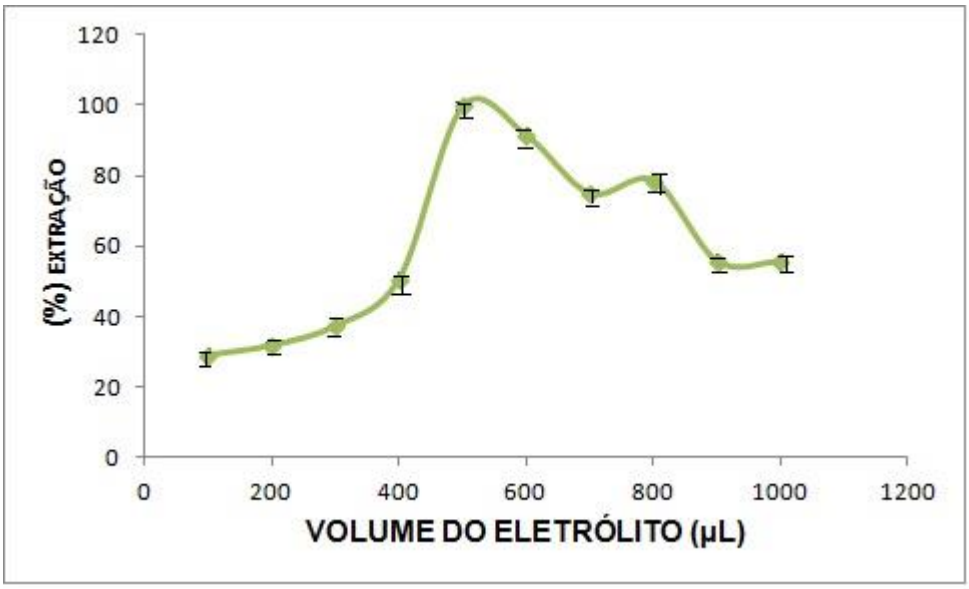


Figura 17: Otimização do estudo do volume do eletrólito para o Cr (III).

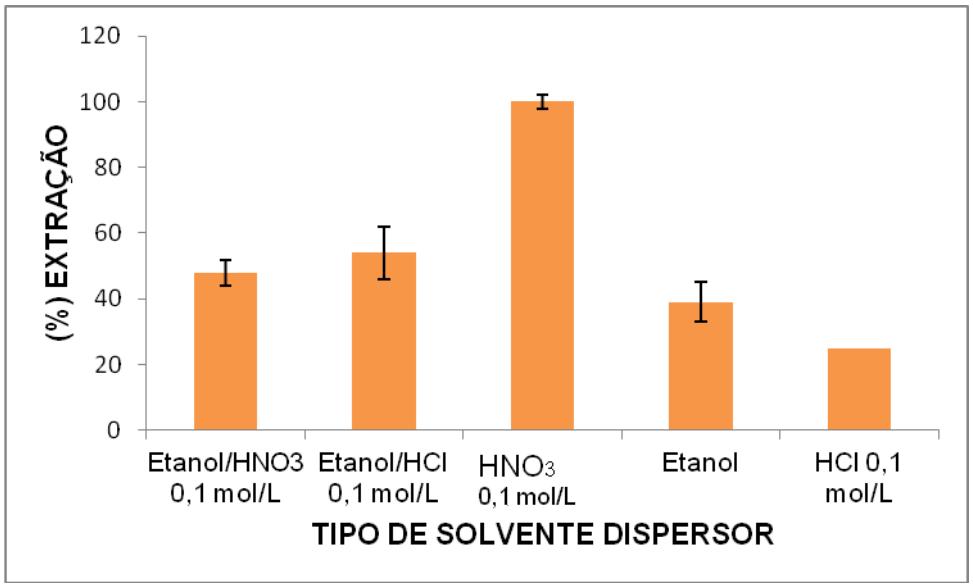


5.1.6. Estudo do tipo e volume do solvente dispersor

Foram escolhidos cinco tipos de soluções dispersivas, para o teste para ambos os metais, Etanol/HNO_3 0,1 mol/L, Etanol/HCl 0,1 mol/L, HNO_3 0,1mol/L, Etanol e HCl 0,1 mol/L. A **Figura 18** mostra que o melhor solvente dispersor para diminuir a viscosidade foi o HNO_3 0,1mol/L para Cd (II) e Cr (III), pois apresentou melhores extrações dos íons metálicos. A utilização do HNO_3 como solvente dispersor, favoreceu a dissolução e reduziu o efeito negativo, ou seja, a viscosidade, homogeneizando a solução para fazer a leitura no equipamento, pois caso houvesse

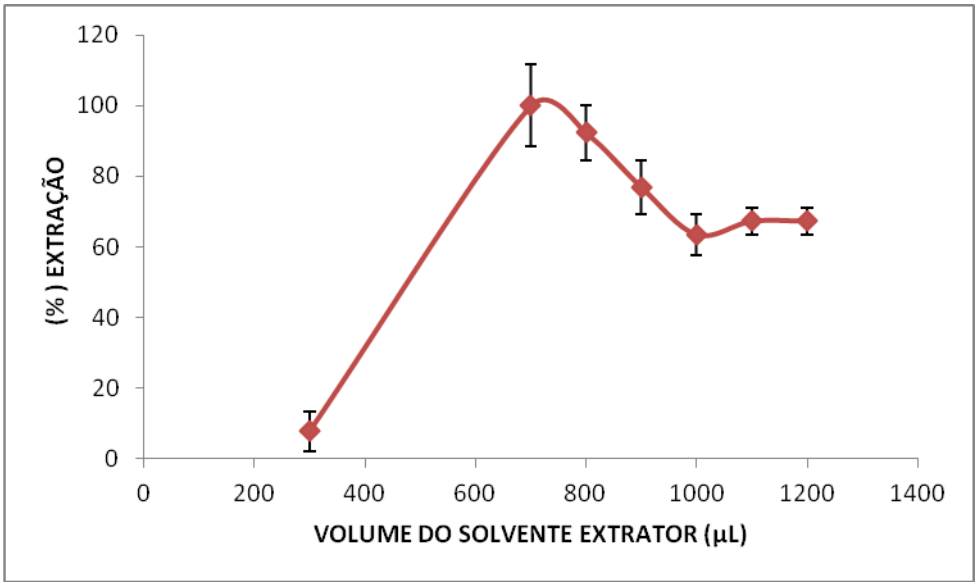
resíduos sólidos poderia comprometer o sistema de nebulização do equipamento entupindo os capilares e o próprio sistema.

Figura 18: Otimização do tipo do solvente dispersor para os metais Cd (II) e Cr (III).



O volume do solvente foi otimizado através de testes para os dois metais, onde se concluiu que o volume do solvente dispersor foi o mesmo para Cd (II) e Cr (III). O aumento da extração foi observada devido a dispersão da fase rica, o que favoreceu uma melhor dissolução. A queda da extração dos analitos se deu com o aumento do volume do solvente, dispersando ainda mais a fase rica, consequentemente aumentando a viscosidade. A **Figura 19** mostra o valor otimizado para 700 µL.

Figura 19: Otimização do volume do solvente dispersor para Cd (II) e Cr (III).



5.1.7. Otimização do tempo na centrifugação

O estudo do tempo de centrifugação foi importante para otimizar uma melhor separação das fases e determinação das espécies escolhidas. Os tempos estudados variaram de 5 a 30 minutos para ambos os metais. As **Figuras 20 e 21** mostram os estudos de otimização para os valores escolhidos para o Cd e o Cr, sendo 15 e 20 minutos, respectivamente. Tempos menores não proporcionaram uma separação tão eficaz quanto aos tempos ótimos. Um aumento no tempo de centrifugação não tem um efeito significante na extração do analito. Porém,

observou-se uma ligeira queda na extração, isso porque houve uma separação demasiada de fases, aumentando a viscosidade da solução.

Figura 20: Otimização do tempo de centrífugação para o Cd (II).

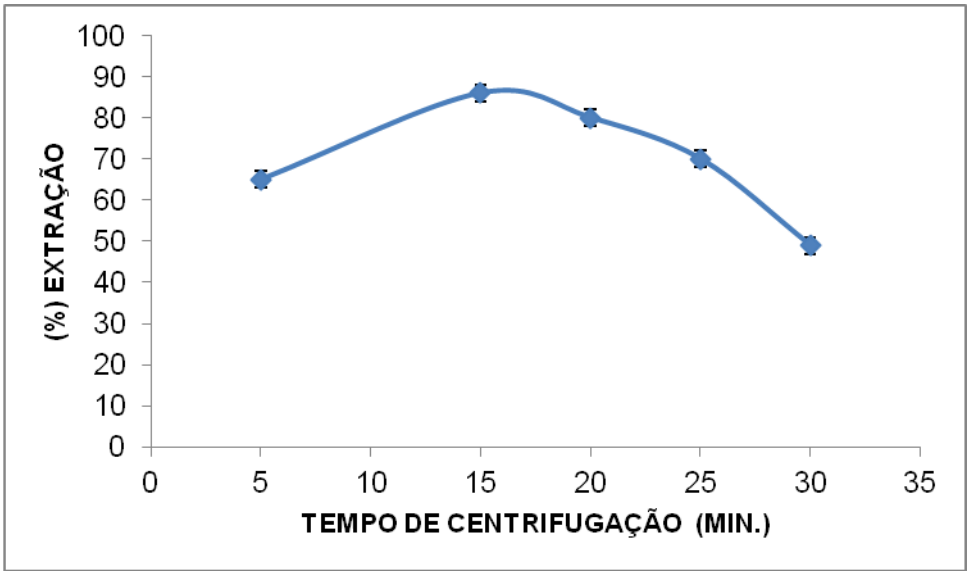
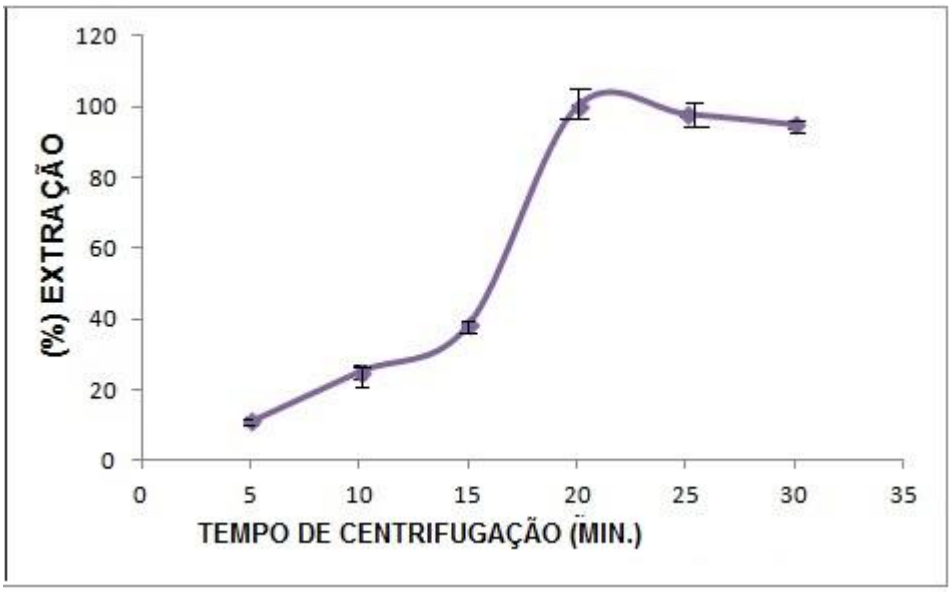


Figura 21: Otimização do tempo de centrífuga para o Cr (III).



5.1.8. Otimização do tempo de resfriamento

A separação física das fases segregadas é facilitada pela diferença de densidade entre ambas. O estudo do tempo de resfriamento variou de 0 a 40 minutos para Cd (II) e Cr (III). Mesmo o tempo 0, ou seja, que não foi submetido ao banho de resfriamento, para o Cd (II), as melhores extrações foram observadas no tempo de 3 minutos. Já para o Cr (III) o melhor tempo foi de 20 minutos. Onde os brancos também obtiveram o mesmo tratamento. Tanto para Cd quanto para Cr, se observou que as extrações caíram com o aumento do tempo em que as amostras foram submetidas ao banho de resfriamento, isso porque a medida que as amostras ficaram submersas no banho de resfriamento, a temperatura do ponto nuvem diminuiu e causou um aumento na viscosidade da solução. As **Figuras 22 e 23** mostram os resultados já obtidos.

Figura 22: Tempo de otimização de resfriamento da fase micelar do surfactante para o Cd (II).

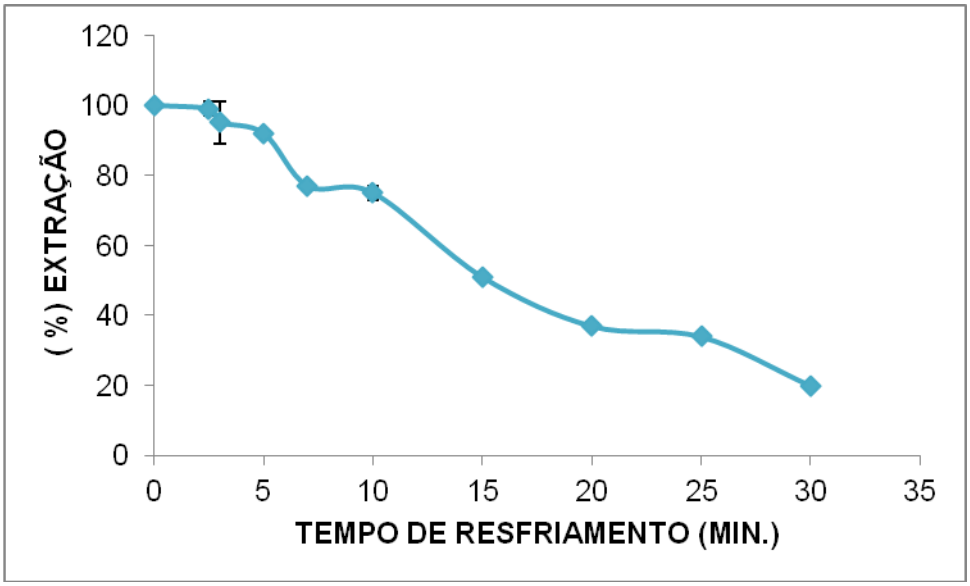
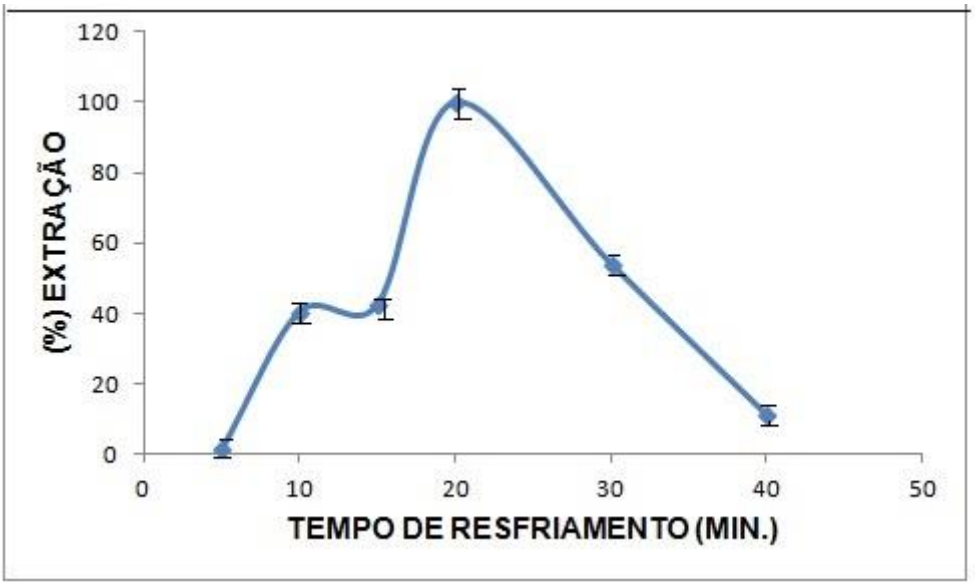


Figura 23: Tempo de otimização do resfriamento da fase micelar do surfactante para o Cr (III).



5.1.9. Otimização da concentração de HNO_3 para digestão das amostras

O processo de digestão das amostras deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de ácidos, permitir a dissolução de grande número de amostras e produzir resultados precisos e exatos, é importante a obtenção no preparo de amostras em menos tempo, podendo conter a mínima contaminação possível e baixa geração de resíduos [59 e 60].

A etapa mais crítica e que apresenta maior custo da análise é o preparo das amostras. Pois, consome aproximadamente 60 á 80% de todo o processo analítico, então, está tão vulnerável a 30% dos erros totais nos procedimentos [59, 61-63].

Com elevadas concentrações e grandes volumes do ácido, muitos são os problemas encontrados, como resíduos gerados pelos quais podem levar a danos ao meio ambiente. Assim, novas metodologias são desenvolvidas com o intuito de reduzir o volume e a concentração do ácido.

5.2. Digestão das amostras

Foram ajustados os pH's das amostras em aproximadamente 8,5 a 9,5 com soluções de NaOH com pH elevado e NaOH 0,5 mol.L^{-1} (padronizado) e HCl diluído. Posteriormente, foram adicionados os tampões borato e amoniacal, com pH entre 8,0 a 9,5 , para Cd (II) e Cr (III), respectivamente, sendo preparados para a pré-concentração.

Foram estudados parâmetros para a obtenção da melhor concentração do HNO_3 para a digestão das amostras, variando as temperaturas de digestão. A **Tabela 3** mostra os valores estudados.

Tabela 3: Parâmetros estudados para otimização da concentração do HNO_3 para digestão de amostras.

Concentração de HNO_3 a 110°C (mol.L^{-1})	**Avaliação da Digestão**	**Concentração de HNO_3 a 160°C (mol L^{-1})**	**Avaliação da Digestão**
3	Não houve digestão completa	3	Não houve digestão completa
4	Não houve digestão completa	4	Houve digestão completa
7	Não houve digestão completa	7	Houve digestão completa

O tempo definido e fixo para a digestão foi de 4 horas. Concluindo que a concentração de 7,0 molL^{-1} na temperatura de 160°C , apesar de digerirem completamente a amostra, agridem demasiadamente o meio ambiente, pois diminui o pH, causando estragos na natureza. Além da maior acidez residual e há um maior gasto de solução. Sendo que a concentração de 4,0 mol L^{-1} obteve os melhores sinais analíticos, menores brancos analíticos e com menor gasto de solução e menores agressões ao meio ambiente.

5.3. Volume da solução tampão

Para a otimização da quantidade do tampão adicionada na amostra foi estudada, para o Cd (II) tampão borato com pH 8,5 e para o Cr (III) 9,25, ambos com concentração de 0,1 mol/L. Variou-se os volumes de 5 a 25 mL em um balão de 100 mL do qual se retirou alíquotas e as transferiu para o tubo cujo volume final foi de 10 mL, sendo em triplicata o procedimento, para estudar qual o volume capaz de tamponar o meio para formar complexos dos metais. O melhor valor encontrado foi o de 20 mL para ambos os metais, pois obteve as melhores extrações dos analitos. Volumes menores não obtiveram boas extrações, devido a uma pequena quantidade da solução tampão presente. Já volumes maiores ficaram em excesso e as quantidades do agente ligante não foram suficientes para complexar os íons, o que causou uma queda nas extrações do íon Cr (III). Os resultados estão expressos nas **Figuras 24 e 25.**

Figura 24: Otimização do volume adicionado do tampão borato para o Cd (II).

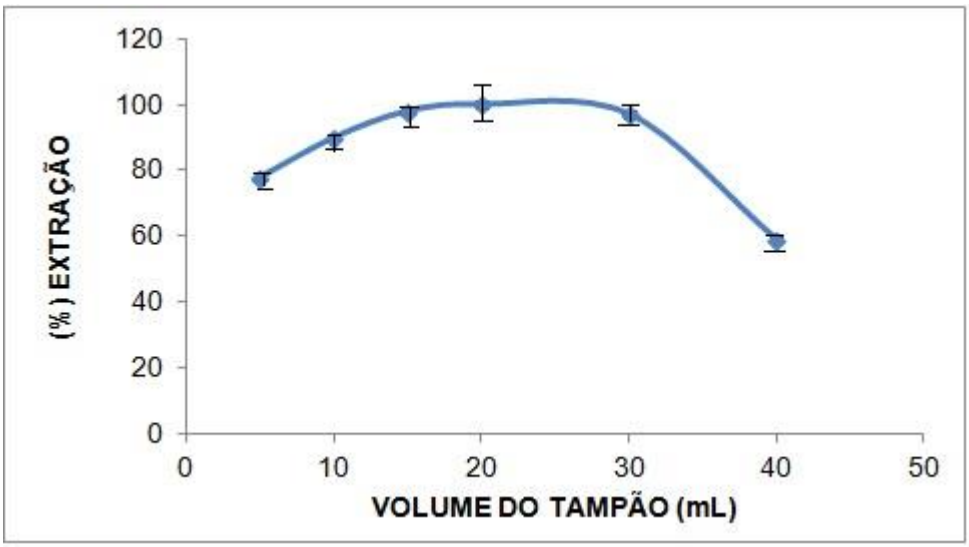
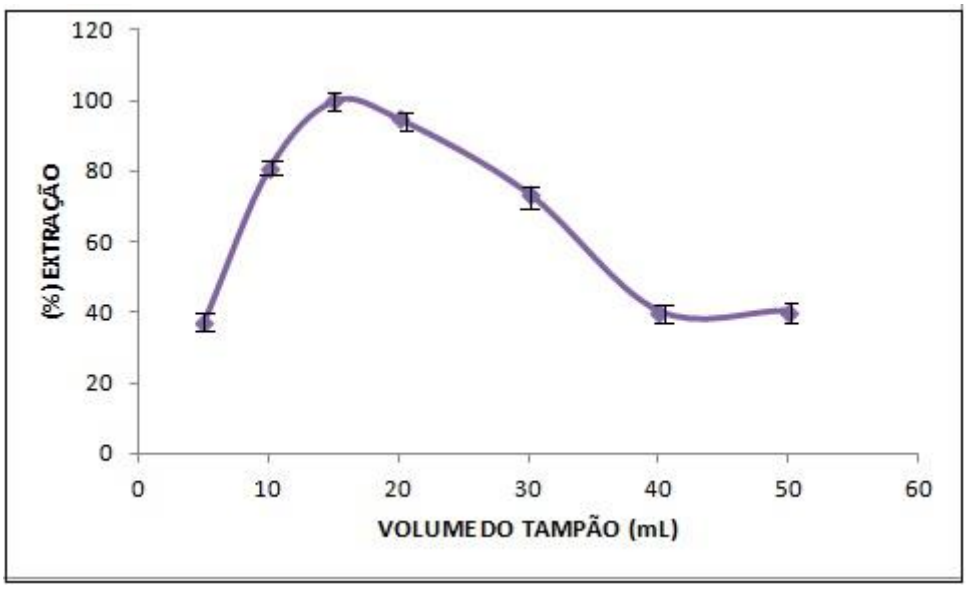


Figura 25: Otimização do volume adicionado do tampão amoniacal para o Cr (III).



6. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS E DETERMINAÇÃO DE Cd (II) E Cr (III) NAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A ANVISA determina que os níveis de metais pesados como Cd (II) e Cr (III) devem ser mantidos no limite ou abaixo do determinado. Segundo o Informe Técnico n. 64, de 02 de dezembro de 2014 (em anexo), pelo qual fala sobre esclarecimentos sobre o uso de minerais quelatos em alimentos. Onde diz que: “Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [64] tem recebido diversas denúncias acerca da comercialização de produtos contendo determinados minerais quelatos, especialmente em suplementos minerais e vitamínicos.”

As condições de comparações são feitas pelo Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) [65].

Através do método desenvolvido neste trabalho, foi possível determinar Cd(II) e Cr(III) nas amostras de suplementos alimentares. Os resultados da pesquisa estão disponíveis na **Tabela 4** com as características analíticas.

Tabela 4: Características Analíticas do Método Proposto para o Cd (II) e Cr (III).

Características	**Cd (II)**	**Cr (III)**
Faixa dinâmica linear	0,233 a 10,0µg. g^{-1}	1,08 a 7,0 µg. g^{-1}
Limite de Detecção (LD)	0,08 µg.g^{-1}	0,361 µg.g^{-1}
Limite de Quantificação (LQ)	0,233 µg.g^{-1}	1,08 µg.g^{-1}
Fator de Enriquecimento (EF)	17	22
Índice de Consumo (IC)	0,60 mL	0,50 mL
Equação de Calibração	Y=0,002040x + 0,000719	Y=0,0002x + 0,0009
Linearidade (coeficiente de determinação)	R^2= 0,99901	R^2= 0,9993

As faixas lineares do método proposto foram avaliadas de acordo com a preparação das curvas analíticas na faixa de 0 a 10,0 µg g^{-1}para o Cd (II) e 0 a 7,0

µg.g^{-1} para o Cr (III). Foram escolhidas as faixas de linearidade diferentes para os dois metais devido a sensibilidade do equipamento do F AAS, onde não mostrou muito sensível ao Cr (II), tendo assim uma concentração maior que a do Cd (II).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a determinação de Cd (II) e Cr (III) em amostras de suplementos alimentares foram calculados com os parâmetros citados Na sessão **4.6.2**.

7. Precisão

Neste trabalho, foi utilizado o cálculo do desvio padrão relativo (RSD) para avaliar a repetitividade e a precisão intermediária. Onde sua expressão é dada na Equação 3 do item **4.6.3.**

7.1. Repetitividade

Para estabelecer o critério de validação deste trabalho, utilizou-se o desvio do padrão relativo (RSD), menor ou igual a 15%, que está de acordo com o pré-estabelecido pelo Guia da ANVISA, para quantificação em métodos bioanalíticos [66]. Avaliando os resultados para repetividade verificou-se que os resultados estão abaixo de 15%, confirmando ser um método repetitivo.

O analista fez o procedimento, como descrito na sessão **4.5**, de repetitividade em um único dia, repetindo 10 vezes, realizando o mesmo método de pré-concentração utilizando as concentrações de 25 µg/L para Cd (II) e 500 µg/L para Cr (III) (**Tabela 5)**.

Tabela 5: Coeficiente de variação da repetitividade do método para os metais Cd(II) e Cr(III).

Metal	RSD (%)
Cd (II)	1,32%
Cr (III)	0,79 %

7.2. Precisão Intermediária

A precisão intermediária das amostras foi avaliada em diferentes dias. Neste trabalho variou as condições de dois analistas, em dias diferentes. Os resultados de precisão intermediária estão apresentados nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 6: O RSD obtido para avaliação da precisão intermediária na determinação de Cd (II).

Amostras	Analistas	Dias	RSD (%)
1	1 2	1º	2,12 %
2	1 2	5º	2,43%

Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra [67]. Os resultados obtidos neste trabalho tiveram valores de RSD de 2,12 e 2,43 %, o método desenvolvido possui precisão intermediária adequada para determinação de Cd (II) em amostras de suplementos alimentares.

Tabela 7: O RSD obtido para avaliação da precisão intermediária na determinação de Cr (III).

Amostras	Analistas	Dias	RSD(%)
4	1 2	1º	0,86 %
7	1 2	6º	0,5 %
8	1 2	9º	1,0 %

Para a determinação do Cr (III) em amostras de suplementos, o método se mostrou também apresenta precisão intermediária adequada. Onde os valores de RSD Variaram de 0,5 a 1% ou seja, dentro dos parâmetros permitidos.

8. ROBUSTEZ

A avaliação da robustez a 10% de modificação dos valores nominais do sistema de extração no ponto nuvem para determinação de cádmio e cromo em amostras de suplementos alimentares foi realizada através de um planejamento fatorial completo (2^3) e os resultados interpretados a partir do Gráfico de Pareto. O ponto central do planejamento foi corrido em triplicata pelo sistema para possibilitar uma estimativa do erro e para verificar se as modificações causam curvatura no modelo. As **Tabelas 8 e 9** apresentam as variáveis experimentais e seus valores, obtidos através da variação de ± 10% em torno dos valores críticos. Os resultados obtidos foram tratados no programa STATISTICA 8.0 com nível de confiança a 95 % [68].

Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento para Cd (II).

Experimento	pH	Concentração PAN, mol/L	Temperatura (°C)	Absorbância
1	-1 (8,3)	-1(5,4 x10^{-2})	-1(35)	0,042
2	1 (8,7)	-1(5,4 x10^{-2})	-1(35)	0,055
3	-1 (8,3)	1(7,4 x10^{-2})	-1(35)	0,050
4	1 (8,7)	1 (7,4 x10^{-2})	-1(35)	0,057
5	-1 (8,3)	-1(5,4 x10^{-2})	1(45)	0,053
6	1 (8,7)	-1 (5,4 x10^{-2})	1(45)	0,050
7	-1 (8,3)	1(7,4 x10^{-2})	1(45)	0,056
8	1 (8,7)	1(7,4 x10^{-2})	1(45)	0,055
		Ponto Central		
9	0 (8,5)	0(6,4 x10^{-2})	0 (40)	0,054
10	0 (8,5)	0(6,4 x10^{-2})	0 (40)	0,051
11	0 (8,5)	0(6,4 x10^{-2})	0 (40)	0,052

Tabela 9: Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento para Cr (III).

Experimento	pH	Concentração PAN, mol/L	Temperatura (°C)	Absorbância
1	-1 (9,0)	-1(1,18 x10^{-1})	-1(35)	0,024
2	1 (9,5)	-1(1,18 x10^{-1})	-1(35)	0,028
3	-1 (9,0)	1(1,38 x10^{-1})	-1(35)	0,027
4	1 (9,5)	1(1,38 x10^{-1})	-1(35)	0,025
5	-1 (9,0)	-1(1,18 x10^{-1})	1(45)	0,026
6	1 (9,5)	-1(1,18 x10^{-1})	1(45)	0,018
7	-1 (9,0)	1(1,38 x10^{-1})	1(45)	0,023
8	1 (9,5)	1(1,38 x10^{-1})	1(45)	0,028
		Ponto Central		
9	0 (9,25)	0(1,28 x10^{-1})	0 (40)	0,033
10	0 (9,25)	0(1,28 x10^{-1})	0 (40)	0,035
11	0 (9,25)	0(1,28 x10^{-1})	0 (40)	0,034

Os diagramas de Pareto (**Figuras 26 e 27**) indicaram que as modificações a 10% realizadas no procedimento de pré-concentração de cádmio e cromo não apresentaram efeitos significativos para as variáveis pH, concentração de PAN, temperatura. Revelando, assim, que essas variáveis são robustas à percentagem estudada.

Figura 26 – Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando absorvância como variável dependente para Cd (II).

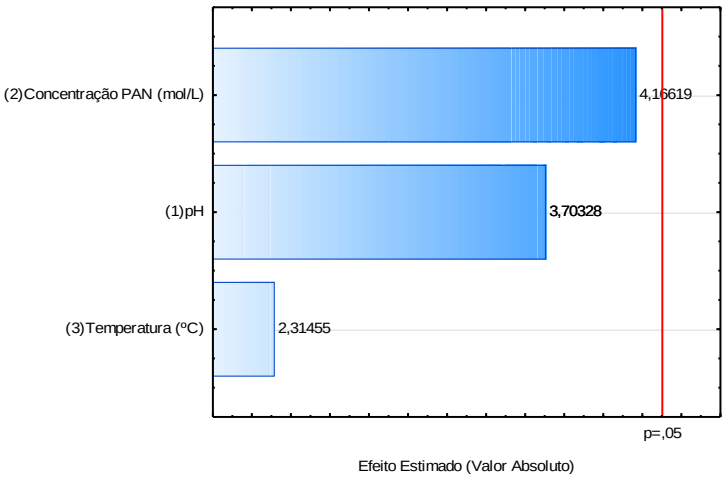
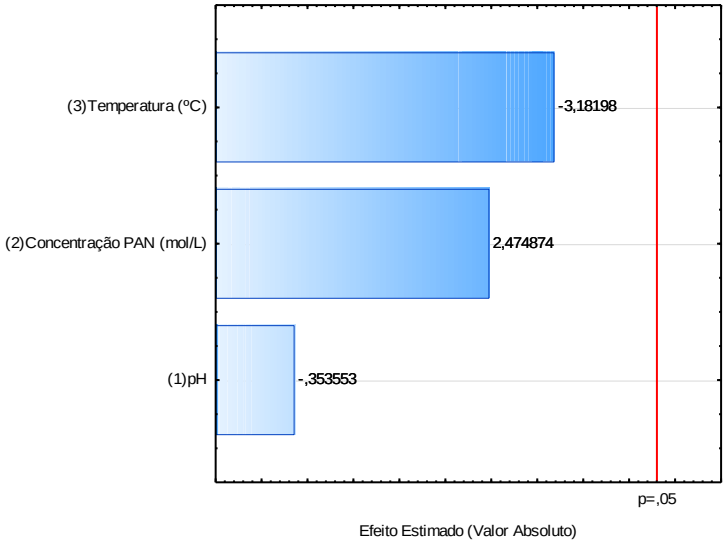


Figura 27– Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando absorvância como variável dependente para Cr (III).



9. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

A **Tabela 10** mostra os resultados das concentrações de Cd (II) e Cr (III) obtidos através da determinação do método proposto nas amostras de BCAA e termogênicos.

Os resultados encontrados de Cd (II) nas amostras estão abaixo do limite estabelecido pela Farmacopéia Européia, pela qual determina concentrações de 3,0 $\mu g.g^{-1}$ (**Tabela 14** anexos).

A resolução da ANVISA, RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 na ementa não oficial: O "REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE A INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) DE PROTEÍNA, VITAMINAS E MINERAIS" (em anexos), mostra os resultados obtidos através da determinação nas amostras com os valores pré-estabelecidos pela ANVISA. A **Figura 28**, em anexos, demonstra que em uma das marcas de termogênicos analisadas obteve-se o resultado que estava dentro dos valores de Cr (III) contidos na embalagem e dentro dos valores permitidos pelo regulamento acima citado, ou seja, 35 $\mu g\ g^{-1}$.

Tabela 10: Determinação de Cd (II) e Cr (III) nas amostras de suplementos alimentares, BCAA's e termogênicos.

Amostra	Concentração de Cd (II) ($\mu g\ g^{-1}$)	Concentração de Cr (III) ($\mu g\ g^{-1}$)
BCAA (1)	1,59 ± 0,20	2,02 ± 0,40
BCAA (2)	1,86 ± 0,01	1,69 ± 0,80
BCAA (3)	1,74 ± 0,10	4,25 ± 0,20
BCAA (4)	0,92 ± 0,60	3,72 ± 0,50
BCAA (5)	1,42 ± 0,10	2,09 ± 0,30
TERMOGÊNICO (1)	1,98 ± 0,10	26,95 ± 1,10
TERMOGÊNICO (2)	1,72 ± 0,10	35,35 ± 0,40
TERMOGÊNICO (3)	2,39 ± 0,10	21,91 ± 1,00
TERMOGÊNICO (4)	1,99 ± 0,04	30,17 ± 3,20

9.1. Exatidão

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão [67].

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio dos testes de adição e recuperação. A faixa de 77,2 a 108,2% para o Cd (II) [57].

9.2. Teste de Adição e Recuperação

Para avaliar a recuperação do método proposto, as amostras também foram analisadas com a adição de quantidades conhecidas de Cd (II) e Cr (III), adicionadas as amostras após as digestões, pois acarretaria em perdas significativas durante o processo de digestão, devido à volatilidade dos metais.

Esse teste foi feito adicionando nas amostras, concentrações conhecidas de cada analito e posterior a digestão. Concluiu-se que apenas para Cd (II) pode-se observar uma boa recuperação da adição do padrão, já para o Cr (III) não se

observou uma recuperação tão eficiente, onde não houve perdas do Cr (III) para a recuperação, obtendo assim valores muito altos de recuperação.

O cálculo do teste de recuperação é expresso através da seguinte equação:

$$R\% = ((C_1 - C_2)/C_3)\ x\ 100 \quad \text{(Equação 06)}$$

Sendo C_1 a concentração determinada da amostra com adição do analito, C_2 a concentração determinada da amostra que não foi acrescentada os padrões e C_3 a concentração conhecida dos padrões adicionados a amostra.

Nas **Tabelas 11 e 12,** resultados dos ensaios de adição e recuperação são expressos e concluídas neste trabalho. Pôde se observar que houve uma boa recuperação da adição do padrão para o cádmio, assim pode-se comprovar exatidão do método desenvolvido. Já para o Cr (III), os valores de recuperação estão muito altos.

Tabela 11: Resultados do ensaio de recuperação de Cd(II) nas amostras de suplementos, para os BCAA's (1 e 5) e termogênicos (2 e 5) para avaliar a exatidão do método.

Concentração (μg g^{-1})

Amostra	Adicionada	Encontrada	Recuperação (%)
BCAA (1)	0,0	1,69 ± 0,04	-----
	2,0	3,72 ± 0,24	100,8
	4,0	4,81 ± 0,72	90,5
	6,0	8,19 ± 0,05	108,2
	0,0	1,21 ± 0,02	----
BCAA (5)	4,0	5,46 ± 0,07	89,0
	6,0	7,96 ± 0,33	103,0
	0,0	2,39 ± 0,07	-----
TERMOGÊNICO	2,0	3,86 ± 0,04	77,2
(2)	4,0	5,74 ± 0,18	84,2
	6,0	7,43 ± 0,33	85,1
	0,0	1,93 ± 0,02	-----
TERMOGÊNICO	4,0	4,62 ± 0,78	98,1
(5)	6,0	8,05 ± 0,28	102,3

Tabela 12: Resultados do ensaio de recuperação de cromo nas amostras de suplementos, para os BCAA's (1, 3 e 4) e termogênicos (1, 2 e 4) para avaliar a exatidão do método.

	Concentração (µg/g)

Amostra	Adicionada	Encontrada	Recuperação (%)
BCAA (3)	0,0	1,57±0,02	-------
	20	5,15 ±0,12	509,0
	40	15,34±5,36	829,8
	60	22,20±0,94	971,4
BCAA (4)	0,0	3,74 ±0,27	-------
	20	19,66±13,31	1946,5
	40	20,96±0,70	1908,3
	60	20,49±0,65	1857,5
TERMOGÊNICO (1)	0,0	20,47±0,36	------
	20	38,70±0,58	3767,4
	40	40,49±0,35	3400,2
	60	47,03±0,15	3478,3
TERMOGÊNICO (4)	0,0	30,15±0,70	-----
	20	42,46±1,17	4094,1
	40	43,18±2,69	3713,7
	60	45,81±0,11	3682,9

9.3. Efeito de íons interferentes

Na etapa de pré-concentração podem ocorrer interferências como reações de um cátion interferente com o complexante, o que afeta somente a concentração do complexante, pois a etapa de detecção é seletiva, porém esta concentração pode ser aumentada. A técnica da extração no ponto nuvem reduz muitas interferências

de espécies iônicas presentes nas amostras, pois elas não são extraídas, ou o são em pequenas quantidades, na fase micelar [69].

Diversos estudos utilizando processos de separação e pré-concentração baseados na extração no ponto nuvem têm sido desenvolvidos. A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho das análises. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração desses elementos.

Para avaliar a tolerância do método para íons presentes nas amostras de suplementos alimentares, uma seleção de íons foram adicionados em várias concentrações em soluções, variando de 25 a 250.000 µg L^{-1} para o Cd (II) e de 500 a 5.000.000 µg L^{-1} para Cr (III). A determinação destes elementos foi realizada sob as condições otimizadas. O intuito de adicionar os íons foi para observar se causa interferência, quando ocorre interferência há uma variação significativa (± 10%) na percentagem de extração, comparando as soluções puras de Cd (II) a 25 µg L^{-1} e de Cr (III) 50 µg L^{-1}.

De acordo com a **Tabela 13**, as espécies Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{3+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Na^{+}, K^{+}, NO_3^{-}, NH_4^{+}, SO_4^{-}, IO_3-, Cl^{-}, NO_2^{-} são aquelas que interferem em menores concentrações no método aplicado. Possivelmente porque estes cátions e ânions ocupam sítios ativos, formando complexos com o reagente PAN, assim reduzindo a extração de Cd (II). Essas espécies competem com o Cd^{2+} na solução, saturando a mesma e provocando uma diminuição na quantidade de Cd (II) extraído. Enquanto que para o Cr (III) em concentrações abaixo de 5.000.000 µg L^{-1}.

Entretanto, estas quantidades de íons interferentes são relativamente elevadas se comparado às quantidades dos íons Cd (II) em solução.

Tabela 13: Efeito de vários íons que interferem na determinação de Cd (II) e Cr (III) usando o

Íon	**Quantidade tolerável (µg L^{1}) para Cd(II)**	**Quantidade tolerável (µg L^{-1}) para Cr(III)**
Pb (II)	2500	5.000.000
Cu (II)	250	5.000.000
Co (II)	250	5.000.000

Ni (II)	25.000	5.000.000
Mn (II)	250.000	5.000.000
Cr (III)	250.000	------
Cd (II)	------	5.000.000
Cr (VI)	250.000	5.000.000
Ca (II)	250	Acima de 5.000.000
NO_3^-	250	Acima de 5.000.000
Na^+	250	Acima de 5.000.000
NO_2^-	250	Acima de 5.000.000
Fe (III)	250	Acima de 5.000.000
NH_4^+	250	Acima de 5.000.000
SO_4^{-2}	250	Acima de 5.000.000
Ba (II)	250	Acima de 5.000.000
Cl^-	250	Acima de 5.000.000
Mg (II)	250	Acima de 5.000.000
Br^-	250	Acima de 5.000.000
K+	250	Acima de 5.000.000
IO_3^-	250	Acima de 5.000.000

10. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para a extração em ponto nuvem de Cd (II) e Cr (III) se mostrou eficiente, viável e econômico na determinação desses metais em amostras de suplementos alimentares. Além disso, o Triton x-114 pois apresenta baixa toxicidade, podendo trabalhar na bancada sem equipamentos de segurança e sem agredir o meio ambiente. As condições ótimas foram estabelecidas com êxito.

O reagente PAN mostrou-se uma excelente alternativa como complexante para extrair cádmio e cromo em amostras de suplementos alimentares, sendo de grande facilidade para a formação de quelatos estáveis e altamente hidrofóbicos.

A quantificação de cádmio e cromo com a EPN apresentaram boas características analíticas, apresentando suficientes para determinação desses metais nas amostras de suplementos.

Com o método desenvolvido foi possível determinar as concentrações de Cd (II) e Cr (III) nas amostras analisadas, e os resultados obtidos estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pelas regulamentações da Farmacopéia Européia e da ANVISA, onde os tipos de suplementos, BCAA e termogênicos, podem ser consumidos adequadamente com acompanhamento de um profissional de saúde.

A metodologia desenvolvida validou com sucesso as figuras de mérito de LQ, LD, IC, EF, precisão, robustez e exatidão. Onde a exatidão foi avaliada através do teste de adição e recuperação variando entre 77,2 à 108,5% para Cd (II) e de 509,0 a 4094,1 % para Cr (III). A precisão foi avaliada atreves da repetitividade e precisão intermediária, e o método se mostrou preciso para a determinação de Cd (II) e Cr (III) em amostras de suplementos, uma vez que os resultados estão dentro dos valores permitidos, ou seja, abaixo ou igual de 15%.

O método se mostrou eficiente para os interferentes, pois não modificaram significamente nas análises pretendidas para Cd (II) e Cr (III).

Os objetivos do trabalho foram alcançados, através de testes de otimizações de variáveis como: pH da solução, concentração do reagente complexante PAN , temperatura do banho-maria, tempo de centrifuga e tempo de resfriamento.

11. REFERÊNCIAS

[1]. LEAL GV,PHILIPPI ST., MATSUDO SM, TOASSA EC. Food intake and meal patterns of adolescents. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.13,p. 457-67, 2010.

[2]. TRIPP, F. The use of dietary supplements in the elderly: current issues and recommendations. **Journal of American Dietetic Association**. v. 97, p. 181-183, 1997.

[3]. LIANG, Q.; QU, J.; LUO, G.; WANG, Y. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,**v. 40, p.305-311, 2006.

[4]. PEREIRA, R.F: LAJOLO , F.M.; HIRSCHBRUCH, M .D. Consumo de suplementos alimentares por alunos de academias de ginástica em São Paulo. **Revista de Nutrição,** v. 16, p. 265-272, 2003.

[5]. ALVES, A.K.L. **Suplementação Nutricional.** Epub, 2003. Disponível em: <www.epub.org.br>. Acesso em 20 fev. 2016.

[6]. ANVISA. Seminário do Setor Regulado SUPLEMENTOS ALIMENTARES Brasília, 21 de outubro de 2014. Gerência Geral de Alimentos.

[7]. RON J MAUGHAN , DOUG S KING & TREVOR LEA. Dietary Suplements **Journal of Sports Sciences**, v.22, p. 95-113, 2004.

[8]. MIARKA,B.; JÚNIOR, L.C.C.; INTERDONATO, G.C.; DEL VECCHIO, B.F. “Características da Suplementação Alimentar por Amostra Representativa de Acadêmicos da Área de Educação Física”. **Movimento & Percepção,** , v.8, p.1679-8678, 2007.

[9]. FORTE, M.A./. **Suplemento: BCAA**. Revista Suplementação. Disponível em: <www.revistasuplementacao.com.br>. Acesso em: 21 fev. 2016.

[10]. REVISTA SUPLEMENTAÇÃO/ **Termogênicos - os queimadores de gorduras**. Revista Suplementação, 2008. Disponível em: <www.revistasuplementacao.com.br>. Acesso em: 21 de fev. 2016.

[11]. MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. GMC/RES. nº 012/2011. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. LXXXIV GMC (Grupo Mercado Comum). Assunção, 17 de junho de 2011. Disponível em: <www.mercosur.int> Acessado em: 05 de mar. 2016.

[12]. MIGUEL, A./ Medicina Geriátrica, Geriatria E Gerontologia.**Cádmio - Intoxicação**. Disponível em: <www.medicinageriatrica.com.br> Acesso em:22 de fev.2016.

[13]. CARL, M. Heavy metals and other trace elements. **Monograph on residues and contaminants in milk and milk products**. International Dairy Federation "IDF", Belgium Special Issue 9101, p. 112-119, 1991.

[14]. SHIRLEY, R. L. Water requirements for grazing ruminants and water as a source of minerals. In: McDOWELL, L. R. Nutrition of grazing ruminants in warm climates. Orlando: **Academic Press**, p.182-186, 1985.

[15]. LUCYK, J. / SAÚDE ATIVA . **Efeitos da intoxicação por cádmio no organismo.** Saúde Ativa. Disponível em: <www.saudeativa.com.br>. Acesso em: 23 de fev. 2016.

[16]. TAKEBAYASHI, S.; JIMI, S.; SEGAWA, M.; KIYOSHI, Y. Cadmium induces osteomalacia mediated by proximal tubular atrophy and disturbances of phosphate reabsorption: a study of 11 autopsies. **Pathology Research and Practice**, v.196, p.653-663, 2000.

[17]. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, DECRETO Nº 55.871, DE 26 DE MARÇO DE 1965 .D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.

[18]. SEILER, H.B; Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds. **Basel**, 1994.

[19]. NEVÉ, J.; Therapeutic Uses of Trace Elements. IN: NEVÉ,J.New York : Plenum Press Inc., 1996.

[20]. FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; Controle de metais pesados em produtos farmacêuticos: aspectos analíticos relevantes, **Pharmaceutical**. **Technology**, v. 4, p. 9-13, 2000.

[21]. CLARKSON, P.M. Effects of exercise on chromium levels: Is supplementation required? **Sports Medical**,v. 9, p.23-341, 1997.

[22]. KREIDER, R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Medical**, v.27, p.97-110, 1999.

[23]. KOBLA HV, Volpe SL. Chromium, exercise, and body composition. Crit Rev **Food Science Nutrition**, v .40, p. 291-308, 2000.

[24]. CHOWDHURY S, PANDIT K, ROYCHOWDURY P, BHATTACHARY A. Role of chromium in human metabolism, with special reference to type 2 diabetes. **Journal of Association of Physicians of India**, v .5, p. 51-701, 2003.

[25]. VINCENT JB. Relationship between glucose tolerance factor and low-molecular weight chromium-binding substance. **Journal Nutricion**, v. 9, p.117-124, 1994.

[26]. ANDERSON,R.A. Chromium, glucose tolerance and diabetes. **Journal American College of Nutrition**, v 17, p. 55-548, 1998.

[27]. GRANT, K.E.; CHANDLER, R.M.; CASTLE AL, J.L. Chromium and exercise training: effect on obese women. **Medical Science Sports Exercice,** v .8, p. 29-992, 1997.

[28]. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Cromo. In: Elementos traço na nutrição e saúde humanas. Rocca, p.135, 1998.

[29]. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for cadmium. **Atlanta**: ATSDR, 2008. Disponível em: <www.atsdr.cdc.gov>. Acessado em 05 de mar. 2016.

[30].BROADHURST,C.L.;SCHMIDT,W.F.;REEVES,J.B.;POLANSKY,M.M.;GAUTSCHI, K. & ANDERSON, R.A. "Characterization and structure by NMR and FTIR spectroscopy, and molecular modeling of chromium(III) picolinate and nicotinate complexes utilized for nutritional supplementation". **Journal Inorganic Biochemistry**, v.66,p**.** 119-130, 1997.

[31]. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. *Diário Oficial da União*,Brasília, DF, 15 jan. 1998.

[32]. TRUMBO P; YATES, A.A, SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal American Dietary Association**,v. 101, p.294-301, 2001.

[33]. CAMPBELL, W.W.; BEARD, J.L.; JOSEPH, L.J.; DAVEY, S.L.; EVANS, W.J. Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: effects on iron-status and hematologic indexes. **American Journal Clinic Nutrition**, v.66, p. 944, 1997.

[34]. DOLAN, S. P.; NORTRUP, D. A. ; BOLGER, M .P. ; CAPAR, . G. Analysis of Dietary Supplements for Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p.1307-1312, 2003.

[34]. TUMIR, H.; Bošnir, J.; Dragojevic´, I. V.; Dragun, Z.; Tomic´ , S.; Puntaric´, D.; Jurak, G. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. **Food Control,** v.21, p. 885-889,2010

[35]. AVULA, B.; WANG, H.Y.; SMILLIE, J.T.; NURDAN ,S. D.A.; KHAN, I. A. Quantitative Determination of Multiple Elements in Botanicalsand Dietary Supplements Using ICP-MS. **Journal Agriculture. Food Chemistry**, v. 58, p .8887–8894, 2010.

[37]. MELQUIADES, F.L.; Endo, L.Y.; LOPES, F.; PORTEZAN FILHO, O.; APPOLONI, C.R.; PARREIRA, Paulo, S. Fluorescência De Raios X Aplicada À Quantificação De Metais Em Suplementos Poliminerais. In: Simpósio Latino

Americano de Ciência de Alimentos - 9 SLACA, 2011, Campinas**. Abstracts from 9 SLACA.** , Campinas, 2011. Campinas: UNICAMP, 2011. V. único. p. 1.

[38]. MORET,S.; Prevarin, A.; Tubaro, F. Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. **Food Chemistry**,v.126, p.1232–1238, 2011.

[39]. PATLAR, S.; Boyali, E.; Baltaci, A. K.; Mogulkoc, R.; Gunay, M.; Elements in Sera of Elite Taekwondo Athletes: Effects of Vitamin E Supplementation. **Humana Press**, v.139, p.119–125, 2011.

[40]. KEATING, E.M, ; Fischer, P. R.; Pettifor, J.M.; Pfitzner, M.; Isichei, C. O.; Thacher, T. D. The Effect of Calcium Supplementation on Blood Lead Levels in Nigerian Children. THE **Journal of Pediatrics**, v. 159, p .845-850, 2011.

[4]. BOURGOIN., B. P.; BOOMER, D.; POWELL, M. J.; WILLIE, S.; EDGAR, D.; EVANS, D.; Instrumental Comparison for the Determination of Cadmium and Lead in Calcium Supplements and Other Calcium-rich Matrices**, Analyst**,v.117,p.19–22, 1992.

[42]. SCELFO, M.; FLEGAL, A. R.; Lead in calcium supplements, **Environmental Health Perspectives**, v.108, p. 309–313, 2000.

[43]. NAGESWARA RAO, R.; KUMAR TALLURI, M. V. N.; An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, **Journal Pharmath. Biomedical Analystic**, v. 43, p.1-13, 2007.

[44]. LARINI, L.; OLIVEIRA, G.H. Avaliação toxicológica: In: LARINI, L., Toxicologia 3ª edição. São Paulo; Manole, 1997, p.43-58.

[45]. COELHO, L. M.; ARRUDA, M. A. Z. Preconcentration procedure using cloud point extraction in the presence of electrolyte for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry **Spectrochimica Acta Part B**,v. 60, p.743– 748, 2005.

[46]. Manzoori, J.;Tabrizi, L.B .The application of cloud point preconcentration for the determination of Cu in real samples by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v.72, p.1-7,2002.

[47]. STALIKAS, C.D. Micelle–mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, nº 5, p. 343 – 355, 2002.

[48]. VEIGA, M.A.M.S. **Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usando dietil-ditiofosfato como agente quelante**.2000. Tese (Química Analítica)-Instituto de Química de Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

[49]. PALEOLOGOS, E.K.; STALIKOS, C.D.; TZOUWARA – KARAYANNIS, S. M.; PILIDIS, G.A.; KAROYANNIS, M.I.; Spedrom. **Journal Analystic Acta.**v. 15, p. 287, 2000.

[50]MARANHÃO, T. DE A.; BORGES, D. L. G.; VEIGA, M. A. M. S. DA; CURTIUS, A. J. Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry Spectrochimica Acta **Part B**, v.60, p.667– 672, 2005.

[51]. MANIASSO, N.; Ambientes Micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24,n.1, p. 87-93, 2001.

[52]. CHEN, J.; TEO, K.C.; Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. **Analytica Chimica Acta**.,v. 450, p. 222, 2001.

[53]. KELKÓ-LÉVAI, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYI, K.; LÁSZTITY, A.; Determination of trace elements in pharmaceutical substances by graphite furnace atomic absorption spectrometry and total reflection X-ray fluorescence after flow injection ion-exchange preconcentration, Spectrochim. **Analytica Chimica Acta** , v. 54, p. 827-833, 1999.

[54]. CHUANG, I.-C.; CHEN, K.-S.; HUANG, Y.-L.; LEE, P.-N.; LIN T.-H.; Determination of Trace Elements in Some Natural Drugs by Atomic Absorption Spectrometry, **Biological Trace Element Research**. v.76, p. 235-244, 2000.

[55]. MATOS, G. D.; REIS, E. B.DOS; COSTA, A. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Speciation of chromium in river water samples contaminated with leather effluents by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration by cloud point extraction **Microchemical Journal**, v. 92, p.135–139, 2009.

[56]. SUSSULINI, A.; ARRUDA, A.A.; Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem, **Talanta**, v. 75, p. 307-311, 2008.

[57]. PALLEOLOGOS, E. K.; STALIKAS, C. D. & KARAYANNIS, M. I. An optimized single-reagent method for the speciation of chromium by flame atomic absorption

spectrometry based on surfactant micelle-mediated methodology. **Analyst**, v.125, p. 389-393, 2001.

[58]. BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S.L.C., Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica, primeira edição, Editora UESB, Vitória da Conquista-BA, 2006.

[59]. ARRUDA, Z.A.M.; SANTTELI, E.R. Mecanização No Preparo De Amostras Por Microondas: O Estado Da Arte. **Química Nova**. v. 20, p.638-643, 1997.

[60]. Oliveira, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. ***Journal* Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

[61]. Giinzler*,* H*.;* Williams*, A.* Handbook of Analytical Techniques*. Wiley-VCH:* **Weinheim**, 2001.

[62]. Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C. Sample preparation.**Journal of Chromatography A,** v. 1184, p. 191-219, 2008.

[63]. Sample Prep Web, disponível em: <www.sampleprep.duq.edu> Acesso em: 28 de dez. 2015.

[64]. BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução- RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Agência Nacional de Vigilância Sanitária validação de métodos analíticos e bioanalíticos**.** Diário Oficial da União, Brasília – DF. 2003.

[65]. AESA, REGULAMENTO (UE) N.o 488/2014 DA COMISSÃO de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) n.o 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos gêneros alimentícios. Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA), maio 2014.

[66]. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, Informe Técnico sobre Quelatos n. 64, de 02 de dezembro de 2014.

[67]. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. e MELO, L. F. C**.** Validação em métodos cromatográficos eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 776-777. 2004.

[68]. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

[69]. GIOKAS, D.L.; EKSPERIANDOVA, L.P.; BLANK, A.B.; KARAYANNIS, M.I. Comparison and evaluation of cloud point extraction and low-temperature directed

crystallization as preconcentration tools for the determination of trace elements in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 224,p. 1 – 9, 2003.

12. ANEXOS

ANEXO A- Tabela 14: Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA).

3.2.15	Parte comestível dos seguintes peixes ([24]) ([25]): biqueirão (espécie *Engraulis*) espadarte (*Xiphias gladius*) sardinha (*Sardina pilchardus*)	0,25
3.2.16	Crustáceos ([26]): músculo dos apêndices e do abdómen ([44]). No caso dos caranguejos e crustáceos similares (*Brachyura* e *Anomura*), a parte comestível dos apêndices	0,50
3.2.17	Moluscos bivalves ([26])	1,0
3.2.18	Cefalópodes (sem vísceras) ([26])	1,0
3.2.19	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição ([8]) ([29]) — Fórmulas em pó fabricadas a partir de proteínas ou hidrolisados de proteínas do leite de vaca — Fórmulas líquidas fabricadas a partir de proteínas ou hidrolisados de proteínas do leite de vaca — Fórmulas em pó fabricadas a partir de isolados de proteína de soja ou de uma mistura destes com proteínas do leite de vaca — Fórmulas líquidas fabricadas a partir de isolados de proteína de soja ou de uma mistura destes com proteínas do leite de vaca	 0,010 a partir de 1 de janeiro de 2015 0,005 a partir de 1 de janeiro de 2015 0,020 a partir de 1 de janeiro de 2015 0,010 a partir de 1 de janeiro de 2015
3.2.20	Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens ([7]) ([29])	0,040 a partir de 1 de janeiro de 2015
3.2.21	Suplementos alimentares ([39]), com exceção dos suplementos referidos no ponto 3.2.22	1,0
3.2.22	Suplementos alimentares ([39]) que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas ou moluscos bivalves secos	3,0».

ANEXO B- Figura 28: Embalagem de um termogênico indicando a quantidade de cromo presente no produto.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção 1g [= 2 cápsulas]		
Quantidade por porção		%VD [*]
Vitamina A (Retinol)	600 µg	100%
Vitamina C	45 mg	100%
Zinco	7 mg	100%
Cromo	35 µg	100%

Não contém quantidades significativas de valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio.

% Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000Kcal ou 8.400kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

ANEXO C- PROC. Nº 3254/13

PLL Nº 360/13

EXPOSIÇÃO DE MOTIVOS

Este Projeto de Lei visa a impedir sérios problemas de saúde à nossa população advindos do uso inadvertido de brincos, pulseiras, anéis, cordões, gargantilhas ou outras bijuterias, artigos e utensílios confeccionadas na China com o metal cádmio, conforme veiculado em reportagem nacional.

Um teste mostrou o alto nível de cádmio presente em diversos itens de bijuterias vindas da China. Em alguns dos itens examinados, a concentração do metal chegou a 40% (quarenta por cento), enquanto o nível tolerável na Europa é de 0,02% e, nos Estados Unidos, é de 0,03%. O cádmio é um metal tóxico, que pode causar sérios problemas de saúde. Brincos, pulseiras, anéis e cordões com esse metal podem ter ido parar em lojinhas e camelôs em todo o País.

Até o momento, inexiste legislação federal ou estadual que regule ou proíba a venda de artigos como bijuterias com a utilização de cádmio. O cádmio, apesar das inúmeras aplicações industriais e na vida do ser humano, em elevada quantidade pode provocar diversos problemas ambientais, uma vez que é um elemento do grupo dos metais pesados tóxicos e é organocumulativo. A sua contaminação pode ocorrer pela poluição da água e do solo, e, assim, nas minas ou nas indústrias de fundição.

O cádmio é um metal pesado que produz efeitos tóxicos nos organismos vivos, mesmo em concentrações muito pequenas. A exposição ao cádmio nos humanos ocorre geralmente através de duas fontes principais: a primeira é por via oral (por água e ingestão de alimentos contaminados), e a segunda por inalação.

[...]

Alguns órgãos vitais são alvos da toxicidade do cádmio. Em organismos intensamente expostos, o cádmio ocasiona graves enfermidades ao atuar sobre estes órgãos.

[...]

De qualquer forma, uma vez que o cádmio é absorvido é fortemente retido, inclusive baixas doses deste metal podem constituir um nível significativo no organismo se a exposição se prolonga durante um longo período de tempo.

[...]

PROC. Nº 3254/13

PLL Nº 360/13

A concentração do metal nos rins é aproximadamente 10 mil vezes mais alta que a da corrente sanguínea.

[...]

Em pessoas que têm sido expostas a um excesso de cádmio se têm observado danos nos rins. Esta enfermidade renal pode ocasionar a formação de cálculos e seus efeitos no sistema ósseo se manifestam através de dor e debilidade.

[...]

Em trabalhadores de fábricas, onde o nível de concentração de cádmio no ar é alta, têm sido observados severos danos aos pulmões, tais como enfisema pulmonar.

[...]

Outros tecidos também são danificados por exposição ao cádmio em humanos, incluindo o fígado, o sistema imunológico, o sistema nervoso e o sangue.

[...]

É importante tomar medidas preventivas para proteger as pessoas e evitar que sejam expostas a este metal. Também deve-se considerar aumentar a informação acerca do cádmio para a população em geral. É possível que alguns dos nossos males, tais como câncer, enfermidades renais, hepáticas, pulmonares e outras, estejam ligados com a exposição prolongada ao cádmio. A toxicidade que o cádmio apresenta é similar à do mercúrio.

Diante do exposto e da gravidade que a exposição das pessoas a este metal representa, mostra-se necessário que o Município de Porto Alegre tenha legislação que proíba sua comercialização em forma de bijuterias ou similares, o que pretendemos ver aprovado por nossos pares vereadores por meio deste Projeto de Lei.

Sala das Sessões, 18 de novembro de 2013.

VEREADOR DELEGADO CLEITON

1 FONTE: Wikipedia. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1dmio>. Acessado em 2 dez. 2013.

PROC. Nº 3254/13

PLL Nº 360/13

PROJETO DE LEI

Proíbe a venda de artigos que contenham na sua composição o metal cádmio, tais como adereços de bijuteria, por estabelecimentos comerciais, vendedores autônomos, formais ou informais, e camelôs.

Art. 1º Fica proibida a venda de artigos que contenham na sua composição o metal cádmio, tais como adereços de bijuteria, por estabelecimentos comerciais, vendedores autônomos, formais ou informais, e camelôs.

Art. 2º O não cumprimento do disposto nesta Lei sujeita o estabelecimento infrator às seguintes penalidades:

I – a apreensão das mercadorias para posterior destruição;

II – multa de 500 (quinhentas) Unidades Financeiras Municipais (UFMs) por infração cometida; e

III – a cassação do Alvará de Localização e Funcionamento.

Art. 3º Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

/JM

ANEXO D- Tabela 15: Ingestão diária recomendada para Adultos.

Nutriente	Unidade	Valor
Proteína (INSTITUTE OF MEDICINE)	g	50
Vitamina A (FAO/OMS) (a)	micrograma RE	600
Vitamina D (FAO/OMS) (b)	micrograma	5
Vitamina C (FAO/OMS)	mg	45
Vitamina E (FAO/OMS) (c)	mg	10
Tiamina (FAO/OMS)	mg	1,2
Riboflavina (FAO/OMS)	mg	1,3
Niacina (FAO/OMS)	mg	16
Vitamina B6 (FAO/OMS)	mg	1,3
Ácido fólico (FAO/OMS)	micrograma	240
Vitamina B12 (FAO/OMS)	micrograma	2,4
Biotina (FAO/OMS)	micrograma	30
Ácido pantotênico (FAO/OMS)	mg	5
Vitamina K (FAO/OMS)	micrograma	65
Colina (INSTITUTE OF MEDICINE)	mg	550
Cálcio (FAO/OMS)	mg	1000
Ferro (FAO/OMS) (d)	mg	14
Magnésio (FAO/OMS)	mg	260

Zinco (FAO/OMS) (e)	mg	7
Iodo (FAO/OMS)	micrograma	130
Fósforo (INSTITUTE OF MEDICINE)	mg	700
Flúor (INSTITUTE OF MEDICINE)	mg	4
Cobre (INSTITUTE OF MEDICINE)	micrograma	900
Selênio (FAO/OMS)	micrograma	34
Molibdênio (INSTITUTE OF MEDICINE)	micrograma	45
Cromo (INSTITUTE OF MEDICINE)	micrograma	35
Manganês (INSTITUTE OF MEDICINE)	mg	2,3

(a) 1 micrograma retinol = 1 micrograma RE; 1 micrograma beta-caroteno = 0,167 micrograma RE; 1 micrograma de outros carotenóides provitamina A = 0,084 micrograma RE; 1 UI = 0,3 micrograma de retinol equivalente (FAO/OMS).
(b) 1 micrograma de colicalciferol = 40 UI.
(c) mg alfa-TE/dia; 1,49 UI = 1mg d-alfa-tocoferol (INSTITUTE OF MEDICINE).
(d) 10% de Biodisponibilidade
(e) Biodisponibilidade moderada - calculada com base em dietas mistas contendo proteína de origem animal

.

ANVISA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANEXO E- Informe Técnico n. 64, de 02 de dezembro de 2014.

Assunto: Esclarecimentos sobre o uso de minerais quelatos em alimentos.

I. Introdução

Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem recebido diversas denúncias acerca da comercialização de produtos contendo determinados minerais quelatos, especialmente em suplementos minerais e vitamínicos. Durante a apuração dessas denúncias, a GGALI verificou que existem dúvidas do setor regulado e dos órgãos locais do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) sobre os compostos de minerais permitidos pela legislação sanitária de alimentos.

Embora a legislação sanitária de alimentos não estabeleça uma lista positiva dos compostos de nutrientes autorizados para uso nos alimentos em geral, existem regras específicas que devem ser obedecidas a fim de garantir que esses ingredientes sejam seguros, biodisponíveis e tenham um nível adequado de qualidade. Desta forma, diversos minerais quelatos presentes em produtos disponíveis no comércio brasileiro foram avaliados com base nas referências regulatórias e técnico-científicas disponíveis a fim de orientar os setores envolvidos sobre o uso desses ingredientes.

II. Objetivos

Esclarecer os requerimentos legais relacionados ao uso de compostos de vitaminas e minerais em alimentos, informar sobre a regularidade da utilização de minerais quelatos na produção de alimentos e disponibilizar, para fins de orientação, uma lista dos compostos de minerais que atendem aos requisitos estabelecidos na legislação no tocante à segurança de uso pela população brasileira, biodisponibilidade e qualidade.

III. Legislação aplicável ao uso de compostos de vitaminas e minerais em alimentos.

A Portaria SVS/MS n. 31/1998[1], que trata dos alimentos adicionados de nutrientes essenciais, estabelece os critérios gerais para fortificação dos alimentos com compostos de vitaminas e minerais. De acordo com esse regulamento, os minerais adicionados devem ter comprovada segurança e biodisponibilidade e estar presentes em quantidades que não impliquem em ingestão insignificante ou excessiva.

Entretanto, o referido regulamento não traz uma lista positiva de compostos de vitaminas e minerais autorizados para uso, o que gera dúvidas sobre quais ingredientes poderiam ser empregados em alimentos. Além disso, observa-se que outros regulamentos técnicos estabelecem requisitos específicos para adição desses ingredientes que complementam aqueles previstos na Portaria SVS/MS n. 31/1998.

Nesse sentido, a Portaria SVS/MS n. 32/1998[2], que trata de suplementos vitamínicos e minerais, embora também não defina uma lista positiva de compostos de vitaminas e minerais autorizados, estabelece que esses ingredientes devem atender as especificações da Farmacopeia Brasileira, outras Farmacopeias oficialmente reconhecidas ou do *Food Chemical Codex.*

A Resolução n. 37/2009[3], que trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras, determina que na ausência de substâncias químicas de referência certificadas pela Farmacopeia Brasileira podem ser utilizadas as substâncias químicas de referência certificadas pelas seguintes Farmacopeias: Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Europeia, Francesa, Internacional (OMS), Japonesa, Mexicana e Portuguesa. No entanto, esclarecemos que o fato da substância estar presente nessas Farmacopeias não significa necessariamente que o seu uso está autorizado para alimentos, pois esse tipo de publicação define apenas os parâmetros de qualidade dos ingredientes sem considerar sua finalidade de uso e, consequentemente, sua segurança de uso como alimento.

Já a Resolução RDC n. 42/2011[4] e suas atualizações[5] listam os compostos de nutrientes autorizados para os alimentos destinados a lactentes e crianças de primeira infância e as respectivas referências de pureza que devem ser atendidas. Adicionalmente, a Resolução n. 16/1999[6], que dispõe sobre os procedimentos de registro de novos alimentos e ingredientes, determina que ingredientes que não tenham histórico de consumo no Brasil só podem ser disponibilizados no mercado após comprovação da segurança.

Considerando os critérios gerais estabelecidos para a adição de compostos de vitaminas e minerais em alimentos, as condições de segurança e qualidade definidas na legislação e as dúvidas existentes sobre os compostos de minerais que podem ser utilizados em alimentos, a ANVISA elaborou, para fins de orientação, uma lista de compostos de minerais que atendem aos requisitos estabelecidos na legislação (Anexo).

IV. Denominação dos ingredientes minerais quelatos

Foi identificado que existe certa confusão em relação ao uso do termo minerais quelatos. Algumas empresas utilizam essa terminologia, de modo mais geral, para descrever os compostos formados pela ligação de um metal a compostos orgânicos em mais de um sítio de ligação, outras utilizam o termo, de forma mais específica, para denominar o composto formado pela ligação de um metal a aminoácidos.

Ressalva-se que, conforme Resolução RDC n. 259/2002[7], na lista de ingredientes devem ser declarados os nomes dos ingredientes adicionados aos produtos e não os nutrientes, pois estes estão declarados na tabela nutricional. Por exemplo, na lista de ingredientes do produto deve constar “bisglicinato de zinco” e não “zinco quelato” ou “zinco”.

V. Finalidade de uso

Durante a apuração das denúncias, foi argumentado pelas indústrias de alimentos que os minerais quelatos com aminoácidos possuiriam maior biodisponibilidade do que seus análogos inorgânicos, pois a estrutura química dessas substâncias conferiria propriedades físico-químicas similares àquelas dos compostos formados pelo organismo durante o processo de absorção de minerais, facilitando sua absorção. Nesse sentido, alguns estudos indicaram maior biodisponibilidade de minerais quelatos em comparação com seus respectivos sais[8,9,10] (LAYRISSE et al., 2000; PAIK, 2001; SZARFARC, 2001). Contudo, há pouca evidência científica indicando que minerais aminoácidos quelatos têm biodisponibilidade superior aos quelatos minerais ascorbatos, citratos, fumaratos, gluconatos, lactatos e malatos.

Cabe salientar que a *European Food and Safety Authority* não foi capaz de concluir sobre a segurança de uso de alguns quelatos de aminoácidos (ex. nicotinato glicinato de cromo) devido à falta de dados científicos[11] (EFSA, 2008).

VI. Avaliação de segurança

Caso uma empresa queira utilizar um composto que não possua histórico de uso ou especificações de qualidade estabelecidas nas referências previstas na legislação, deve ser comprovada a segurança de uso desse ingrediente, nos termos da Resolução n. 17/1999[12], por meio da petição de avaliação de segurança de novo ingrediente.

Para informações adicionais sobre a comprovação de segurança de novos ingredientes em alimentos, consultar o Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes, disponível no seguinte link: http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/ev.

VII. Considerações Finais

Face ao disposto, os compostos de minerais listados no Anexo podem ser utilizados em alimentos sem necessidade de comprovação de segurança, desde que atendidos aos requisitos de qualidade estabelecidos nas referências reconhecidas pela legislação. Devem ser observados, ainda, os requerimentos de composição relativos ao uso de compostos de minerais estabelecidos nos regulamentos técnicos das categorias de produtos. Por exemplo, a lista de compostos de minerais do Anexo não serve como referência para os alimentos infantis que já possuem regulamentos que definem os compostos autorizados.

Os fabricantes de alimentos contendo compostos de minerais diferentes daqueles listados no Anexo são orientados a adotar as medidas necessárias para retirar os produtos do mercado e alterar a formulação dos mesmos. Caso as empresas tenham interesse em utilizar compostos de minerais não listados, deve ser protocolada a petição de avaliação da segurança de novos alimentos e ingredientes, previamente à comercialização do produto.

VII. Referências

1. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 dez. 1998.

2. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 15 jan. 1998.

3. BRASIL. Resolução-RDC nº 37, de 6 de julho de 2009. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 de jul. de 2009.

4. BRASIL. Resolução-RDC n° 42, de 19 de setembro de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 de set. de 2009.

5. BRASIL. Resolução-RDC n° 45, de 25 de setembro de 2014. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 de set. de 2009.

6. BRASIL. Resolução-RDC n° 16, de 30 de abril de 1999. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 de dez. de 1999.

7. BRASIL. Resolução-RDC n° 259, de 20 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 de set. de 2002.

8. LAYRISSE, M.; et al. Iron Bioavailability in humans from breakfast enriched with iron bis glycine chelate, phytates and polyphenols. *Journal Nutrition,* 130 (2000), 2195-2199.

9. PAIK, I. Application of chelates minerals in animal production. *Asian-Aust., Journal Animal Science,* 14 (2001) 191-198.

10. SZARFARC, S.C. Relative effectiveness of iron bis glycinate chelate (ferrochel) and ferrous sulfate in the control of iron deficiency in pregnant women. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition,* 51 (2001) 42-47.

11. EFSA. Opinion on certain bisglycinates as sources of cooper, zinc, calcium, magnesium and glycinate nicotinate as source of chromium in foods intended for the general population (including food supplements) and foods for particular nutrition uses. *The EFSA Journal,* 718 (2008), 1-26.

12. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 3 mai. 1999.

ANVISA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Anexo. Lista de substâncias minerais já aprovados para uso em alimentos constantes nas referências oficiais reconhecidas pela Anvisa.

1. Fonte de cálcio	2. Fonte de magnésio
Acetato de cálcio	Acetato de magnésio
Alginato de cálcio	Acetiltaurato de magnésio
Ascorbato de cálcio (L-ascorbato de cálcio)	Ascorbato de magnésio (L-ascorbato de magnésio)
Bisglicinato de cálcio Carbonato de cálcio Citrato de cálcio	Bisglicinato de magnésio
Citrato malato de cálcio	Carbonato de hidróxido de magnésio
Cloreto de cálcio	Carbonato de magnésio
Dicitrato tricálcico (citrato de cálcio) Difosfato tricálcico (fosfato de cálcio tribásico)	Citrato de magnésio e potássio
Dihidrogênio fosfato de cálcio (fosfato de cálcio monobásico)	Cloreto de magnésio
Fosfato de cálcio dibásico	Fosfato de magnésio
Fosfato de cálcio monobásico Fosfato de cálcio tribásico Glicerofosfato de cálcio Gluconato de cálcio	Fosfato trimagnésico (fosfato de magnésio)
Hidrogênio fosfato de cálcio (fosfato de cálcio dibásico)	Glicerofosfato de magnésio
Hidróxido de cálcio	Gluconato de magnésio
Lactato de cálcio (L-lactato de cálcio) Lisinato de cálcio (L-lisinato de cálcio) Malato de cálcio	Hidrogênio fosfato de magnésio (fosfato de magnésio dibásico)
	Hidróxido de magnésio
	Lactato de magnésio
	Lisinato de magnésio (L-lisinato de magnésio)
	Malato de magnésio
	Óxido de magnésio
	Pidolato de magnésio (L-pidolato
3. Fonte de ferro	**4. Fonte de cobre**

Bisglicinato ferroso Carbonato ferroso Citrato férrico Citrato férrico de amónio ou amoniacal Citrato ferroso Difosfato férrico (pirofosfato férrico) Difosfato férrico de sódio Ferro carbonila Ferro eletrolítico Ferro reduzido por hidrogênio Fosfato férrico Fosfato ferroso Fumarato ferroso Gluconato ferroso Lactato ferroso Ortofosfato	Aspartato de cobre (L-aspartato de cobre) Bisglicinato cúprico Carbonato cúprico Citrato cúprico Complexo de cobre-lisina Gluconato cúprico (gluconato de cobre) Óxido cúprico Sulfato cúprico (sulfato de cobre)
5. Fonte de iodo	**6. Fonte de zinco**
Iodato de potássio Iodato de sódio Iodeto de potássio Iodeto de sódio	Acetato de zinco Ascorbato de zinco (L-ascorbato de zinco) Aspartato de zinco (L-aspartato de zinco) Bisglicinato de zinco Carbonato de zinco Citrato de zinco Cloreto de zinco Gluconato de zinco Glutarato de zinco Lactato de zinco Lisinato de zinco (L-lisinato de zinco) Malato de zinco Mono L-metionina sulfato de zinco
7. Fonte de manganês	**8. Fonte de sódio**
Ascorbato de manganês	Bicarbonato de sódio (hidrogênio

Aspartato de manganês (L-aspartato de manganês) Bisglicinato de manganês Carbonato de manganês Citrato de manganês Cloreto de manganês Glicerofosfato de manganês Gluconato de manganês Pidolato de maganês Sulfato de manganês	carbonato de sódio) Carbonato de sódio Citrato de sódio (citrato trissódico) Cloreto de sódio Difosfato férrico de sódio Dihidrogênio fosfato de sódio (fosfato de sódio monobásico) Fluoreto de sódio Fosfato trissódico (fosfato de sódio tribásico) Gluconato de sódio Hidrogênio carbonato de sódio (bicarbonato de sódio)
9. Fonte de selênio	**10. Fonte de flúor**
Ácido selenioso Hidrogenosselenito de sódio (selenito hidrogênio de sódio) Levedura enriquecida em selênio Selenato de sódio Selenito de sódio	Fluoreto de sódio Fluoreto de potássio Fluoreto de cálcio Monofluorofosfato de sódio
11. Fonte de potássio	**12. Fonte de cromo**
Bicarbonato de potássio (hidrogênio carbonato de potássio) Carbonato de potássio Citrato de potássio (citrato tripotássico) Cloreto de potássio Fosfato de potássio dibásico (Hidrogênio fosfato dipotássico) Fosfato de potássio monobásico (Dihidrogênio fosfato de potássio) Fosfato de potássio tribásico Glicerofosfato de potássio	Cloreto de cromo (III) Lactato de cromo (III) tri-hidratado Nitrato de cromo Picolinato de cromo Sulfato de cromo (III)

Pidolato de potássio (L-pidolato de potássio)	
13. Fonte de molibdênio	**14. Fonte de boro**
Molibdato de amónio Molibdato de potássio	Ácido bórico Borato de sódio
15. Fonte de fósforo	
Fosfato de cálcio dibásico (Hidrogênio fosfato de cálcio) Fosfato de cálcio monobásico (Dihidrogênio fosfato de cálcio) Fosfato de cálcio tribásico (Difosfato tricálcio) Fosfato de potássio dibásico (Hidrogênio fosfato dipotássico) Fosfato de potássio monobásico (Dihidrogênio fosfato de potássio) Fosfato de sódio dibásico (Hidrogênio fosfato dissódico)	