



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA

LAÍS ARAÚJO SOUZA

**Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de elementos essenciais em
amostras de alimentos: comparação de métodos estático e
dinâmico**

Salvador

2019

LAÍS ARAÚJO SOUZA

**Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de elementos essenciais em
amostras de alimentos: comparação de métodos estático e
dinâmico**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria das Graças A. Korn

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Miró Lladó

Salvador
2019

Dedico este trabalho à minha mãe Noélia e ao meu pai Dilton.

“Coragem, coragem se o que você quer é aquilo que pensa e faz, coragem, coragem eu sei que você pode mais”.

Raul Seixas

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPESB pelos investimentos nos projetos de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA pela oportunidade e aos funcionários do PPGQUIM pela disponibilidade e atenção.

À professora Maria das Graças por ter me acolhido desde o mestrado, sempre me incentivando e por ter abraçado junto comigo as ideias para o doutorado.

À professora Daniele Muniz por toda a parceria e por ter confiado em mim na co-orientação de Filipe, na iniciação científica e atualmente no mestrado.

À professora Wagner Piler e ao professor Rennan Araújo pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho.

Ao professor Manuel Miró, em especial, não só por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa FI-TRACE, na Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca, Espanha, durante o período de doutorado sanduíche, mas pela excelente orientação, participação no trabalho e discussão dos resultados diariamente.

À María Rosende por toda ajuda nos laboratórios da UIB e por toda experiência que adquiri durante a realização deste trabalho.

A David Cocovi pelo cocosoft, software utilizado neste trabalho, e por todos os consertos de equipamentos em tempo hábil para finalização dos experimentos.

A José González por toda assistência técnica nas medidas de ICP OES on-line e também pelo treinamento no ICP OES e forno de micro-ondas.

A todos os colegas do grupo de pesquisa FI-TRACE e dos demais grupos de pesquisa da UIB por todos os cafés pontuais ao meio dia, os melhores momentos de distração.

À minha amiga tailandesa, Mook Cnd, por enriquecer o meu vocabulário em inglês, por ficar comigo até tarde no laboratório e por todas as corridas para pegar o último ônibus para voltar para a Praça Espanha, em Palma de Mallorca, Espanha.

À minha amiga, Alba Milà, com a qual morei na Espanha, por ouvir todos os dias sobre os avanços do meu trabalho e vibrar junto comigo a cada etapa vencida.

Aos colegas do GPQA, especialmente a Thaís Luz, por ter sido meu braço direito, principalmente durante o período de doutorado sanduiche.

Aos colegas do GRPQQ, especialmente a Daniel Levi, pela amizade e palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

À minha mãe, Maria Noélia, que acompanha meus estudos desde o maternalzinho quando tinha 2 anos até agora no fim do doutorado com 28 anos.

Ao meu pai, Dilton Sérgio, por sempre se preocupar com meus estudos, financiando até onde pôde as melhores escolas e cursos.

Ao meu irmão, Bruno Souza, exemplo de dedicação a ser seguido e que tento me espelhar todos os dias.

Aos meus avôs Antônio e Cardoso e as minhas avós Neusa (*in memoriam*) e Bada (*in memoriam*) pela torcida e admiração.

A toda a minha família pelo apoio.

Ao meu namorado, Rodolfo, por esses 8 anos de amor e companheirismo e por ter me acompanhado desde a graduação, iniciação científica, formatura, defesa de mestrado, doutorado sanduíche e doutorado, acreditando sempre em mim.

Aos amigos e colegas da UNEB pela família que formamos desde que nos conhecemos.

A todos os professores que tive ao longo dessa jornada, vocês foram fundamentais para a minha formação.

Aos colegas que fiz no IFBA pelo exemplo de profissionais que são e por tornarem os momentos de trabalho tão agradáveis e mais leves.

A todos os meus alunos que tive nessa reta final do doutorado e que me fizeram amadurecer enquanto profissional, além de me permitirem aprender o que ensino.

Resumo

Diante da importância de se conhecer o valor nutricional de linhaça e gergelim e o método mais adequado para sua determinação, o objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos *in vitro* SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test), UBM (Unified Bioaccessibility Method) e Versantvoort e desenvolver um sistema de extração *in vitro* dinâmico de fluxo automático, com alta resolução temporal, para explorar o trânsito do quimo dos compartimentos gástrico para o duodenal usando o método de extração fisiologicamente relevante do estado alimentado de Versantvoort para avaliar a bioaccessibilidade de micronutrientes. Dentre os métodos *in vitro* investigados, o UBM foi selecionado e as maiores frações bioacessíveis, em %, na fase gástrica foram observadas para Mn (19-27%) e Zn (16-25%). Além disso, verificou-se, através da aplicação de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, que somente uma pequena fração de Fe e Cu era potencialmente bioacessível nessas amostras. O diagrama de fluxo foi acoplado on-line a um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente para a elucidação em tempo real da fração elementar bioacessível de micronutrientes (Cu, Fe e Mn) em linhaça marrom e dourada através do trato gastrointestinal. O biofluido intestinal e biliar simulado (adicionado à fase gástrica) foi sucessivamente bombeado a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ através de uma coluna de grande diâmetro (mantida a $37,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$), inicialmente carregada com cerca de 250 mg de linhaça, uma membrana de filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) tamanho de poro de $5,0 \text{ }\mu\text{m}$), para retenção do material particulado e filtração em linha dos extratos. A confiabilidade do método de extração gastrointestinal foi confirmada usando validação através do balanço de massa, após a digestão assistida por irradiação de micro-ondas da fração não bioacessível, resultando em recuperações que variaram de 79 a 121%. A extração dinâmica on-line foi avaliada criticamente contra os métodos em batelada para ambos os compartimentos gástrico e gastrointestinal. A bioaccessibilidade do quimo na extração dinâmica variou de 21-30% (Cu), 6-7% (Fe) e 21-22% (Mn), já na extração em batelada variou de 42-58% (Cu), 17-52% (Fe) e 24-37% (Mn). Devido à falta de consenso na literatura sobre o método de agitação no teste de bioaccessibilidade oral em batelada, várias abordagens de extração (agitação magnética, agitação orbital e agitação por inversão) foram avaliadas. Enquanto a agitação orbital e agitação por inversão se aproxima da bioaccessibilidade gástrica de Fe $<17 \text{ mg kg}^{-1}$, a agitação magnética proporcionou bioaccessibilidade superior, por exemplo, $31,9 \pm 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$. Para melhor conhecimento, esse é o primeiro trabalho reportando um método de extração GI dinâmico totalmente automatizado.

Palavras-chave: linhaça; gergelim; micronutrientes; bioaccessibilidade; análise por injeção sequencial; ICP OES

Abstract

Given the importance of knowing the nutritional value of linseed and sesame, the main objective of this study was to compare the different *in vitro* methods SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test), UBM (Unified Bioaccessibility Method) and Versantvoort and to develop an automatic flow-through dynamic extraction system is proposed for *in-vitro* exploration, with high temporal resolution, of the transit of the chyme from the gastric to the duodenal compartments using the Versantvoort's fed-state physiologically relevant extraction method., to evaluate the bioaccessibility of micronutrients. Among the *in vitro* methods investigated, UBM was selected and The highest bioaccessible fractions, in %, in gastric phase were observed for Mn (19–27%) and Zn (16–25%). In addition, it was found through the application of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion that only a minor fraction of total Fe and Cu was potentially bioaccessible in this samples. The flow manifold was coupled on-line to an inductively coupled plasma optical emission spectrometer for real-time elucidation of the bioaccessible elemental fraction of micronutrients (Cu, Fe and Mn) in food commodities across the gastrointestinal tract. The simulated intestinal and bile biofluid (added to the gastric phase) was successively pumped at 1.0 mL min⁻¹ through a large-bore column (maintained at 37.0 ± 2.0 °C), initially loaded with about 250 mg of linseed, using a Polyvinylidene fluoride (PVDF) filter membrane (5.0 µm pore size) for retaining of the particulate matter and in-line filtration of the extracts. The lack of bias (trueness) of the on-line gastrointestinal extraction method coupled to ICP OES was confirmed using mass balance validation following microwave assisted digestion of the residual (non-bioaccessible) elemental fraction. Mass balance validation yielded absolute recoveries spanning from 79 to 121% for the overall analytes and samples. On-line dynamic extraction was critically appraised against batch counterparts for both gastric and gastrointestinal compartments. The bioaccessibility of the chime, in the dynamic extraction, ranged from 21-30% (Cu), 6-7% (Fe) and 21-22% (Mn), already in batch extraction ranged from 42-58% (Cu), 17-52% (Fe) and 24-37% (Mn). Due to the lack of consensus in the literature regarding the agitation method in batch oral bioaccessibility testing, several extraction approaches (viz., magnetic stirring, end-over-end rotation and orbital shaking) were evaluated. While orbital shaking and end-over-end rotation approaches the gastric bioaccessibility of Fe <17 mg kg⁻¹, magnetic stirring provided higher bioaccessibility, 31.9 ± 0.4 mg kg⁻¹. To the best of our knowledge, this is the first thesis reporting a fully automatic dynamic GI extraction method.

Keyword: Linseed; Sesame; Micronutrients; Bioaccessibility; Sequential injection analysis; ICP OES

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BARGE	The Bioaccessibility Research Group of Europe
BGL	Linhaça dourada Brasil
BL	Linhaça marrom
BLS	Gergelim preto
BRS	Gergelim marrom
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês: " <i>Bovine serum albumin</i> "
CCD	Planejamento composto central, do inglês: " <i>Central composite design</i> "
CV	Coeficiente de variância
DM	Matrix Doehlert
DOC	Carbono orgânico dissolvido, do inglês: " <i>Dissolved organic carbon</i> "
EB	Elemento bioacessível
ET	Elemento total
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês: " <i>Flame atomic absorption spectroscopy</i> "
FA	Farinha de arroz
FB	Fração bioacessível
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês: " <i>Flow-injection Analysis</i> "
FS	Farinha de soja
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês: " <i>Graphite furnace atomic absorption spectroscopy</i> "
GL	Linhaça dourada
HC	Canal central, do inglês: " <i>Holding coil</i> "
HR CS AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução de fonte contínua, do inglês: " <i>High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> "

HR CS FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama de alta resolução de fonte contínua, do inglês: “ <i>High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> ”
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês: “Inductively coupled plasma optical emission spectrometry”
ICP-MS	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês: “Inductively coupled plasma optical emission spectrometry”
IDR	Ingestão diária recomendada
IV	Válvula de injeção, do inglês: “ <i>Injection valve</i> ”
LBC	Coluna de grande diâmetro, do inglês: “Large Bore Column”
LD	Local desconhecido
LOD	Limite de detecção, do inglês: “ <i>Limit of detection</i> ”
LOQ	Limite de quantificação, do inglês “ <i>Limit of quantification</i> ”
MPV	Válvula de multiposição, do inglês: “ <i>Multi position valve</i> ”
ND	Não detectado
NIST	National Institute of standards and technology
PBET	Teste baseado na extração fisiológica, do inglês: “ <i>Physiological Based Extraction Test</i> ”
PP	Bomba peristáltica, do inglês: “ <i>Peristaltic pump</i> ”
PTFE	Politetrafluoretileno, do inglês: “ <i>Polytetrafluorethylene</i> ”
PVDF	Fluoreto de polivinilideno, do inglês: “Polyvinylidene fluoride”
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: “ <i>Relative standart deviation</i> ”
SBET	Teste simples de extração de bioacessibilidade, do inglês: “ <i>Simple Bioaccessibility Extraction Test</i> ”
SFC	Stirred flow cell
SGL	Linhaça dourada Espanha
SIA	Análise por injeção sequencial, do inglês: “Sequential-injection analysis”

SP	Bomba de seringa, do inglês: “ <i>Syringe pump</i> ”
SRM	Material de referência padrão, do inglês: “ <i>Standart reference material</i> ”
SV	Válvula de seleção, do inglês: “ <i>Selection valve</i> ”
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UBM	Unified Bioaccessibility Method
UE	União Europeia
USP	United States Pharmacopeia
WS	Gergelim branco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compartimentos do sistema digestivo. Fonte: http://portalbrasil10.com.br/sistema-digestorio-resumo/	44
Figura 2. Procedimento de extração <i>in vitro</i> baseado no método UBM desenvolvido pela BARGE (adaptado de WRAGG <i>et al.</i> , 2009)	49
Figura 3. Autores cujos métodos de digestão <i>in vitro</i> foram referenciados por outros pesquisadores.	50
Figura 4. Modelo de digestão <i>in vitro</i> adaptado de Oomen <i>et al.</i> (2003)	52
Figura 5. Modelo de digestão <i>in vitro</i> adaptado de Versantvoort <i>et al.</i> (2005).....	53
Figura 6. Diagrama esquemático do procedimento para avaliar a bioacessibilidade adaptado de Herrera <i>et al.</i> (2016). HC (canal central), MPV (válvula de multiposição) e PP (bomba peristáltica)	68
Figura 7. Diagrama esquemático da configuração experimental adaptada de Lamsal e Beauchemin (2015).	69
Figura 8. Diagrama esquemático do procedimento para avaliação da bioacessibilidade adaptada de Leufroy <i>et al.</i> (2012a)	70
Figura 9. Diagrama esquemático do procedimento para avaliação da bioacessibilidade adaptado de Leufroy <i>et al.</i> (2012b).	71
Figura 10. Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial aplicado na avaliação do procedimento de digestão de amostras de linhaça e gergelim.....	86
Figura 11. Análises de regressão linear entre os teores totais e as frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça e gergelim. BL: linhaça marrom, GL: linhaça dourada, WS: gergelim branco, BRS: gergelim marrom, BLS: gergelim preto.	105
Figura 12. Ilustração esquemática do sistema de fluxo com análise on-line acoplado ao ICP OES para monitoramento automático da extração GI <i>in vitro</i> de Mn, Fe e Cu em linhaça dourada e marrom. HC: Canal central, IV: Válvula de injeção, PP: Bomba peristáltica, SV: Válvula de seleção de posições múltiplas, C: Transportador: água Milli-Q.	118
Figura 13. Sistema de injeção sequencial hifenizado ao espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	119

Figura 14. Comparação de diferentes métodos de agitação para avaliação da bioacessibilidade gástrica de Cu, Fe e Mn em linhaça dourada do Brasil (n=3). Barras de erro significam desvio padrão.	130
Figura 15. Ilustração do gradiente de pH através do trato gastrointestinal simulado de digestões <i>in vitro</i> de linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL) obtidas por testes de extração dinâmicos baseados em fluxo.....	136
Figura 16. Ilustração de extratos de bioacessibilidade GI de Cu, Fe e Mn em linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL) para avaliação da cinética de lixiviação. A linha vertical pontilhada indica a separação entre as fases quimo e duodenal.	139
Figura 17. Comparação de porções bioacessíveis GI de Mn, Cu e Fe como obtidos pelo método de fluxo contínuo dinâmico em comparação com o método convencional de Versantvoort <i>et al.</i> (2005) em batelada para linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL). Barras de erro indicam desvio padrão.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais funções e deficiências de elementos essenciais e potencialmente tóxicos no organismo humano.	39
Tabela 2. Enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e gorduras adaptado de Sherwood (2010).	46
Tabela 3. Levantamento bibliográfico de métodos de digestão <i>in vitro</i> para determinação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos.	55
Tabela 4. Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES	74
Tabela 5. Constituintes e concentrações de vários sucos sintéticos do modelo de digestão <i>in vitro</i> representando condições de estado alimento, adaptado de Versantvoort (2005).....	76
Tabela 6. Massas (mg) e volumes (mL) dos reagentes para preparação de 500 mL de cada fluido, saliva (S), gástrico (G), duodeno (D) e bile (B) com 250 mL de solução inorgânico (I) e 250 mL de solução orgânica (O) adaptado de Wragg (2011).	77
Tabela 7. Identificação e estados de origem das amostras de linhaça.	78
Tabela 8. Identificação e estados de origem das amostras de gergelim.....	79
Tabela 9. Procedimento otimizado para decomposição em forno de micro-ondas das amostras de linhaça e gergelim.....	80
Tabela 10. Procedimento para decomposição do sobrenadante obtido após extração, adaptado de Peixoto <i>et al.</i> (2016).....	83
Tabela 11. Matrix do planejamento fatorial completo de dois níveis com os resultados das concentrações de carbono dissolvido para os digeridos.	85
Tabela 12. Valores de LOD, LOQ, equações das retas, coeficientes de determinação e faixa de trabalho para a determinação dos analitos por ICP OES, após decomposição das amostras em forno de micro-ondas.....	89
Tabela 13. Resultados do teste de repetitividade nas amostras de linhaça marrom e gergelim marrom para determinações por ICP OES (n=10).....	90
Tabela 14. Resultados obtidos pela análise do CRM NIST 3234 aplicando o método analítico proposto usando decomposição ácida assistida por micro-ondas e determinação por ICP OES.....	91

Tabela 15. Resultados obtidos pela análise do CRM NIST 1866 aplicando o método analítico proposto usando decomposição ácida assistida por micro-ondas e determinação por ICP OES.....	92
Tabela 16. Concentração dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos em amostras de linhaça e os valores da TACO (2011) e de Bolaños <i>et al.</i> (2016).....	94
Tabela 17. Concentração dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos em amostras de gergelim e os valores da TACO (2011) e de Bolaños <i>et al.</i> (2016).....	95
Tabela 18. Valores de bioacessibilidade gástrica (em %) para as amostras de linhaça e gergelim usando o método SBET, adaptado de Souza (2015).	97
Tabela 19. Validação da extração <i>in vitro</i> GI de Versantvoort em linhaça e gergelim	98
Tabela 20. Frações bioacessíveis de elementos essenciais de linhaça e gergelim de acordo com o tipo de amostra, usando método UBM.	100
Tabela 21. Resultados para concentração total e fração bioacessível para os elementos em dois materiais de referência certificado (farinha de arroz e farinha de soja) empregando método UBM.....	104
Tabela 22. Contribuição (%) do consumo de linhaça marrom e dourada para o IDR de elementos (15 g dia^{-1}).....	110
Tabela 23. Contribuição (%) do consumo de gergelim branco, preto e marrom para o IDR dos elementos (15 g dia^{-1}).....	110
Tabela 24. Comandos de injeção em fluxo sequencial para cada porta da válvula de seleção.....	117
Tabela 25. Condições de operação do equipamento ICP OES para determinação quantitativa de Cu, Fe e Mn.	122
Tabela 26. Comparação das concentrações bioacessíveis gástricas de Fe, Cu e Mn obtidas pelo sistema de extração dinâmico baseado em fluxo e fisiológico contra o procedimento convencional de extração em batelada.	131
Tabela 27. Concentrações bioacessíveis do quimo/GI de Mn, Cu e Fe em amostras de linhaça e validação do balanço de massa do sistema de extração fisiológica on-line.....	135
Tabela 28. Concentração das frações bioacessíveis GI e validação do balanço de massa de Cu, Fe e Mn em amostras de linhaça usando o método de Versantvoot (2005) em batelada.	142

SUMÁRIO

Capítulo I. Avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos: importância e métodos para determinação

1.Importância da avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos.....	38
2. Revisão da literatura	43
2.1 A digestão no trato gastrointestinal.....	43
2.2 Métodos para determinação da bioacessibilidade.....	46
2.3 Emprego de sistemas de análise em fluxo para avaliação da bioacessibilidade	64

Capítulo II. Comparação de métodos para o estudo da bioacessibilidade estática *in vitro* de micronutrientes em linhaça e gergelim

2. Objetivos.....	73
2.1 Objetivo Geral.....	73
2.2 Objetivos específicos	73
3. Experimental.....	73
3.1 Instrumentação	73
3.3 Amostras e materiais de referência.....	78
3.4 Otimização do procedimento de decomposição da amostra.....	79
3.5 Decomposição das amostras.....	80
3.6 Métodos de digestão <i>in vitro</i>	81
4.1 Otimização da decomposição das amostras assistida por radiação de micro-ondas.....	84
4.2 Validação do método proposto.....	87
4.3 Determinação do teor total de elementos em amostras de linhaça e gergelim	92
4.4 Emprego de diferentes métodos estáticos para avaliar a bioacessibilidade <i>in vitro</i> de Cu, Fe, Mn e Zn.....	96

4.4.1 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão <i>in vitro</i> SBET	96
4.4.2 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão <i>in vitro</i> de Versantvoort <i>et al.</i> (2005)...	97
4.4.3 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão <i>in vitro</i> UBM	99
4.5 Comparação da bioacessibilidade <i>in vitro</i> de Cu, Fe, Mn e Zn empregando diferentes métodos estáticos.....	106
4.6 Contribuição do consumo de linhaça e gergelim para ingestão diária recomendada.....	109
5. Considerações finais	111
Capítulo III. Sistema de microextração dinâmica de fluxo contínuo para avaliação <i>in vitro</i> automática da bioacessibilidade de Cu, Fe e Mn no quimo em linhaça	
2. Objetivos	113
2.1 Objetivo Geral.....	113
2.2 Objetivos específicos	113
3. Experimental	113
3.1 Reagentes, soluções e amostras.....	114
3.2 Instrumentação analítica	116
3.2.1 Diagrama de fluxo	116
3.2.2 Teste de extração dinâmica on-line para suporte de membrana.....	120
3.2.3 Aparelhos e técnica de detecção	121
3.3 Procedimento analítico para medida da bioacessibilidade do quimo on-line.....	123
3.4 Método em batelada.....	126
3.5 Avaliação operacional e variáveis analíticas.....	126
4. Apresentação e discussão dos resultados.....	127
4.1 Configuração do sistema	127

4.2 Investigação dos parâmetros experimentais.....	128
4.2.1 Investigação da relação sólido-líquido e método de agitação do ensaios de bioacessibilidade em batelada.....	128
4.2.2 Investigação da relação sólido-líquido e ensaio de bioacessibilidade dinâmica on-line.....	130
4.3 Avaliação do desempenho analítico	132
4.4 Comparação do conjunto de nutrientes bioacessíveis do quimo/GI contra extração em batelada.....	140
5. Considerações finais	144
6. Conclusões	145
7. Referências	147

Capítulo I. Avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos: importância e métodos para determinação

1. Importância da avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos

A avaliação e o controle da concentração de elementos químicos em amostras de alimentos têm despertado grande interesse da comunidade científica e entidades governamentais. Os elementos químicos que participam do metabolismo dos organismos vivos devem ser avaliados, mesmo em baixas concentrações, devido à necessidade do controle da ingestão diária dos elementos essenciais ou não, e sua correlação com a saúde destes organismos. Os elementos comumente presentes nas dietas são classificados de acordo com três categorias: indispensáveis (necessários em maiores quantidades como Ca e Mg); essenciais (importantes para as funções fisiológicas, porém em níveis elevados podem ser tóxicos como Co e Mn); e não essenciais ou tóxicos (tem função desconhecida como Cd e Pb) (LEAL et al, 2009).

No entanto, as necessidades dos indivíduos são distintas, mesmo que possuam estruturas semelhantes. Desta forma, a distribuição da necessidade de um nível de ingestão de segurança é o parâmetro mais adequado para se estimar a importância dos elementos. A Tabela 1 apresenta diferentes elementos químicos, essenciais ou potencialmente tóxicos, com suas principais funções e suas respectivas consequências causadas pela sua deficiência. Sabendo que o excesso ou deficiência de qualquer um desses elementos podem causar danos ao organismo do ser humano e que o desequilíbrio na concentração deles pode causar a morte, sendo de extrema importância ter uma alimentação adequada como alternativa para manter o bom funcionamento do corpo humano (SANTOS, 2012).

Tabela 1. Principais funções e deficiências de elementos essenciais e potencialmente tóxicos no organismo humano.

Elementos	Funções	Deficiência
Al	Não essencial	-
Ca	Constituinte dos ossos	Crescimento retardado do esqueleto
Cd	Não essencial e tóxico	-
Co	Vitamina B ₁₂	Anemia perniciosa
Cr (III)	Provavelmente envolvido no metabolismo da glicose	Sintomas de diabetes
Cu	Transporte do oxigênio e função enzimática	Enfraquecimento das artérias, desordem do fígado e anemia secundária
Fe	Transporte de oxigênio e hemoglobina	Anemia e desordem do sistema imunológico
Hg	Não essencial e tóxico	-
K	Principal cátion intracelular	Alterações na pressão arterial
Mg	Funções enzimáticas	Paralisia de determinados músculos
Mn	Função enzimática	Infertilidade e diminuição do esqueleto
Mo	Função enzimática	Retardamento de crescimento celular e propensão à cáries
Na	Principal cátion extracelular	Alterações na pressão arterial
Ni	Função ainda não estabelecida	Crescimento depressivo e dermatite
Zn	Função estrutural e enzimática	Danos na pele, impede o crescimento e maturação sexual retardada

Fonte: Adaptado de Linder (1991), Brody (1999) e CHEDL (2009)

Existem diversos métodos analíticos para determinação de metais em uma amostra, quer diretamente através de técnicas analíticas não destrutivas ou após digestão ácida utilizando técnicas espectrométricas de emissão e/ou absorção atômica. O procedimento de extração e/ou digestão químicas deve estar de acordo com a matriz da amostra e os elementos de interesse, com o intuito de preservar as espécies dos analitos. É importante compreender que, apesar das condições escolhidas (alcalina, ácida ou enzimática), apenas as espécies solúveis são capazes de serem extraídas no processo (INTAWONGSE e DEAN, 2006; RUZIK, 2012).

A determinação da concentração total de um elemento químico é de extrema importância, mas, a simples presença do nutriente nos alimentos não garante sua total utilização pelo organismo. Isto é, a concentração de um nutriente em um determinado alimento não é um indicador confiável para avaliar este alimento sob o ponto de vista nutricional. (COZZOLINO, 2005). Conseqüentemente, os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade de um nutriente foram propostos pela comunidade científica para que se possa distinguir o que está sendo determinado, se a bioacessibilidade ou a biodisponibilidade. (FENNEMA et al, 2008).

Na área de farmacologia, nos Estados Unidos, o termo biodisponibilidade surgiu pelo *Food and Drug Administration* (FDA) com a intenção de estabelecer em que proporção um medicamento era absorvido, chegava à circulação e finalmente se tornava disponível. No entanto, somente na área de nutrição, que esse termo passou a ser mais discutido pelo fato de entender que somente a presença do nutriente no alimento não quer dizer que será absorvido pelo corpo humano. Inicialmente definiu-se o termo biodisponibilidade como a fração do nutriente que é digerido, absorvido e metabolizado pelo corpo humano. Porém, segundo O'Dell, bioquímico, a biodisponibilidade é a porção do nutriente que será absorvida e utilizada pelo organismo, visto que nem todos os nutrientes precisam ser digeridos para serem absorvidos e, ainda que sejam absorvidos, podem não ser metabolizados (COZZOLINO, 2005).

Finalmente, na Conferência Internacional de Biodisponibilidade na Holanda, em Wageningen, pôde-se redefinir o termo de biodisponibilidade como sendo a porção disponível de qualquer nutriente que é efetivamente absorvida em uma forma que possa ser utilizada pelo organismo em seu metabolismo celular. A biodisponibilidade influencia no efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos, assim como pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva (COZZOLINO, 2005).

A bioacessibilidade foi inicialmente definida como a quantidade de nutriente em um alimento que é liberado no trato gastrointestinal durante a digestão (RUBY et al., 1999). Nos últimos anos, a bioacessibilidade tem sido definida como a fração do composto que é liberado da matriz do alimento no trato gastrointestinal, e assim, torna-se disponível para absorção intestinal (INTAWONGSE e DEAN, 2006).

Atualmente, o termo bioacessibilidade é definido como a quantidade de um composto ingerido que é solubilizado da matriz alimentar após a digestão gastrointestinal (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Observou-se que, ao longo dos anos, não houve muitas alterações a respeito do conceito de bioacessibilidade, mas, é importante ter o cuidado de saber em que momento se está avaliando a bioacessibilidade e não a biodisponibilidade, para que não ocorra um erro conceitual. Desta forma, o conteúdo do alimento (nutriente) que é liberado durante a digestão (bioacessibilidade), será a fração bioacessível disponível para absorção, no entanto, apenas uma parte da fração bioacessível estará disponível para ser usado nas funções fisiológicas do organismo (biodisponibilidade) (OOMEN *et al.*, 2002).

Alguns métodos empregados para estimar a bioacessibilidade de micronutrientes contam com diferentes abordagens, podendo ser testes *in vivo* ou *in vitro*. Os testes *in vivo* são feitos para simular uma exposição ao material a ser investigado e fazem uso de cobaias, como ratos, macacos e coelhos, sendo a fração bioacessível determinada pela análise das unhas, pelos e sangue desses animais após administração da dieta. Esses testes requerem a presença de profissionais especializados e de uma infraestrutura adequada, além de serem de alto custo e exigirem maior tempo de execução. Já os testes *in vitro*, são extrações que simulam as condições fisiológicas durante a digestão humana, levando em consideração as três áreas do sistema digestivo: boca, estômago e intestino. Esses testes podem ser atrativos devido a maior velocidade analítica e baixo custo (BOSSO e ENZWEILLER, 2008; OOMEN *et al.*, 2002).

A importância da avaliação da bioacessibilidade de micronutrientes em amostras alimentícias está relacionada com as quantidades recomendadas de ingestão dos elementos essenciais em dietas, que deve suprir alguma necessidade do indivíduo. A deficiência de micronutrientes, como cálcio, ferro e zinco, são muito difundidas em países desenvolvidos e é causa de grande preocupação na alimentação da população. Muitos fatores são responsáveis pela deficiência desses micronutrientes e um deles é a ingestão diária inadequada (PLATEL, EIPESON e SRINIVASAN, 2010).

O mau funcionamento ou o não funcionamento do sistema digestivo pode ser fonte de muitos problemas de saúde que podem interferir na qualidade de vida (SHERWOOD, 2010). Portanto, a avaliação da bioacessibilidade é um importante parâmetro para realizar a avaliação de risco à saúde e nutricional e, dessa forma, permite-se obter informações nutricionais e importantes como, por exemplo, para a Tabela Brasileira de Composição Química de Alimentos (TACO), (TACO, 2011).

Os consumidores tem aumentado o interesse pela relação dieta e saúde, a qual pode ser notada pelo aumento da demanda por alimentos funcionais. Os alimentos funcionais são aqueles que suprem as necessidades fisiológicas do indivíduo (MORAES E COLLA, 2006; COUTO E WICHMANN, 2011).

Linhaça e gergelim podem ser considerados alimentos funcionais e são fortemente recomendados por especialistas, tais como nutricionistas, porque esses alimentos contêm elementos essenciais para a saúde humana, ômega-3, lignina e proteína (MOHDALY *et al.*, 2011; CUEVAS E SANGRONIS, 2011; TOKALIOĞLU, 2012; KIM *et al.*, 2014; BOLAÑOS, MARCHEVSKY E CAMIÑA). Esses componentes são importantes para manter a homeostase do corpo humano, além de garantir efeitos benéficos na regulação hormonal e na prevenção de doenças, como câncer e diabetes (KATARE *et al.*, 2012; BOLAÑOS, MARCHEVSKY E CAMIÑA, 2016).

Os efeitos positivos do consumo da linhaça e do gergelim na saúde humana, além da nutrição básica, explicam o interesse da indústria alimentícia em lançar no mercado sementes de linhaça e gergelim em barras, barras energéticas, cereais e biscoitos. No entanto, a mera ocorrência de nutrientes nos alimentos não garante por si só a sua disponibilidade para o corpo humano após a ingestão.

Para avaliar os teores reais de nutrientes que são liberados no trato gastrointestinal (GI) e estão disponíveis para absorção intestinal, métodos *in vivo* têm sido desenvolvidos nas últimas décadas. Entretanto, testes *in vivo* que usam modelos animais são eticamente controversos, demorados, custam caro e exigem pessoal especializado e treinado (NGUYEN *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2015). Por conseguinte, os regulamentos da União Europeia (por exemplo, o REACH) (SCHOETERS, 2010) sugeriram a substituição de ensaios *in vivo* por homólogos *in vitro* como substitutos para a bioacessibilidade oral sem necessidade de modelos

animais. Essas simulações ajudam os cientistas a avaliar a saúde individual e nutricional do ser humano, conforme foi citado no Capítulo I desta tese.

Diferentes métodos *in vitro* tem sido aplicados para avaliar a bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em várias amostras de alimentos, como, por exemplo, soja (HERRERA *et al.*, 2016), mas não há avaliação da bioacessibilidade de elementos em amostras de linhaça e gergelim. Os métodos *in vitro* são bastante diferentes de um para o outro. Além disso, muitos deles não simulam devidamente os fluidos gastrointestinais e não levam em consideração todos os reagentes envolvidos para cada compartimento digestivo (PEIXOTO *et al.*, 2016; LLORENTE-MIRANDES *et al.*, 2016; KHANAM E PLATEL *et al.*, 2016; KAFAOGLU *et al.*, 2016).

Assim sendo, a comparação de diferentes métodos para avaliação da bioacessibilidade, desde o mais simples (SBET) até àqueles mais completos (UBM), é importante para entender o seu ampliado uso e as suas limitações. Desta forma, o método de bioacessibilidade unificado (UBM) é uma excelente alternativa porque simula uma digestão gastrointestinal completa (WRAGG *et al.*, 2011; HERRERA *et al.*, 2016; TOKALIOĞLU *et al.*, 2014).

2. Revisão da literatura

2.1 A digestão no trato gastrointestinal

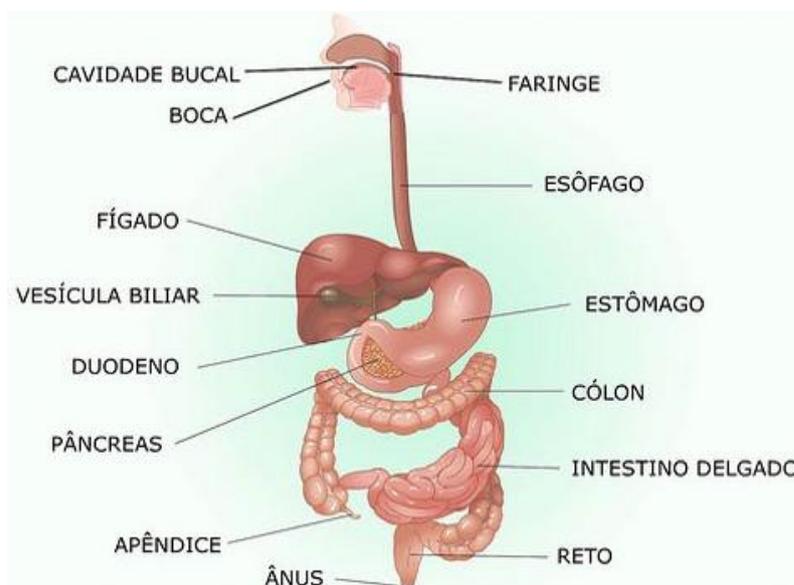
Há um antigo ditado que diz: “Você é o que você come”, possivelmente pode ser mais exato se escrito: “Você é o que você digere e absorve” (SHERWOOD, 2010). Essa parte da revisão da literatura apresenta a importância dessas duas funções do sistema digestivo, a digestão e a absorção. O sistema gastrointestinal é responsável pela degradação e absorção de vários alimentos necessários para o bom funcionamento do corpo humano. Para compreender as interações envolvidas entre os diferentes componentes da comida no processo de digestão é preciso entender que ocorrem dois processos principais ao mesmo tempo durante a digestão: a digestão mecânica e a digestão química.

A digestão mecânica começa na boca e continua dentro do estômago, nesse processo, pedaços maiores de alimentos são quebrados em pedaços menores enquanto está se preparando para a digestão química. A digestão química também começa na boca e continua dentro do intestino, nesse processo, várias enzimas diferentes quebram macromoléculas em moléculas menores que podem ser absorvidas (SHERWOOD, 2010).

O trato gastrointestinal é iniciado pela boca e prossegue para o esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e depois para o intestino grosso (cólon), reto e termina no ânus (Figura 1). Ao ingerir uma porção de um determinado alimento, este passa pelos compartimentos do trato gastrointestinal, primeiramente na boca onde há a presença do fluido salivar. Em seguida, passa pelo estômago no qual está presente o fluido gástrico e, por fim, o intestino cujos fluidos encontrados são o fluido duodenal e biliático.

A simples ingestão de alimentos não garante que ocorra a absorção dos nutrientes pelo organismo, por isso, é preciso que os alimentos sejam digeridos ou que se reduzam em moléculas menores e mais simples para que possam ser absorvidos pelo corpo humano. As transformações que ocorrem no sistema digestivo são auxiliadas por enzimas digestivas que degradam gorduras em glicerol e ácidos graxos, carboidratos em açúcares simples e proteínas em aminoácidos (PEIXOTO, 2015).

Figura 1. Compartimentos do sistema digestivo. Fonte: <http://portalbrasil10.com.br/sistema-digestório-resumo/>



A saliva produzida pela boca é composta basicamente por água, a qual tem a função de lubrificar a cavidade oral e umedecer os alimentos ingeridos, e também, contém a enzima amilase que age na quebra de polissacarídeos em dissacarídeos. No entanto, essa enzima tem sua atuação interrompida quando chega ao estômago, devido ao baixo pH do meio e, portanto não é tão significativa no processo de digestão. Ao chegar ao compartimento estomacal, começam os processos de digestão proteica, em meio ácido e com enzimas, como a pepsina. Nessa fase é produzido o quimo que é o líquido composto pelos alimentos ingeridos e os fluidos salivares e gástricos (SHERWOOD, 2010).

O quimo acidificado passa para o duodeno (onde os sucos pancreáticos e biliares entram no intestino), o qual é neutralizado pelo bicarbonato de sódio e secretado pelo pâncreas. O intestino delgado tem como função absorver os nutrientes ingeridos através da alimentação e, por conta disso, age, também, como uma barreira às enzimas digestivas e espécies não utilizadas pelo organismo, selecionando apenas a entrada de nutrientes (PEIXOTO, 2015). O intestino grosso não é levado em conta por que os estudos realizados de digestão *in vivo* apontam que a absorção ocorre principalmente no intestino delgado (OOMEN *et al.*, 2003). Por essa razão, a bioacessibilidade é determinada no compartimento do intestino delgado.

A Tabela 2 apresenta as enzimas que são responsáveis pela digestão de carboidratos, proteínas, ácido nucleico e gorduras, bem como o compartimento onde são produzidos e liberados, e o meio se neutro, básico ou ácido. Nota-se que as enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos são produzidas na glândula salivar, no pâncreas e intestino delgado, cujo meio é neutro e básico, respectivamente. O único meio ácido é encontrado na digestão de proteínas, na qual a enzima pepsina atua, sendo produzida na glândula gástrica e liberada no estômago (SHERWOOD, 2010).

De acordo com o que foi abordado sobre o processo de digestão dos alimentos, no trato gastrointestinal e absorção dos elementos essenciais e potencialmente tóxicos no organismo, é importante avaliar a bioacessibilidade para saber se as quantidades dos elementos ingeridos por meio dos alimentos estão sendo liberados nos compartimentos digestivos para entender os riscos que podem ser ocasionados pelos mesmos, além da avaliação nutricional.

Tabela 2. Enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e gorduras adaptado de Sherwood (2010).

Enzima	Produzido	Liberado	Meio
Digestão de carboidratos:			
Amilase salivar	Glândula salivar	Boca	Neutro
Amilase pancreática	Pâncreas	Intestino delgado	Básico
Maltase	Intestino delgado	Intestino delgado	Básico
Digestão de proteínas:			
Pepsina	Glândula gástrica	Estômago	Ácido
Tripsina	Pâncreas	Intestino delgado	Básico
Peptidases	Intestino delgado	Intestino delgado	Básico
Digestão de ácido nucleico:			
Nuclease	Pâncreas	Intestino delgado	Básico
Nucleosidades	Pâncreas	Intestino delgado	Básico
Digestão de gorduras:			
Lipase	Pâncreas	Intestino delgado	Básico

2.2 Métodos para determinação da bioacessibilidade

Estudos realizados nos últimos 10 anos mostram que há uma intensa investigação a respeito da avaliação da bioacessibilidade (KHOUZAM *et al.*, 2011; POHL *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012; HE e WANG, 2013; GAO e WANG, 2014; AFONSO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2016, SILVA *et al.*, 2017; AFONSO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019) em diversos tipos de amostras com o objetivo de determinar elementos essenciais e potencialmente tóxicos, empregando técnicas variadas de detecção e diferentes procedimentos de decomposição total e bioacessível. Com base na revisão da literatura, ao longo dos anos, observou-se que existe uma grande quantidade de métodos *in vitro* como referência (MILLER *et al.*, 1981; RUBY *et al.*, 1999; LAPARRA *et al.*, 2003; OOMEN *et al.*, 2003; VERSANTVOORT *et al.*, 2005; WRAGG *et al.*, 2009) para simulação do trato gastrointestinal, seja para avaliar a bioacessibilidade desde a boca até o intestino, ou apenas cada parte individual do sistema digestivo.

Miller *et al.* (1981) foram um dos primeiros pesquisadores a descreverem um método *in vitro* para avaliar a disponibilidade de ferro em amostras de alimentos. O método empregado faz a simulação da digestão no trato gastrointestinal, inicialmente simulando a fase gástrica, na qual as amostras de alimentos são homogeneizadas e em seguida expostas à enzima pepsina em pH 2. Já na simulação da fase intestinal, usou-se a diálise para ajustar os níveis de pH e a digestão foi mantida após adição de sais biliares e pancreatina. Os resultados mostraram que o método proposto pode ser utilizado como indicador da avaliação da bioacessibilidade de ferro, considerando que esse modelo é capaz de avaliar a absorção de ferro que pode ser influenciada por alimentos que possuem ácido ascórbico.

Um dos métodos comumente empregados para estimar a bioacessibilidade dos elementos é conhecido como ensaio SBET (*Simple Bioaccessibility Extraction Test*), utilizado para simular as condições gástricas do estômago, devido ao baixo pH do meio, levando em consideração a temperatura corpórea e o tempo de digestão, mas não leva em consideração o compartimento intestinal. Nesse método utiliza-se apenas glicina, que é o aminoácido mais simples produzido pelo corpo humano, e ácido clorídrico, sendo inicialmente aplicado em amostras de solo (OOMEN *et al.*, 2002).

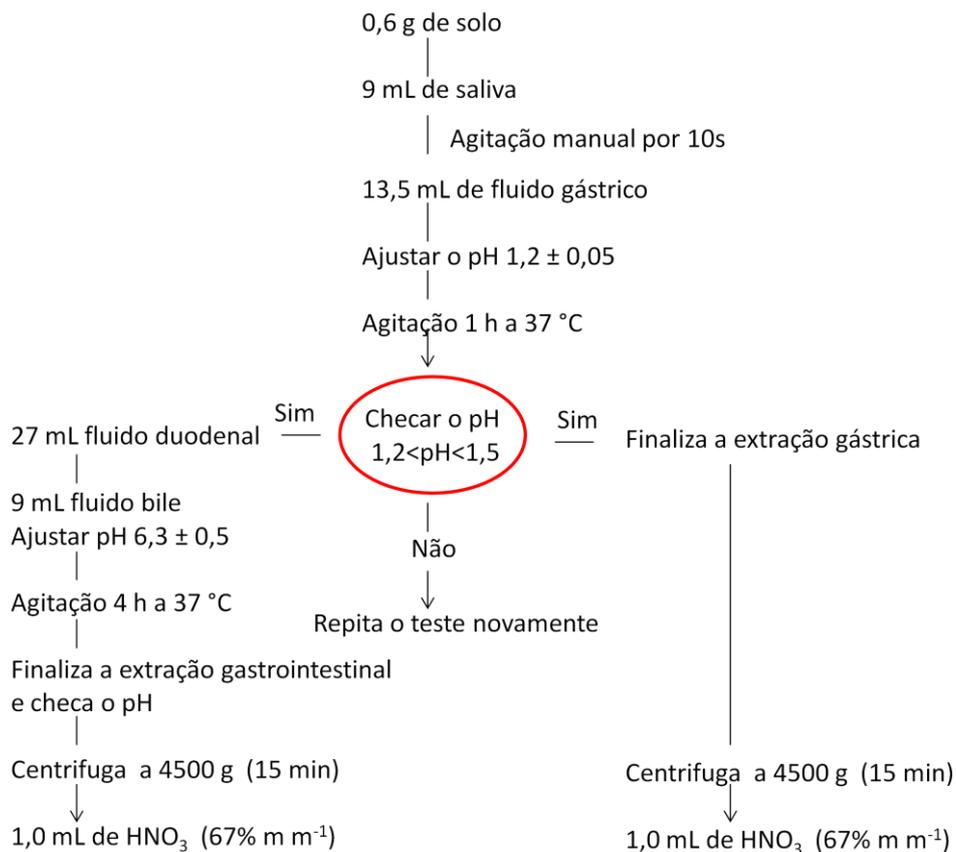
Em trabalhos prévios realizados neste grupo de pesquisa, Souza (2015) empregou o método de digestão *in vitro* SBET para avaliar a bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn em amostras de linhaça e gergelim moídas em diferentes tempos (10 segundos para simular a trituração da mastigação e 60 segundos para simular a farinha da forma como é comercializada) por ICP OES. Os resultados apresentaram maiores teores bioacessíveis para as amostras trituradas em um maior tempo de moagem, o que implica em um menor tamanho de partícula e, portanto aumento da área superficial. A maior bioacessibilidade foi notada para Ca, seguida de Mg, Zn e K e a menor bioacessibilidade foi observada para Fe, devido as amostras de linhaça e gergelim apresentarem, em sua composição, teores de ácido fítico. Os fitatos derivados do ácido fítico formam quelante com íons divalentes, formando complexos solúveis resistentes às soluções do trato gastrointestinal diminuindo a bioacessibilidade dos minerais.

Outro método bastante empregado para determinar o teor bioacessível é o ensaio PBET (*Physiological Based Extraction Test*) que simula parâmetros gastrointestinais de humanos (RUBY *et al.*, 1999). Neste método, utiliza-se uma solução gástrica preparada com pepsina, malato e citrato de sódio, ácido acético, ácido láctico e ácido clorídrico. Para a simulação do trato intestinal, utilizam-se sais de bile, pancreatina e bicarbonato de sódio saturado.

De acordo com os trabalhos investigados, notou-se que a maioria avaliou a fase gástrica e intestinal (KHOUZAM *et al.*, 2011; POHL *et al.*, 2012; PEIXOTO *et al.*, 2013; ZACCARI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2016; WOJCIESZEK *et al.*, 2016; LLORENTO-MIRANDES *et al.*, 2016; KHANAM E PLATEL, 2016; STELMACH, SZYMCZYCHA-MADEJA e POHL, 2016) e a minoria avaliou o sistema digestivo completo desde a saliva (HE e WANG, 2013; GAO e WANG, 2014; SILVA *et al.*, 2015; AFONSO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015). Ainda que se tenha uma avaliação da bioacessibilidade do sistema digestivo completo, pôde-se observar que os métodos empregados para avaliação da fração bioacessível dos elementos químicos nas amostras de alimentos são bastante distintos para comparar informações semelhantes.

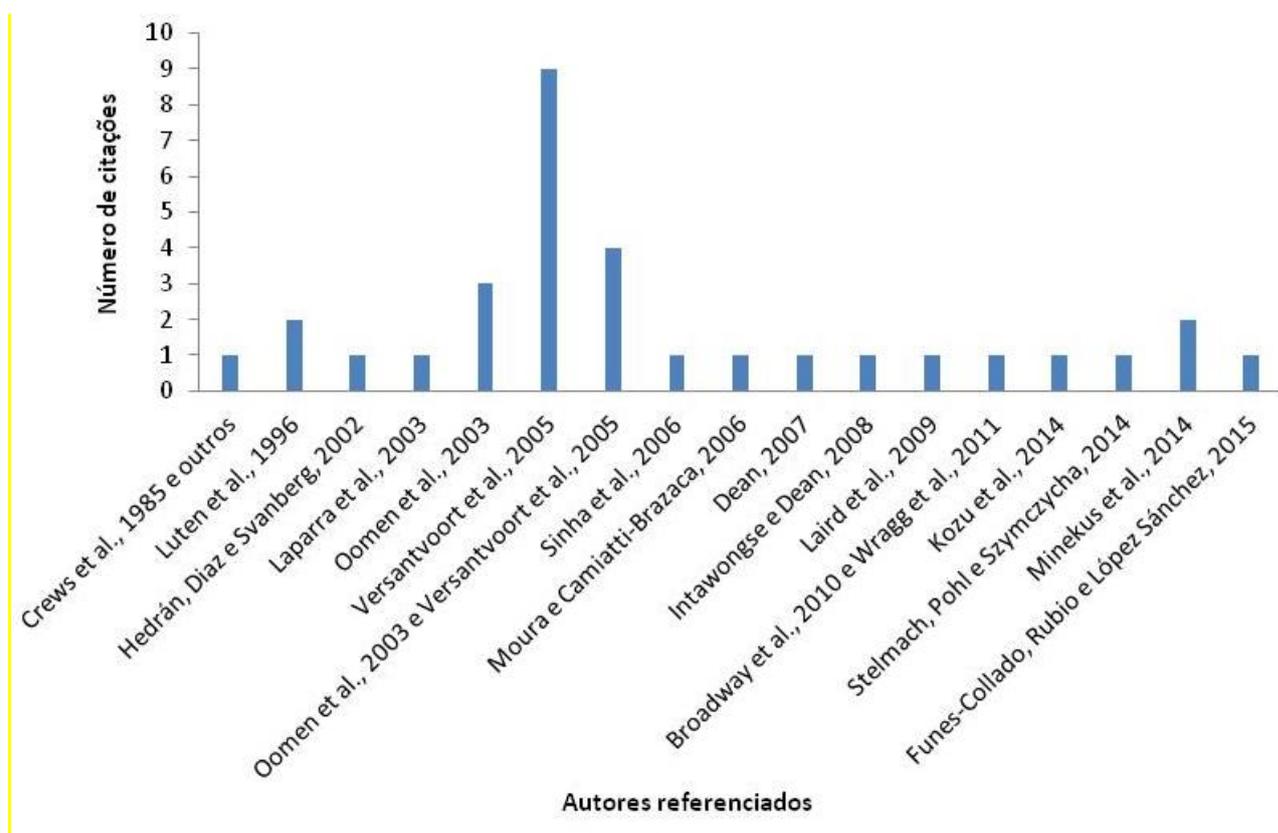
Na Europa, foi desenvolvido um método universal pela BARGE (*Bioaccessibility Research Group of Europe*) para determinação da bioacessibilidade em amostras de solos contaminados, que é o UBM (*Unified Bioaccessibility Method*), com o objetivo de fazer uma avaliação de risco à saúde humana, conforme apresentado na Figura 2. A avaliação do método de bioacessibilidade unificado foi realizado por meio de uma comparação interlaboratorial e o relatório completo do estudo interlaboratorial da UBM intitulado de “*Inter-laboratory trial of a unified bioaccessibility testing procedure*” (WRAGG *et al.*, 2009) está disponível no NORA NERC Open Research Archive. No Brasil, ainda não se tem um método único que defina os parâmetros para avaliação do teor bioacessível nas amostras, principalmente em alimentos, e, portanto, tem-se utilizado diversos métodos para simulação do sistema gastrointestinal.

Figura 2. Procedimento de extração *in vitro* baseado no método UBM desenvolvido pela BARGE (adaptado de WRAGG *et al.*, 2009)



A Figura 3 totaliza 32 artigos estudados que recentemente avaliaram a bioacessibilidade de elementos em amostras de alimentos empregando método de digestão *in vitro*. Cada coluna representa o número de citações do trabalho por autores que são referenciados por terem seu método de digestão *in vitro* aplicado e/ou adaptado com algumas modificações e quantas vezes foram citados como referência por outros autores.

Figura 3. Autores cujos métodos de digestão *in vitro* foram referenciados por outros pesquisadores.



Os artigos investigados foram do período de 2010 a 2019, sendo os artigos são referenciados por estes entre de 1985 a 2015, conforme apresentado na Figura 3. Por exemplo, Souza *et al.* (2019), determinaram a fração bioacessível de Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Ti e Zn em cereais infantis, empregando o método de digestão *in vitro* descrito por Minekus *et al.* (2014). Outros pesquisadores, como Lin *et al.*, (2019), também aplicaram o método de digestão *in vitro* descrito por Minekus *et al.* (2014), em amostras de arroz comercial para determinação da bioacessibilidade de Hg. Já Francisco *et al.* (2018) realizaram a avaliação da bioacessibilidade de Mg, Mn, Co, I, Cd, Pb, As e Hg em amostras de *Fucus spiralis* empregando o método de digestão *in vitro* de Versantvoort *et al.* (2005). Peixoto *et al.* (2016) avaliaram a bioacessibilidade de diversos elementos químicos em amostras de chocolate e o método *in vitro* aplicado foi descrito inicialmente por Laparra *et al.* (2003).

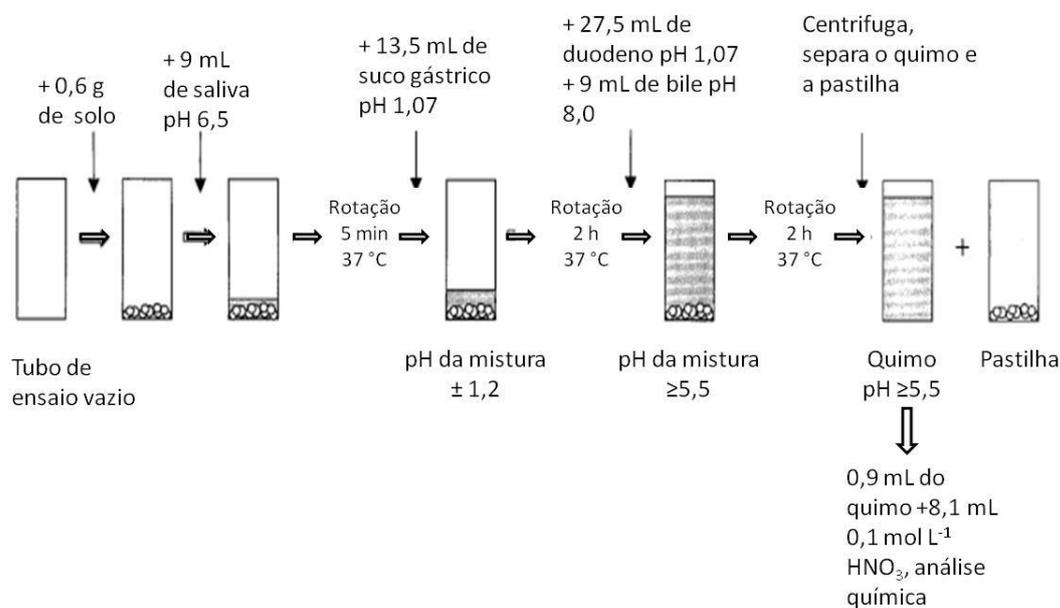
Conforme apresentado na Figura 3, dentre os 32 artigos estudados de 2010 a 2019, Minekus *et al.* (2014) foram citados 2 vezes por diferentes pesquisadores.

Nota-se, também, que Laparra *et al.* (2003) foram referenciados apenas uma vez, assim como os outros 11 autores. Isso sugere que há uma grande quantidade de métodos de digestão *in vitro* distintos sendo aplicados por diversos pesquisadores. No entanto, pôde-se perceber, também, que dois autores são mais comumente referenciados, que é o caso de Oomen *et al.* (2003), citado 3 vezes, e Versantvoort *et al.* (2005) que foi citado 9 vezes. Vale ressaltar que esse trabalho referencia o trabalho de Oomen *et al.* (2003) e esses dois autores são referenciadas juntos em 4 trabalhos.

Laparra *et al.* (2003) estimaram a bioacessibilidade de arsênio total e arsênio inorgânico e o efeito do cozimento em algas comestíveis empregando procedimento de digestão *in vitro* com pepsina a pH 2 e extrato pancreatina-bile a pH 7. Luten *et al.* (1996) foram citados pelos pesquisadores Platel, Eipeson e Srinivasan (2010) que estudaram a bioacessibilidade do conteúdo mineral em amostras de milho, trigo e cevada. Hédren, Diaz e Svanberg (2002) tiveram seu trabalho reproduzido pelos autores Zaccari *et al.* (2015), que estimaram a bioacessibilidade *in vitro* de β -caroteno, Ca, Mg e Zn em cenouras.

Oomen *et al.* (2003) desenvolveram um modelo de digestão *in vitro* para estimar a bioacessibilidade de contaminantes em solos. Nesse estudo, fizeram uma avaliação dos compartimentos que compõem o sistema gastrointestinal (boca, estômago e intestino delgado), a temperatura do corpo humano, o tempo da digestão, centrifugação para separar as fases, níveis de pH e agitação, com base nessas otimizações foi possível propor um modelo de digestão *in vitro* conforme apresentado na Figura 4.

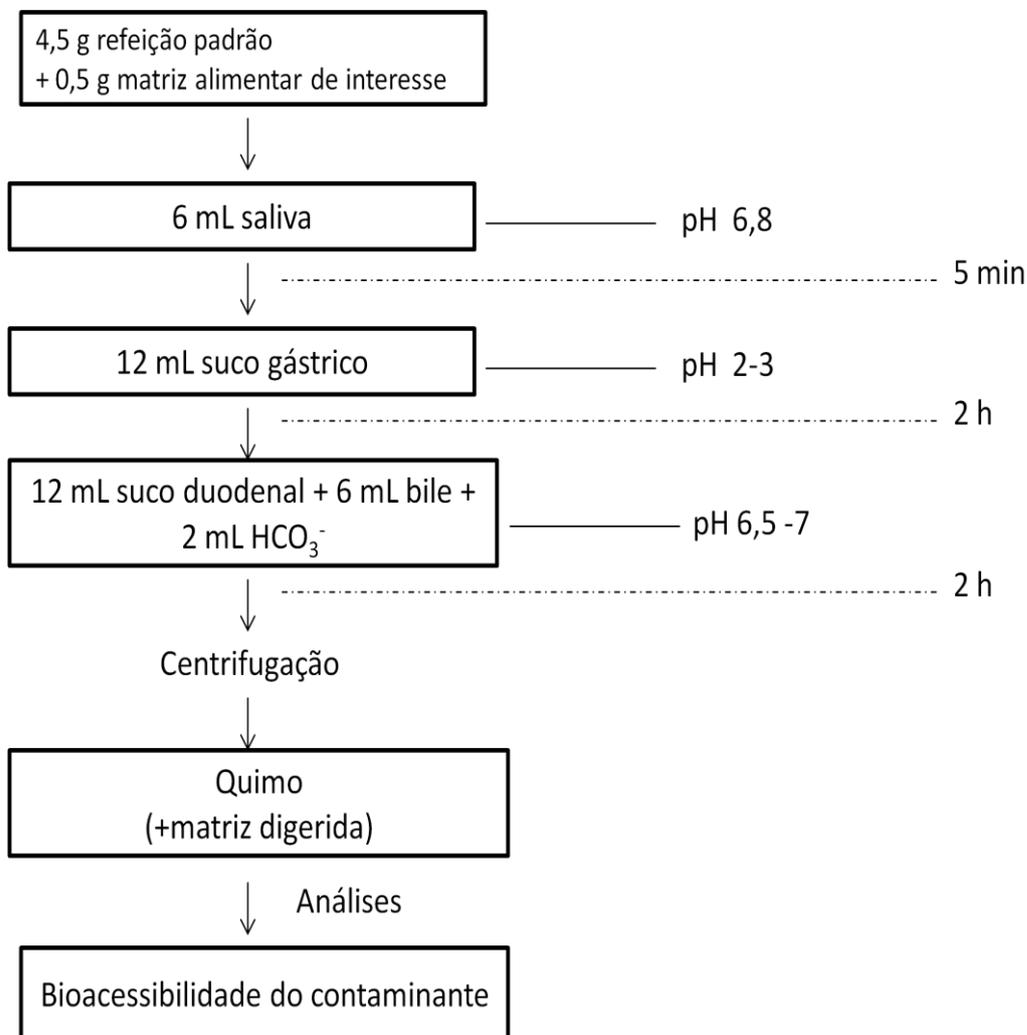
Figura 4. Modelo de digestão *in vitro* adaptado de Oomen *et al.* (2003)



Versantvoort *et al.* (2005) verificaram a aplicabilidade de um modelo de digestão *in vitro* permitindo a avaliação da bioacessibilidade da ingestão de micotoxinas de alimentos como indicador da biodisponibilidade oral. Nota-se que os reagentes e soluções inorgânicas utilizadas (KCl, NaH₂PO₄, KSCN, Na₂SO₄, NaCl, CaCl₂, NH₄Cl, NaHCO₃, KH₂PO₄, MgCl₂, NaOH, HCl; soluções orgânicas: ureia, glicose, ácido glucurônico e cloridrato de glucosamina e enzimas: alfa amilase, mucina, ácido úrico, albumina de soro bovino, pepsina, pancreatina, lipase e bile), foram os mesmos do modelo proposto por Oomen *et al.* (2003) e aplicado por Versantvoort *et al.*, (2005) e o que diferencia entre eles é a quantidade dos volumes gastos para simular cada compartimento.

Por exemplo, Oomen *et al.* (2003) utilizam um volume de 9 mL da Saliva + 13,5 mL do suco gástrico + 27 mL do suco duodenal + 9 mL da bile, enquanto que Versantvoort *et al.* (2005) fazem uso de um volume de 6 mL da saliva + 12 mL do suco gástrico + 12 mL do suco duodenal + 6 mL da bile + 2 mL de bicarbonato de sódio. Esse modelo pode ser observado na Figura 5. Vale ressaltar que o modelo faz referência a um estudo realizado por Versantvoort *et al.* (2004), o qual deu margens para a aplicabilidade do modelo de digestão *in vitro* em questão.

Figura 5. Modelo de digestão *in vitro* adaptado de Versantvoort *et al.* (2005)



Posteriormente ao estudo desses modelos de digestão *in vitro* amplamente empregados por outros pesquisadores, foi possível encontrar na literatura alguns trabalhos que aplicaram o modelo, sugerindo modificações, dentre estes trabalhos dois serão citados a seguir. O primeiro trabalho foi o de Tokalioglu *et al.* (2014) no qual avaliaram a bioacessibilidade de Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se e Zn em suplementos nutricionais por ICP-MS e empregando com algumas adaptações o Método de Bioacessibilidade Unificado (UBM) (WRAGG *et al.* 2011). Inicialmente, reduziram a massa da amostra de 0,60 g para 0,30 g, em seguida o fluido salivar, gástrico, duodenal e bile foram reduzidos à metade, o que permaneceu igual foi a

agitação manual do fluido salivar e o tempo de incubação da fase gástrica. Já na fase intestinal o tempo foi reduzido para uma hora.

O segundo trabalho estudado foi o de Silva *et al.* (2015) que avaliaram a bioacessibilidade de Al, Cd, Fe e Zn em amostras de alface e couve por ICP-MS. O método *in vitro* aplicado foi baseado no modelo de Versantvoort *et al.* (2005) com algumas modificações, por exemplo, os volumes da saliva, suco gástrico e duodenal, bile e bicarbonato de sódio foram reduzidos à metade. O tempo de incubação da saliva permaneceu o mesmo por 5 minutos, o tempo de incubação da fase gástrica foi reduzido à metade e, da fase intestinal, aumentou em uma hora.

Diante da diversidade de trabalhos relacionados à bioacessibilidade encontrados na literatura, foi feita uma investigação dos trabalhos realizados entre (2011 a 2019), apenas para amostras de alimentos. Na Tabela 3, estão apresentados, ao todo, 26 trabalhos, identificando em qual fase foi feita a simulação *in vitro*, quais os analitos determinados, quais amostras de alimentos foram analisadas, considerando o procedimento de decomposição total e a técnica analítica de detecção. Destes 26 trabalhos estudados, 16 artigos serão discutidos mais detalhadamente as informações sobre os métodos.

A maioria dos trabalhos investigados empregou ICP OES como técnica de aplicação (LIMA *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2016; LLORENTO-MIRANDES *et al.*, 2016; KHANAM e PLATEL, 2016; KAFAOGLU *et al.*, 2016;), ICP-MS (KHOUZAM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015; KAFAOGLU *et al.*, 2016) e F AAS, GF AAS, HR CS AAS (ZACCARI *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2016; STELMACH, SZYMCZYCHA-MADEJA e POHL, 2016). Muitos destes trabalhos estudados utilizaram o forno de micro-ondas com cavidade para decomposição das amostras e avaliação do teor total dos elementos, e o que difere entre eles foi o método de digestão *in vitro* utilizado para a avaliação do teor bioacessível.

Tabela 3. Levantamento bibliográfico de métodos de digestão *in vitro* para determinação da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de alimentos.

Fase	Analito	Amostra	Preparo da amostra	Técnica de detecção	Referência
Saliva, gástrica e intestinal	Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ti e Zn	Cereais infantil	Bloco digestor	MIP OES	Souza <i>et al.</i> , 2019
Gástrica e intestinal	Mn, Sr, Cd, Sn, I, Cu e Ni	Algas verdes	Micro-ondas	ICP-MS	Afonso <i>et al.</i> , 2018
Gástrica e intestinal	Mg, Mn e Fe	Chás	Micro-ondas	ICP-MS	Erdemir, 2018
Gástrica e intestinal	Fe e Zn	Milho, sorgo e painço fermentados	Mufla	ICP OES	Gabaza <i>et al.</i> , 2018
Gástrica e intestinal	Ca, Cu, Fe, Mg e Zn	Proteína bruta em carne bovina, suína e frango	Micro-ondas	ICP OES e GF AAS	Menezes <i>et al.</i> , 2018
Gástrica e intestinal	K, Ca, Mg e P	Leguminosas	Micro-ondas	ICP OES e ICP-MS	Santos <i>et al.</i> , 2018
Gástrica e intestinal	Te	Castanha do Pará	Micro-ondas	ICP-MS	Berenguel, Pessôa e Arruda, 2018
Gástrica e intestinal	Al, Ba, Cu, Fe, Mn e Zn	Amoras, framboesas, mirtilos e morangos	Micro-ondas	ICP OES	Pereira <i>et al.</i> , 2018
Gástrica e intestinal	Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn	Fígado bovino	Micro-ondas	ICP OES	Silva <i>et al.</i> , 2017

Tabela 3. Continuação.

Fase	Analito	Amostra	Preparo da amostra	Técnica de detecção	Referência
Gástrica e intestinal	Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn	Achocolatado em pó	Micro-ondas	ICP OES e GF AAS	PEIXOTO <i>et al.</i> , 2016
Gástrica e intestinal	As	Cogumelos comestíveis: crus e cozidos	Micro-Ondas	ICP-MS	LLORENTO-MIRANDES <i>et al.</i> , 2016
Gástrica e intestinal	Se	Cereal, arroz, milho, painço	Micro-Ondas	ICP OES	KHANAM e PLATEL, 2016
Gástrica e intestinal	B, Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Mg, Ni, Zn	Nozes e sementes	Micro-Ondas	ICP OES e ICP-MS	KAFAOGLU <i>et al.</i> , 2016
Gástrica e intestinal	Ca, Fe, Mg, Mn	Infusões de café moído	Placa De Aquecimento	F AAS	STELMACH, SZYMCZYCHA-MADEJA e POHL, 2016
Saliva, gástrica e intestinal	Al, Cd, Fe, Zn	Alface e couve	Micro-Ondas	ICP-MS	SILVA <i>et al.</i> , 2015
Saliva, gástrica e intestinal	Se e MeHg	Atum enlatado: cru e cozido	Micro-Ondas	ICP-MS	AFONSO <i>et al.</i> , 2015
Saliva, gástrica e intestinal	Hg, Se e MeHg	Tubarão azul: cru e cozido	Micro-Ondas	ICP-MS e AAS	MATOS <i>et al.</i> , 2015
Saliva, gástrica e intestinal	Hg e MeHg	Salmão	Micro-Ondas	AAS	COSTA <i>et al.</i> , 2015

Tabela 3. Continuação.

Fase	Analito	Amostra	Preparo da amostra	Técnica de detecção	Referência
Gástrica e intestinal	Ca, Mg e Zn	Cenoura	Micro-ondas focalizado	F AAS	ZACCARI <i>et al.</i> , 2015
Gástrica e intestinal	Fe, Zn, Cu	Suco de caju e fibra de caju	Micro-ondas	ICP OES	LIMA <i>et al.</i> , 2014
Gástrica	Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Zn	Água	Micro-ondas	ICP OES	WANG, YUAN e PEI, 2014
Saliva, gástrica e intestinal	Ag, Pb, Cd, Cu e Zn	Ostra	Bloco digestor	ICP-MS	GAO e WANG, 2014
Saliva, gástrica e intestinal	Ag, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn	Moluscos cozidos	9 ml de HNO ₃ concentrado	ICP-MS	HE e WANG, 2013
Gástrica e intestinal	As, Cd, Hg, Se, Cu, Mn, Pb	Frutos do mar	Micro-ondas	ICP-MS e CV AFS	LAIRD e CHAN, 2013
Gástrica e intestinal	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn	Mel de abelha	Diluição	F AAS	POHL <i>et al.</i> , 2012
Gástrica e intestinal	Fe, Zn, Cu, Mn, Mo	Queijo, pão, fruta, vegetal	Bloco digestor	ICP-MS	KHOUZAM <i>et al.</i> , 2011

Souza *et al.* (2019) avaliaram a concentração total e bioacessível de Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Ti e Zn em nove amostras de cereais infantil . O método de digestão *in vitro* empregado para avaliação da bioacessibilidade foi proposto por Minekus *et al.* (2014) e simula o processo de digestão humana que ocorre na boca, estômago e intestino, usando fluidos de digestão simulada. De acordo com o autor, esse método foi desenvolvido com um consenso internacional, que geraria um protocolo detalhado, bem como as limitações do método e suas recomendações para ajudar a produção de dados mais comparáveis no futuro. Os valores obtidos para as frações bioacessíveis variaram de 24-68% para Cu, 1-10% para Fe, 7-58% para Mn, 24-100% para Pb e 1-7% para Zn. Enquanto que para Ba, Bi, Cd e Cr estavam abaixo do limite de detecção.

Afonso *et al.* (2018) determinaram a composição elementar de 5 espécies de algas verdes cultivadas em sistemas de aquacultura de viveiros de peixes. A bioacessibilidade elementar de Mn, Cu, Zn, As, Sr, Pb e I foi também investigada empregando um inovador modelo digestivo *in vitro* do trato gastrointestinal humano, o qual faz também referência ao método proposto por Minekus *et al.* (2014), Os resultados indicam que a bioacessibilidade para Mn e Cu em todas as espécies foram acima de 50% e para I variou de 14 a 31%. Para os demais elementos, os valores de bioacessibilidade estavam abaixo do limite de quantificação.

Silva *et al.* (2017) fizeram uma comparação da bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn após fervura e cozimento a vácuo em amostras de fígado bovino. Para tanto, foi aplicado o método de digestão *in vitro* segundo Khouzam, Pohl e Lobinski (2011), simulando a digestão do alimento no estômago a partir de uma solução gástrica usando pepsina, cloreto de sódio e ácido clorídrico e simula a digestão no intestino com a solução intestinal composta de pancreatina e sais de bile. Os resultados demonstraram que as frações bioacessíveis dos elementos químicos quando a amostra for submetida ao cozimento à vácuo tem sido superior às obtidas in natura e cozimento com água.

Pereira *et al.* (2016) avaliaram a bioacessibilidade de Al, Ba, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de amora, framboesa e morango por ICP OES. A digestão do teor total foi realizada em forno de micro-ondas com cavidade e a avaliação da bioacessibilidade foi realizada utilizando um método padronizado de digestão

estática *in vitro* adequado para alimentos, segundo Minekus *et al.* (2014). Os resultados mostram que Ba apresentou os maiores valores de bioacessibilidade, praticamente a metade de Cu e Mn presente na fruta é bioacessível, enquanto Al, Fe e Zn apresentaram os menores valores bioacessíveis.

Peixoto *et al.* (2016) estudaram os fatores que influenciam a bioacessibilidade de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn em bebidas de chocolate em pó por ICP OES e GF AAS. Empregou-se um método de digestão *in vitro*, baseado no trabalho de Laparra *et al.* (2003) com algumas modificações, para simular a fase gástrica (HCl e pepsina) e para simular a fase intestinal (NH₄OH, pancreatina e pepsina). A bioacessibilidade varia muito de acordo com o tipo de amostra e o elemento que está sendo considerado (5 - 12% de Al, 74 - 120% de Ba, 3 - 11% para Cd, 5 - 19 % de Cr, 22 - 74% para Cu, 1 - 30% de Fe, 47 - 98% de Mg, 19 - 59% de Mn, 19 - 115% para P e 15 - 31% para Zn). Nesse trabalho, além das amostras, a fração bioacessível obtida também foi decomposta em forno de micro-ondas com cavidade.

Llorento-mirandes *et al.* (2016) avaliaram a bioacessibilidade de arsênio em amostras de cogumelos crus e cozidos por ICP OES. Utilizou-se o método *in vitro* PBET para simulação da fase gástrica (G) e gástrica + intestinal (GI). Todos os extratos G e GI foram centrifugados para separar a fração solúvel e os sobrenadantes foram filtrados para serem analisados. Esse método foi adaptado de outro método previamente descrito por Funes-Collado, Rubio e López-Sánchez (2015). Neste estudo notou-se que, mesmo quando o processo de cozimento levou à diminuição do teor total de arsênio, a bioacessibilidade de arsênio permaneceu alta com valores de 83% e 92% para as frações gástricas e intestinais, respectivamente.

Observou-se que os pesquisadores Kafaoglu *et al.* (2016) também utilizaram o método *in vitro* PBET para avaliar a bioacessibilidade de B, Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Mg, Ni e Zn em amostras de nozes e sementes por ICP OES e ICP-MS. Esse método para ambos os trabalhos apresentados fizeram uso de 1,25 g de pepsina, 0,5 g de ácido cítrico, 0,5 g de ácido maleico, 420 µL de ácido láctico, 500 µL de ácido acético e o pH foi ajustado com solução de HCl, isso tudo para simular a fase gástrica. Já na fase intestinal, foram utilizados sais de bile e pancreatina. A

proporção bioacessível foi maior para zinco quando comparada com outros elementos enquanto que a proporção foi mais baixa para boro nas soluções gástricas e intestinais. As concentrações de magnésio e cálcio nas soluções gástricas e intestinais foram maiores do que as concentrações para os outros elementos.

Stelmach, Szymczycha-Madeja e Pohl (2016) determinaram o teor total e bioacessível de Ca, Fe, Mg e Mn em amostras de bebida de café instantâneo empregando diferentes procedimentos de decomposição da amostra e analisadas por HR-CS F AAS. A bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Mn em bebida de café instantâneo foi avaliada por meio da digestão gastrointestinal *in vitro* (STELMACH, SZYMCZYCHA-MADEJA e POHL, 2014) com o uso de soluções simuladas de suco gástrico e intestinal. Os estudos revelaram que houve uma baixa bioacessibilidade de Ca, no entanto, isso pode ser justificado pelo fato das amostras de café instantâneo apresentarem, em sua composição, um diferenciado teor de oxalatos e de ácido fítico, o que ocasiona a formação de sais insolúveis de Ca, diminuindo a absorção de Ca. Nota-se que o método de digestão *in vitro* aplicado nesse trabalho foi referenciado do estudo realizado pelos mesmos autores.

Silva *et al.* (2015) e Afonso *et al.* (2015) empregaram o método de digestão *in vitro* baseado no trabalho de Versantvoort *et al.* (2005) para avaliação da bioacessibilidade de elementos em amostras alimentares. Silva *et al.* (2015) avaliaram a bioacessibilidade de Al, Cd, Fe e Zn em quatro tipos de amostras de alface e um tipo de amostra de couve por ICP-MS. A bioacessibilidade de Al encontrada nos vegetais foi inferior a 11% da concentração total. Enquanto que o Cd exibiu bioacessibilidade média de aproximadamente 14% para as amostras frescas e 41% considerando os legumes secos estudados. Os resultados também indicaram bioacessibilidade média de 35% e 26% para Zn e bioacessibilidade média de 19% e 21% para o Fe em amostras frescas e secas, respectivamente. A baixa bioacessibilidade de Al é provavelmente devido à sua ligação forte com todos os componentes vegetais, enquanto que a baixa bioacessibilidade de Fe e Zn são, ocasionados pelas suas interações com fitatos. Observou-se que Cd foi o elemento mais bioacessível nas amostras secas por causa da sua fraca interação com outros componentes nos produtos hortícolas.

Já Afonso *et al.* (2015) avaliaram a bioacessibilidade dos níveis de Se, Hg, e metilmercúrio (MeHg) em amostras de atum cru, cozido e enlatado e as análises foram feitas por ICP-MS. A bioacessibilidade de Se foi alta em atum, embora ligeiramente menor em atum enlatado do que em atum cru. Os níveis de Hg foram elevados em atum cru e cozido. Porcentagens de bioacessibilidade de Hg foram baixas (39-48%) em atum cozido e ainda mais baixo (<20%) em atum enlatado. Semelhantemente, Matos *et al.* (2015) também avaliaram a influência da bioacessibilidade de Se, Hg e MeHg, usando método de digestão *in vitro*, na identificação do benefício/perigo associado ao consumo de tubarão cru e cozido. Os níveis de selênio, Hg e MeHg foram maiores nas amostras cozidas, particularmente em tubarão azul grelhado. Enquanto que a bioacessibilidade de Se foi acima de 83% nas amostras grelhadas, a bioacessibilidade de Hg e MeHg foi menor com valores aproximadamente 50%.

Zaccari *et al.* (2015) empregaram um método *in vitro* (Hédren, Diaz e Svanberg, 2002) para determinação da bioacessibilidade de β -caroteno, Ca, Mg e Zn em quatro amostras de cenouras Landrace e duas cultivadas, cruas e cozidas no vapor. Adicionalmente, a vaporização causou uma perda de Ca (21%), mas não alterou a quantidade de Mg e Zn. A bioacessibilidade de β -caroteno em cenouras cruas e despulpados foi de <0,5%. Um tratamento com vapor e o tamanho de partícula menor aumentou a bioacessibilidade de β -caroteno em 3-16 vezes. A bioacessibilidade *in vitro* de Ca e Zn aumentou com o cozimento, mas não teve efeito sobre Mg. Além disso, a homogeneização aumentou a bioacessibilidade em 20% de Ca, 17% de Mg e 10% de Zn em comparação com a polpação. O consumo de 100 g de cenouras avaliadas, cruas ou cozidas, fornece pelo menos entre 75-100% da necessidade diária de β -caroteno e entre 13-21% de zinco para crianças.

Gao e Wang (2014) determinaram a bioacessibilidade oral de 5 metais tóxicos (Ag, Pb, Cd, Cu e Zn) em ostras contaminadas coletados em diferentes locais de um grande estuário, no sul da China. Para determinação do teor total, empregou-se um procedimento utilizando bloco digestor e, para análises das amostras, foi utilizado ICP-MS. O método de digestão *in vitro* empregado baseou-se no trabalho de Versantvoort *et al.* (2005), que conforme mostrado, tem sido o modelo mais comumente empregado. Em todas as ostras, a concentração total de Zn foi maior,

enquanto que a concentração total de Pb foi menor. Entre os cinco metais, Ag teve a menor bioacessibilidade oral (38,9-60,8%), ao passo que Cu e Zn a maior bioacessibilidade (72,3-93,1%).

Assim como o cozimento, grelhar também foi eficiente na redução da bioacessibilidade oral, diminuindo os riscos de contaminação. O mesmo método *in vitro* foi empregado no trabalho dos pesquisadores He e Wang (2013) que quantificaram a concentração total e o teor bioacessível de 12 elementos traço (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn) em amostras de moluscos marinhos por ICP-MS. A bioacessibilidade de todos os 12 elementos foi geralmente elevada, com os valores médios variando entre 42,5% e 90,7%. A maior bioacessibilidade foi obtida para As, Cu, Ni e Se, e mais baixa para o Fe, Co e Pb. Os moluscos devem ser cozinhados primeiro antes de serem consumidos por diminuir a bioacessibilidade de elementos tóxicos e os riscos a eles relacionados.

Pohl *et al.* (2012) determinaram a concentração total e o teor bioacessível de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em mel de abelha por F AAS. Para determinação do teor total as amostras não precisaram ser decompostas e foram apenas diluídas antes das análises. Já os ensaios *in vitro* foram baseados no método de Dean (2007), o qual faz uso de pepsina, NaCl e HCl para simular a fase gástrica, num tempo de incubação de 2h e a 37°C. A simulação da fase intestinal se deu por utilizar NaHCO₃, pancreatina, sais de bile e K₂HPO₄, no mesmo tempo e temperatura. Os extratos foram diluídos com água para um volume de 100 mL, em seguida foram filtrados e levados para análise. Os resultados dos testes de bioacessibilidade *in vitro* em condições da simulação da digestão gastrointestinal tem indicado que contribuições de frações altamente solúveis e permeáveis dos elementos determinados em relação a concentração total estiveram entre 80 e 100%, e com isso pode ser devido ao fato que esses elementos não existem na matriz de mel na forma de estruturas bioquímicas complicadas. Assim, pode-se antecipar que a biodisponibilidade desses elementos podem ser tão altas quanto a bioacessibilidade encontrada.

Khouzam *et al.* (2011) avaliaram a bioacessibilidade e o teor total de Fe, Zn, Cu, Mn, Mo em amostras de queijo, pão, fruta, vegetal, decompostas por bloco digestor e analisadas por ICP-MS. Empregou-se um modelo de digestão

gastrointestinal *in vitro* similar ao do estudo de Pohl *et al.* (2012) apresentando algumas diferenças, por exemplo, na fase gástrica, os pesquisadores também usaram pepsina e NaCl, porém o tempo de inbucação dobrou para 4h. Na simulação da fase intestinal, utilizaram pancreatina, amilase e sais de bile, foi usado a amilase, já que a temperatura e o tempo foram os mesmos utilizados na fase gástrica.

A aplicação do modelo de digestão *in vitro* usando a simulação dos sucos gastrointestinais permitiram demonstrar que, em alguns casos, apenas uma fração pequena do total quantificado do elemento em alimentos é potencialmente bioacessível. Adicionalmente, os resultados da bioacessibilidade dos nutrientes variam largamente com a função dos componentes da matriz alimentar e do elemento de interesse. Isso é verdadeiro para dois elementos essenciais como Fe e Zn que mostraram baixa bioacessibilidade em pães e vegetais em comparação com Cu e altas frações bioacessíveis de Fe em queijos comparado a Zn.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada sobre os métodos de digestão *in vitro*, notou-se que ainda há uma grande variedade de procedimentos empregados para avaliar a bioacessibilidade de elementos em amostras de alimentos. Desta forma, observa-se ainda uma grande necessidade de se estudar os métodos *in vitro*, comparando os procedimentos de diferentes métodos empregados, para fazer uma avaliação geral dos resultados e poder propor um procedimento único e validado para avaliação do teor bioacessível em amostras alimentares. Assim, seria reduzido, em grande quantidade, essa diversidade de métodos encontrados na literatura que são usados para obter informações similares.

2.3 Emprego de sistemas de análise em fluxo para avaliação da bioacessibilidade

O Grupo de Pesquisa em Bioacessibilidade da Europa lançou um procedimento operacional padronizado e validado UBM, que harmoniza os vários testes de bioacessibilidade para avaliação de risco de saúde de solos contaminados. O método UBM, sob condições fisiologicamente relevantes, tem sido geralmente recorrentes à determinação da bioacessibilidade de metais em solos (BARGE, 2011; DENYS *et al.*, 2012) associados à sua ingestão não intencional por crianças, mas, também, se estendeu à exposição de contaminantes inorgânicos em outras amostras sólidas (por exemplo, poeira transportada pelo ar) (MINEKUS *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2011; VERSANTVOORT *et al.*, 2005).

Mais recentemente, a adequação de UBM para produtos alimentícios foi demonstrado pela avaliação de frações bioacessíveis de macro e microelementos em sementes de soja (HERRERA *et al.*, 2016) e suplementos nutricionais (TOKALIOĞLU *et al.*, 2014). Por outro lado, métodos de digestão *in vitro* dedicados a estudos de bioacessibilidade em amostras de alimentos também estão disponíveis na literatura (MINEKUS *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2011; VERSANTVOORT *et al.*, 2005). Como é o caso do método UBM, o método de Versantvoort (2005) também apresenta duas etapas de extração consecutivas para imitar dois compartimentos de digestão (i) o compartimento gástrico em que o fluido gástrico e a saliva são incorporados à amostra sólida, e (ii) o compartimento gastrointestinal, envolvendo a adição dos fluidos corporais biliares e duodenais à simulação do quimo.

O método de extração é realizado com simulações de fluidos digestivos biorrelevantes cuja composição se assemelha à fisiologia humana. Em comparação com o teste UBM que é realizado em estado de jejum, o método Versantvoort utiliza as condições do estado em que as mudanças operacionais são realizadas com base nas modificações fisiológicas ocorridas no trato gastrointestinal com componentes alimentares, como alteração no pH e tempos de permanência dos fluidos gastrointestinais (GI) e o aumento na secreção de ácido gástrico, líquidos biliares e pancreáticos (CAVE *et al.*, 2010). É importante mencionar que o teste de Versantvoort (2005) serviu como uma referência para o método FOREhT (Fed Organic Estimation Human Simulation Test) *in vitro* (CAVE *et al.*, 2010) visando a

investigação da exposição de contaminantes orgânicos em solos sob estado de alimentação.

Em alguns casos, métodos de bioacessibilidade *in vitro* excessivamente simples (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012; LAKSHMI E KAUL *et al.*, 2011; LAIRD E CHAN *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014), por exemplo, aqueles baseados em fluidos corporais compendiais endossados pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) (USP, 2013) foram propostos na literatura para produtos alimentícios. Fluidos digestivos à base de USP não simulam adequadamente a composição real do trato GI humano e são predominantemente aplicados individualmente, isto é, o alimento é exposto primeiro e extraído com o fluido gástrico e então o resíduo sólido é exposto à fase GI, e as informações sobre o trânsito de quimo são perdidas.

Duas limitações comuns dos testes de bioacessibilidade oral convencional, baseados na análise em batelada, são a falta de remoção imediata dos compostos desorvidos da superfície da matriz, que é inerente ao conceito de bioacessibilidade (BRACK *et al.*, 2009), e a ausência de percepção da cinética de lixiviação das espécies em tempo real (ROSENDE E MIRÓ, 2013).

Para resolver as deficiências citadas, várias equipes realizaram ensaios de bioacessibilidade dinâmica *in vitro* com a ajuda de configurações de fluxo que são capazes de trazer porções frescas de fluidos corporais (geralmente fluido gástrico) através da amostra sólida contida em uma câmara de fluxo. Por exemplo, o grupo de Beauchemin usou a extração dinâmica on-line para a especiação de arsênio bioacessível (DUFAILY *et al.*, 2008; LEUFROY *et al.*, 2012; HORNER E BEAUCHEMIN, 2012) e a identificação de porções bioacessíveis de Cr, As, Cd e Pb em pão (LAMSAL E BEAUCHEMIN, 2015).

Não obstante, a simplificação dos fluidos corporais usando as recomendações da USP, os autores não conseguiram analisar a fase duodenal, devido ao entupimento dos condutos de fluxo (LEUFROY *et al.*, 2012). Rosende *et al.*, (2014) investigaram a exposição ao risco de espécies metálicas em materiais do solo em cenários de extração de pior caso com um sistema de fluxo contínuo usando a fase gástrica biologicamente relevante, mas a mucina, que gera ambiente turvo e viscoso, foi omitida do biofluido após o processamento estatístico. No entanto, esta enzima

pode se comportar como um componente vital das simulações do fluido corporal na digestão gastrointestinal dos alimentos.

Além disso, sistemas de fluxo anteriores usando configurações de coluna em pequena escala (ROSENDE E MIRÓ, 2013; DUFAILY *et al.*, 2008; LEUFROY *et al.*, 2012a; HORNER E BEAUCHEMIN, 2012; LAMSAL E BEAUCHEMIN, 2015; LEUFROY *et al.*, 2012b; MIRÓ *et al.*, 2005) foram incapazes de lidar com quantidades de amostra >200mg, o que pode não assegurar a representatividade da amostra em ensaios de bioacessibilidade de produtos alimentares.

A análise por injeção em fluxo (FIA) apresenta como características a ausência de bolhas de ar e a rápida injeção de amostras aquosas em movimento contínuo não segmentado, transportando fluxo de água ou soluções de reagentes. O sistema FIA é, portanto, uma técnica analítica que é baseada na injeção de volumes de amostras conhecidos, com forma bem definidas, em um movimento unidirecional não segmentado. A instrumentação básica necessária para um sistema FIA é constituída por uma bomba peristáltica multicanal, um dispositivo de injeção da amostra, um detector e um registrador para transcrição do sinal (STADEN, 2015).

A análise por injeção sequencial (SIA) é uma técnica que tem um ótimo potencial para medidas on-line devido à simplicidade e conveniência com que as manipulações das amostras podem ser automatizadas. A versatilidade da técnica é centralizada ao redor de uma válvula de seleção multicanal, onde cada porta da válvula permite a realização de operações unitárias independentes. Desta maneira, atribui-se como principal vantagem do sistema SIA a versatilidade de aplicações sem a reconfiguração física do sistema em fluxo. Cada porta da válvula é dedicada a um propósito específico e combinações de amostras, padrões, reagentes e detectores ao redor da válvula são facilmente modificados para atender uma análise particular. Os componentes básicos do sistema são uma bomba peristáltica de via única (só um fluxo carregador), uma única válvula de seleção, um único canal central podendo ser associado a diferentes detectores (SRÁMKOVÁ *et al.*, 2014; STADEN, 2015).

Pouco se têm explorado as vantajosas características das análises em fluxo para a automatização de métodos analíticos empregados na determinação da bioacessibilidade em amostras de alimentos. Os métodos automatizados são bastante vantajosos pelo fato de apresentarem uma elevada frequência analítica,

aumento da qualidade dos resultados, salva guarda do fator humano, maximização qualidade/custo dos resultados, elevados ritmos de amostragem, aumento do potencial analítico, eliminação de erros operacionais, maximização da rentabilidade e desempenho do equipamento dentre outros (SRÁMKOVÁ *et al.*, 2014).

Logo, o desenvolvimento de sistemas de análises que possibilitem a avaliação desses processos torna-se atraente, pois permite o acesso à informação analítica em tempo real e, por conseguinte, podem-se tomar decisões em qualquer uma das etapas do processo, como no acréscimo ou retirada de reagentes ou no controle do tempo total de análises e geração de efluentes. Para tanto é preciso que estes sistemas sejam capazes de fornecer informações fidedignas, em quantidade e em tempo real (SRÁMKOVÁ *et al.*, 2014). Logo, o desenvolvimento de métodos automatizados acoplados a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e/ou espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), para viabilizar a determinação da fração bioacessível do teor de nutrientes e contaminantes em amostras alimentares, tem se tornado uma grande alternativa, uma vez que essas técnicas espectrométricas atômicas, apresentam bons limites de detecção, frequência analítica, capacidade de análises multielementares (sequencial ou simultânea), faixa linear de trabalho e repetitividade. Aspectos importantes considerando que a determinação dos elementos traço em amostras de alimentos são baixas (RUZIK, 2012).

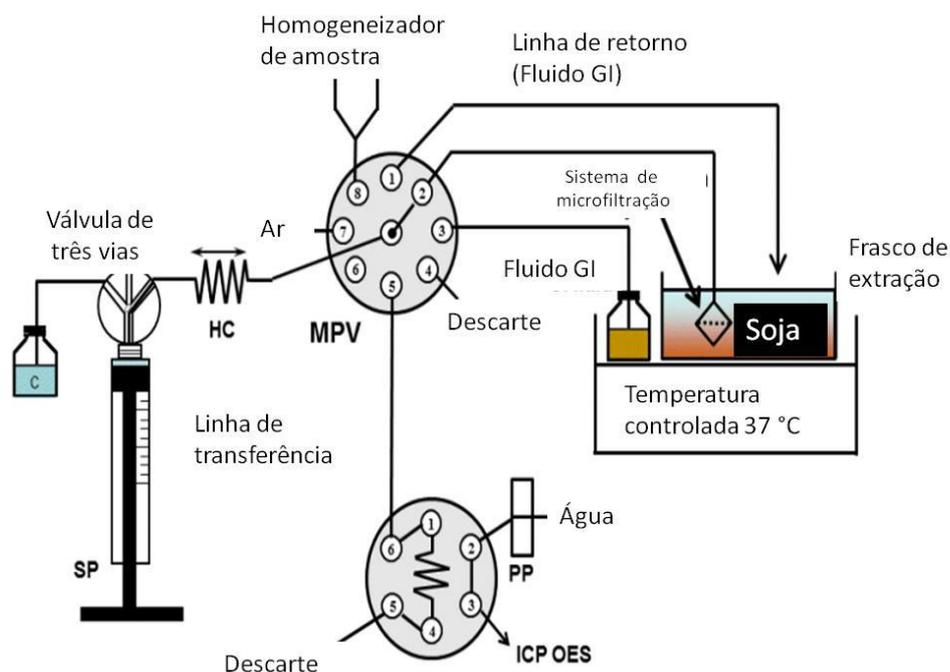
De acordo com a revisão da literatura, observou-se ainda uma escassez de informações em relação ao uso de sistemas de análise em fluxo para avaliação da bioacessibilidade em amostras de alimento acoplado a técnicas espectrométricas. Encontraram-se alguns trabalhos como, por exemplo, Rosende *et al.* (2013) e Rosende *et al.* (2014), que fazem uso de sistemas de análise em fluxo (FIA, SIA) para avaliação da fração bioacessível aplicados em amostras de solo. Porém, serão abordados somente trabalhos referentes à aplicação em amostras de alimentos. Sendo assim, alguns dos poucos trabalhos encontrados serão citados, mostrando como foi realizado o sistema em fluxo proposto para os estudos, quais amostras de alimentos foram utilizadas, quais elementos foram determinados e qual técnica empregada para o acoplamento.

Herrera *et al.* (2016) realizaram uma extração gastrointestinal *in vitro* baseado no método da BARGE unificado (UBM) para avaliação da bioacessibilidade de Cu,

Fe e Mn em amostras de soja por ICP OES. Neste trabalho, foi empregado um método de análise por injeção sequencial através do acoplamento on-line ao espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado em uma configuração fluxo-batelada para monitoramento em tempo real da bioacessibilidade oral. Um analisador em fluxo totalmente automatizado foi projetado para promover a filtração em linha do extrato gastrointestinal em tempos pré-definidos (≤ 15 minutos) seguido da determinação multielementar on-line da bioacessibilidade dos micronutrientes, em volumes de extratos bem definidos (300 μ L) de sementes de soja transgênica e não transgênica.

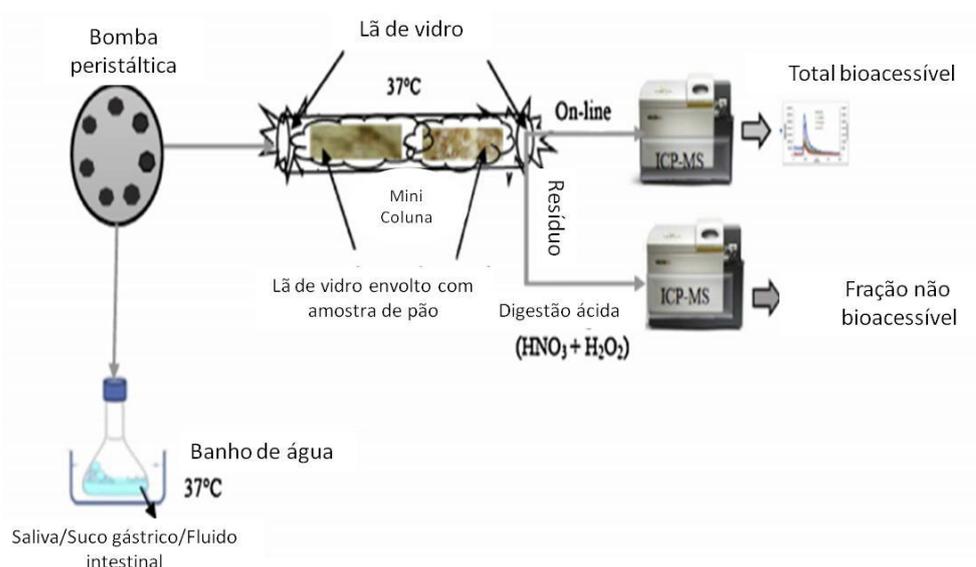
A maior bioacessibilidade foi obtida para o micronutriente Cu com valores variando entre 73 a 83%, seguido do Mn (29 a 31%) e Fe (11 a 15%). Foi observada uma redução acentuada na concentração bioacessível de ferro e de manganês na transição do quimo do estômago para o intestino delgado e isso pode ser atribuído à rápida geração de oxihidróxidos de Mn e Fe não bioacessíveis concomitante com a formação de quelatos neutros com fitatos da soja. A Figura 6 representa o esquema proposto por Herrera *et al.* (2016).

Figura 6. Diagrama esquemático do procedimento para avaliar a bioacessibilidade adaptado de Herrera *et al.* (2016). HC (canal central), MPV (válvula de multiposição) e PP (bomba peristáltica)



Lamsal e Beauchemin (2015) usaram um método de análise por injeção em fluxo contínuo, através da lixiviação on-line simples e eficiente para avaliar o máximo da fração bioacessível de elementos potencialmente tóxicos, como As, Cd Cr e Pb, em amostras de trigo integral marrom e pão branco. Uma lã de vidro foi usada para empacotar as amostras dentro da mini-coluna. A lã de vidro foi lavada com saliva artificial e finalmente ar seco. Alíquotas de 0,25 g de amostras de pão foram envoltas na lã de vidro e inseridas, resultando numa mini-coluna. A saliva artificial e os sucos gástricos e intestinais foram sucessivamente bombeados para mini-coluna empacotada com pão (mantida a 37 °C) conectado ao nebulizador de um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado. Essa abordagem fornece o monitoramento em tempo real da bioacessibilidade de elementos potencialmente tóxicos continuamente liberados durante a lixiviação. O esquema proposto pelos pesquisadores está apresentado na Figura 7.

Figura 7. Diagrama esquemático da configuração experimental adaptada de Lamsal e Beauchemin (2015).

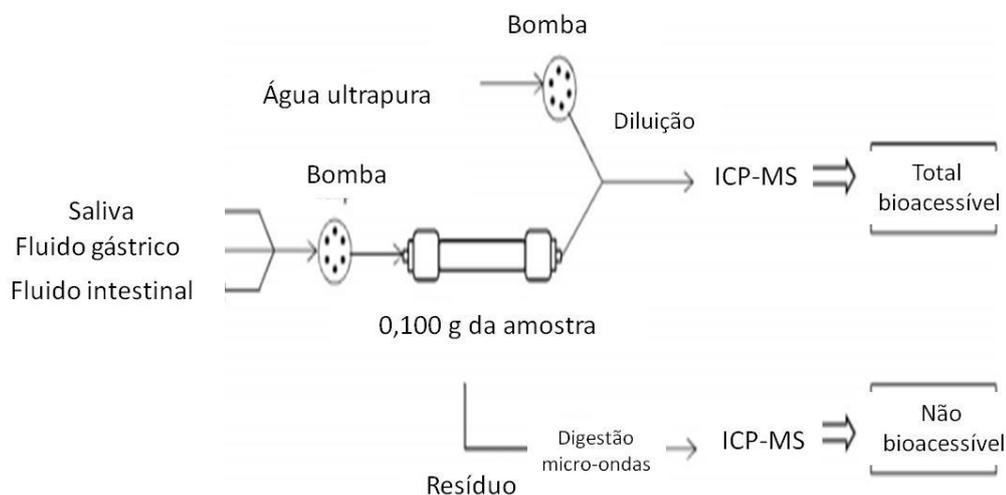


Leufroy *et al.* (2012a) determinaram o teor total e bioacessível de Al, Cd, Hg, Pb, V, Mn, Cu, Zn em amostras de frutos do mar por ICP-MS. Foi utilizado um método de lixiviação contínua, acoplado em linha com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Os tempos de lixiviação foram inicialmente

selecionados de acordo com a fisiologia humana, sendo 5 minutos para saliva e 1 hora para cada compartimento gástrico e intestinal. O tempo para os sucos gástricos e intestinal foi reduzido para 20 minutos, uma vez que não foi observado liberação do analito após esse tempo.

Esse método trata-se de uma análise por injeção em fluxo contínuo como uma mini-coluna e envolve a lixiviação contínua da amostra alimentar passando pela saliva artificial e suco gástrico. A lixiviação com suco intestinal foi omitido porque resultou em problemas de entupimento. O procedimento de lixiviação on-line foi propício para determinação simultânea da bioacessibilidade de uma ampla faixa de elementos químicos em frutos do mar e outros tipos de amostras. A abordagem on-line (Figura 8) permitiu uma rápida avaliação da bioacessibilidade máxima de elementos químicos de interesse através da sua monitoração da liberação em tempo real por um seletivo reagente.

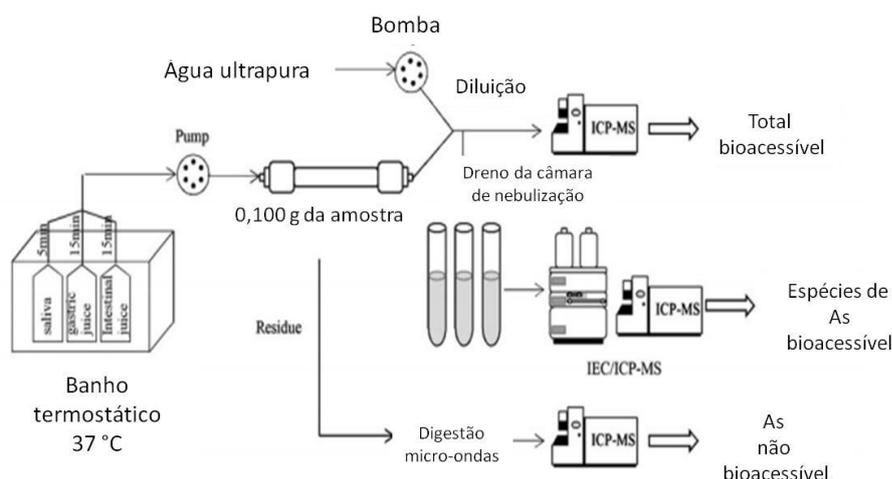
Figura 8. Diagrama esquemático do procedimento para avaliação da bioacessibilidade adaptada de Leufroy *et al.* (2012a)



Similarmente, Leufroy *et al.* (2012b) utilizaram um método de lixiviação contínua acoplado ao ICP-MS para avaliação da bioacessibilidade de arsênio total e espécies de arsênio em amostras de frutos do mar. O método simula a digestão em fluxo contínuo sucessivamente bombeando a saliva artificial e sucos gástricos e intestinais através de uma mini-coluna de amostra diretamente conectada ao nebulizador do espectrômetro. Adicionalmente ao método proposto acima, neste

caso utilizou-se a cromatografia de troca iônica para análise de especiação. A Figura 9 apresenta o diagrama para o procedimento proposto.

Figura 9. Diagrama esquemático do procedimento para avaliação da bioacessibilidade adaptado de Leufroy *et al.* (2012b).



De acordo com o estudo realizado na literatura, pôde-se observar uma grande escassez de trabalhos sobre o emprego de sistemas de análise em fluxo para avaliação da bioacessibilidade de elementos em amostras alimentares. Dessa forma, o estudo nessa área é de grande potencial, uma vez que se tem verificado que ele fornece uma satisfatória avaliação de risco à saúde e, também, uma importante avaliação nutricional dos elementos ingeridos em dietas, que normalmente são prescritos por nutricionistas.

Como são indicadas quantidades diárias de alimentos, para suprir demandas fisiológicas dos indivíduos, é importante avaliar se essa quantidade ingerida está sendo realmente liberada no trato gastrointestinal. Portanto, a avaliação da bioacessibilidade estima resultados da fração bioacessível que podem ser absorvidos pelo corpo humano. Assim, o desenvolvimento de métodos automatizados é uma boa alternativa para avaliação do teor bioacessível, uma vez que o mesmo apresenta diversas vantagens quando comparados aos procedimentos analíticos em batelada ou convencionais.

Capítulo II. Comparação de métodos para o estudo da bioacessibilidade estática *in vitro* de micronutrientes em linhaça e gergelim

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal desse estudo foi comparar diferentes métodos para avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de micronutrientes em amostras de linhaça e gergelim por ICP OES.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar otimização multivariada da decomposição assistida por radiação de micro-ondas usando ácido nítrico diluído para determinação das concentrações totais de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn em amostras de linhaça e gergelim por ICP OES;
- Comparar a bioacessibilidade *in vitro* de Cu, Fe, Mn e Zn usando diferentes métodos estáticos (SBET, Versantvoort e UBM) em amostras de linhaça e gergelim por ICP OES;
- Avaliar a contribuição do consumo de linhaça e gergelim para ingestão diária recomendada de Cu, Fe, Mn e Zn empregando o método de digestão *in vitro* UBM nas amostras de linhaça dourada e marrom e nas amostras gergelim marrom, branco e preto.

3. Experimental

3.1 Instrumentação

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com uma configuração de visão axial (Vista-Pro, Agilent, Mulgrave, Austrália) foi empregado para determinação do teor total e da fração bioacessível dos elementos. As linhas de emissão atômica (I) e iônica (II) que não apresentavam interferências espectrais e com alto sinal analítico foram selecionadas e estão mostradas na Tabela 4. Esse equipamento foi equipado com um detector de estado sólido, câmara de nebulização ciclônica e nebulizador concêntrico. As condições de operação do equipamento, otimizado em trabalhos prévios, estão apresentados na Tabela 4. (JESUS *et al.*, 2013).

O teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) foi medido também por ICP OES no comprimento de onda C (I) 193,027 nm. Para determinar o DOC, as soluções dos digeridos foram sonicadas com um banho ultrassônico antes da determinação por

ICP OES para remoção de compostos de carbono volátil. As soluções estoque para as curvas de calibração do carbono dissolvido foram preparadas com ácido cítrico P.A. (NOVAES *et al.*, 2016; ISO, 1998).

Um forno de micro-ondas com cavidade (modelo ETHOS EZ, Milestone, Sorisole, Itália), foi usado para decomposição ácida das amostras. Um moinho analítico (modelo A11 BS 32, IKA, Staufen, Alemanha) foi empregado para moer as amostras antes dos procedimentos de extração. Uma incubadora, modelo TE-4200 (Tecnal, São Paulo, Brasil) foi empregada para extração dos analitos a fim de avaliar a bioacessibilidade. Uma centrífuga (modelo MA-1810, Marconi, São Paulo Brasil) foi usada para centrifugar os extratos e o pH das soluções foi ajustado com um pHmetro (modelo 510 Benchtop Ion Meter, Vernon Hills, EUA).

Tabela 4. Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES

Características e parâmetros	
Rádio-freqüência do gerador (MHz)	40
Detector	CCD
Diâmetro interno do tubo central da tocha (mm)	2,3
Policromador	Grade de difração <i>Echelle</i> e prisma de dispersão de CaF ₂
Faixa de comprimento de onda (nm)	167 – 785
Câmara de nebulização	<i>Sturman-Masters</i>
Nebulizador	Ranhura em V
Potência de medida (W)	1300
Tempo de integração do sinal (s)	2,0
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Elementos e comprimentos de onda (nm): Linha atômica (I) e Linha iônica (II)	C (I) 193,027; Ca (I) 422,673; Cu (I) 327,395; Fe (II) 234,350; K (I) 769,897; Mg (II) 279,553; Mn (II) 257,611; Mo (I) 202,032; Na (I) 589,59; P (I) 177,434; Zn (II) 202, 548

3.2 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes usados nesse trabalho foram de grau analítico. Ácido nítrico (65% m m⁻¹), HCl (37% m m⁻¹) e H₂O₂ (30% m m⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usados para a decomposição das amostras. Soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de Cu (ref. ICPCU1000V), Fe (ref. ICPFE1000V), Mn (ref. ICPMN1000V), Mo (ref. ICPMO1000V) e Zn (ref. ICPZN1000V) e 4000 mg L⁻¹ de Ca (ref. ICPCA4000V), K (ref. ICPK4000V), Mg (ref. ICPMG4000V), Na (ref. ICPNA4000V) e P (ref. ICPP4000V) (Specsol, São Paulo, Brasil) foram adequadamente diluídas para preparar as soluções de calibração analítica. A determinação dos elementos por ICP OES foi realizado usando calibração externa. As soluções para as curvas de calibração foram preparadas em mesma concentração ácida de cada procedimento de digestão.

Todas as soluções foram preparadas usando água de alta pureza, com resistividade ≤ 18,2 MΩ cm, obtido de um sistema de purificação (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os reagentes usados na bioacessibilidade para simular os fluidos digestivos foram selecionados de acordo com os métodos de bioacessibilidade avaliados. Resumidamente, para o método SBET foram empregados glicina (0,4 mol L⁻¹) e HCl (37% m m⁻¹) e para os métodos Versantvoort e UBM os reagentes estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Todos os reagentes empregados foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Tabela 5. Constituintes e concentrações de vários sucos sintéticos do modelo de digestão *in vitro* representando condições de estado alimento, adaptado de Versantvoort (2005).

	Saliva	Suco gástrico	Suco duodenal	Suco biliar
Solução Inorgânica	10 mL KCl 89,6 g L ⁻¹	15,7 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹	40 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹	30 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹
	10 mL KSCN 20 g L ⁻¹	3,0 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g L ⁻¹	40 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹	68,3 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹
	10 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g L ⁻¹	9,2 mL KCl 89,6 g L ⁻¹	10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g L ⁻¹	4,2 mL KCl 89,6 g L ⁻¹
	10 mL Na ₂ SO ₄ 57 g L ⁻¹	18 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g L ⁻¹	6,3 mL KCl 89,6 g L ⁻¹	150 µL HCL 37% g g ⁻¹
	1,7 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹	10 mL NH ₄ Cl 30,6 g L ⁻¹	10 mL MgCl ₂ 2 5 g L ⁻¹	
	20 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹	6,5 mL HCl 37% g g ⁻¹	180 µL HCl 37% g g ⁻¹	
		10 mL glicose 65 g L ⁻¹		
		10 mL ácido glucurônico 2 g L ⁻¹		
Solução orgânica	8 mL ureia 25 g L ⁻¹	3,4 mL ureia 25 g L ⁻¹	4 mL ureia 25 g L ⁻¹	10 mL ureia 25 g L ⁻¹
		10 mL hidrocloreto de glucosamina 33 g L ⁻¹		
Adicionar à mistura solução orgânica + solução inorgânica	580 mg α-amilase	2 g de BSA	18 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g L ⁻¹	20 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g L ⁻¹
	30 mg ácido úrico	5,0 g de pepsina	2 g BSA	3,6 g BSA
	50 mg mucina	6 g de mucina	9 g pancreatina	60 g bile
			1,5 g lipase	
pH	6,8 ± 0,2	1,30 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

Tabela 6. Massas (mg) e volumes (mL) dos reagentes para preparação de 500 mL de cada fluido, saliva (S), gástrico (G), duodeno (D) e bile (B) com 250 mL de solução inorgânico (I) e 250 mL de solução orgânica (O) adaptado de Wragg (2011).

	Reagentes	(S)	(G)	(D)	(B)	Volume
Inorgânico (I)	KCl	448	412	282	188	
	NaH ₂ PO ₄	444	133	-	-	
	KSCN	100		-	-	
	Na ₂ SO ₄	285		-	-	
	NaCl	149	1376	3506	2630	
	CaCl ₂	-	200	-	-	
	NH ₄ Cl	-	153	-	-	
	NaHCO ₃	-	-	2803,5	2893	250
	KH ₂ PO ₄	-	-	40	-	
	MgCl ₂	-	-	25	-	
	NaOH (1M)	0,9 mL	-	-	-	
	HCl (37%)			4,15 mL	90 µL	90 µL
Orgânico (O)	Ureia	100 mg	42,5	50	125	
	Glicose		325	-	-	
	Ácido glucurônico		10	-	-	250
	Hidrocloridato de glucosamina		165	-	-	
Enzimas	Alfa amilase	72,5 mg	-	-	-	
	Mucina	25 mg	1500	-	-	
	Ácido úrico	7,5 mg	-	-	-	
	Albumina de soro bovino	-	500	500	900	
	Pepsina	-	500	-	-	250 + 250 = 500
	CaCl ₂	-		100	111	
	Pancreatina	-		1500	-	
	Lipase	-		250	-	
Bile	-		-	3000		

3.3 Amostras e materiais de referência

Amostras de linhaça e gergelim (pacotes contendo 250 g) foram adquiridas em diferentes mercados locais das cidades de Salvador-BA e Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Vinte e cinco amostras comerciais de linhaça de diferentes marcas (doze amostras de linhaça marrom e treze amostras de linhaça dourada) e dezesseis amostras comerciais de gergelim de diferentes marcas (quatro amostras de gergelim branco, cinco amostras de gergelim preto e sete amostras de gergelim marrom) foram analisadas, conforme apresentado nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Identificação e estados de origem das amostras de linhaça.

Semente de linhaça marrom		Farinha de linhaça marrom		Semente de linhaça dourada		Farinha de linhaça dourada	
Código	Estado	Código	Estado	Código	Estado	Código	Estado
A	SP	AF	SP	A	SP	AF	SP
B	BA			B	BA		
C	PR			C	PR		
D	PR			D	BA		
E	BA			E	SP		
F	BA			F	RS		
G	RS			G	RS		
H	LD			H	MG		
I	LD			I	LD		
J	RS			J	LD		
K	RJ			K	LD		
				L	RS		
Total: 11 amostras		Total: 1 amostra		Total: 12 amostras		Total: 1 amostra	

LD – local desconhecido

Tabela 8. Identificação e estados de origem das amostras de gergelim.

Semente de gergelim branco		Semente de gergelim preto		Semente de gergelim marrom	
Código	Estado	Código	Estado	Código	Estado
A	BA	A	SP	A	SP
B	LD	B	BA	B	BA
C	LD	C	LD	C	LD
D	LD	D	LD	D	MG
		E	LD	E	SP
				F	RJ
				G	LD
Total: 4 amostras		Total: 5 amostras		Total: 7 amostras	

LD – local desconhecido

Materiais de referência certificados (CRM) de linhaça e gergelim não foram encontrados para aquisição. Então, foram selecionados CRMs que mais se assemelhassem às características das amostras de linhaça e gergelim, como por exemplo, farinhas e soja (SRM NIST 3234) e farinha de arroz (SRM NIST 1568a), que foram adquiridos do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, Gaithersburg, MD, EUA) e foram usados para avaliação da exatidão do método.

3.4 Otimização do procedimento de decomposição da amostra

Os métodos analíticos têm sido recorrentemente otimizados por técnicas multivariadas, considerando a possibilidade da redução de números de experimentos que precisam ser realizados, resultando em menor tempo de trabalho no laboratório e menor consumo de reagentes. Na primeira etapa da otimização multivariada, é realizada o rastreamento dos fatores, utilizando um planejamento

fatorial fracionário ou planejamento fatorial completo para obter os efeitos significativos do sistema analítico (MARQUES, 2008).

O delineamento experimental foi utilizado para avaliar as condições para o procedimento de decomposição das amostras. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para avaliar as variáveis associadas à temperatura na última etapa (180-210 °C), concentração do ácido nítrico (2,0-4,0 mol L⁻¹), volume do peróxido de hidrogênio (0,0-1,0 mL) e tempo na última etapa (10-30 minutos) de decomposição das amostras de linhaça e gergelim. Os níveis de fatores empregados no planejamento experimental foram baseados em trabalhos prévios (JESUS *et al.*, 2013; QUEIROGA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015). A massa das amostras foi fixada em 0,25 g. O software Statistica versão 6.0® foi utilizado para análise dos dados.

3.5 Decomposição das amostras

Foram pesadas 250 mg da amostra moída em frasco de digestão do forno de micro-ondas. Em seguida, adicionou-se 1,8 mL de HNO₃, 65% m m⁻¹, (concentração final de 3,0 mol L⁻¹), 0,5 mL de H₂O₂, 30% m m⁻¹, e 7,7 mL de água ultrapura, totalizando um volume de 10,0 mL. Posteriormente, os frascos foram aquecidos a uma temperatura máxima de 195 °C por 20 minutos, conforme apresentado na Tabela 9. Os digeridos foram diluídos com água para 15,0 mL. As quantidades ótimas de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, bem como o tempo e a temperatura, foram obtidas após otimização multivariada.

Tabela 9. Procedimento otimizado para decomposição em forno de micro-ondas das amostras de linhaça e gergelim.

Etapa	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Potência _{máx.} (W)	Pressão (barr)
1	5	120	750	35
2	2	120	750	35
3	10	195	1000	35
4	20	195	1000	35
Ventilação	10	-	0	-

3.6 Métodos de digestão *in vitro*

Nesta etapa do trabalho, foram comparados três procedimentos de digestão *in vitro*:

I) Procedimento de digestão *in vitro* baseado no método SBET (OOMEN *et al.* (2002):

Em trabalho anterior, desenvolvido por Souza (2015), foram realizadas extrações *in vitro* das amostras para avaliação da bioacessibilidade de Cu, Fe, Mn e Zn, usando o método SBET, cujos resultados serão discutidos para efeito de comparação de métodos de digestão *in vitro*. Para tanto, 250 mg da amostra moída foram pesadas em béqueres de 50 mL, seguida da adição de 25,00 mL de solução de 0,4 mol L⁻¹ de glicina/HCl em pH 1,5. As amostras foram incubadas a 37 °C, sob agitação orbital, a 100 rpm por 1h. A mistura foi filtrada a vácuo, em filtro de disco de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm (Adaptado de OOMEN, 2002). Todos os extratos foram armazenados < 4 °C antes das análises por ICP OES.

II) Procedimento de digestão *in vitro* baseado no método de Versantvoort *et al.* (2005):

Um método de digestão *in vitro*, empregado por Silva *et al.* (2013) e baseado no método de Versantvoort *et al.* (2005), foi aplicado para determinar a bioacessibilidade de Cu, Fe, Mn e Zn e os reagentes usados na simulação dos fluidos digestivos, estão apresentados na Tabela 5 (Adaptado de Versantvoort *et al.*, 2005).

Para determinar a fração bioacessível, as amostras foram trituradas por 10 segundos para simular ingestão da semente após a mastigação. Três réplicas dos extratos gástricos e gastrointestinais foram realizadas para cada tipo de amostras e o branco do experimento usando os fluidos gástricos e gastrointestinais foram feitos em paralelo. Aproximadamente 3,0 g de amostra foram pesadas dentro de um erlenmeyer de 125 mL, seguido pela adição de 3,0 mL de fluido salivar. Os erlenmeyers foram colocados na incubadora a (37 ± 1) °C sob agitação orbital a 55 rpm por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 6,0 mL de fluido gástrico foi adicionado e o pH ajustado para 1,30 ± 0,02 com HCl 12 mol L⁻¹. Os erlenmeyers foram colocados na incubadora a (37 ± 1) °C sob agitação orbital a 55 rpm por 2

horas. Após a incubação, o pH foi medido e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos.

Para realizar a extração gastrointestinal, 6,0 mL de fluido duodenal e 3,0 mL de fluido biliar foram adicionados à solução do sobrenadante obtidas na etapa anterior (extração gástrica). O pH foi ajustado, se necessário, com NaOH 1,0 mol L⁻¹. As soluções foram colocadas na incubadora a (37 ± 1) °C sob agitação orbital a 55 rpm por 2 horas. O pH foi verificado (6,5-7,0) e a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos.

III) Procedimento de digestão *in vitro* baseado no UBM (WRAGG *et al.*, 2011):

Outro método de digestão *in vitro* empregado por Tokalioğlu *et al.* (2014) e baseado no UBM, foi usado para avaliar a fração bioacessível de Cu, Fe, Mn, Zn (WRAGG *et al.*, 2011;). A lista de reagentes presentes na simulação da saliva, fluido gástrico e fluido intestinal, está apresentada na Tabela 6 (Adaptado de WRAGG *et al.*, 2011).

Para determinar a fração bioacessível, as amostras foram trituradas por 10 segundos para simular ingestão da semente após a mastigação. Três réplicas dos extratos gástricos e gastrointestinais foram realizadas para cada tipo de amostra e os brancos do experimento usando, os fluidos gástricos e gastrointestinais foram feitos em paralelo. Aproximadamente 0,30 g de amostra foram pesadas dentro de um erlenmeyer de 125 mL, seguido pela adição de 4,5 mL de fluido salivar e agitação manual por 10 segundos. Posteriormente, uma alíquota de 6,75 mL de fluido gástrico foi adicionado e o pH ajustado para 1,20 ± 0,05 com HCl 12 mol L⁻¹. Os erlenmeyers foram colocados na incubadora a (37 ± 1) °C sob agitação orbital a 200 rpm por 1 hora. Após a incubação, o pH foi medido e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos.

Para realizar a extração gastrointestinal, 13,5 mL de fluido duodenal e 4,5 mL de fluido biliar foram adicionados à solução do sobrenadante obtida na etapa anterior (extração gástrica). O pH foi ajustado, se necessário, com NaOH 1,0 mol L⁻¹. As soluções foram colocadas na incubadora a (37 ± 1) °C sob agitação orbital a 200 rpm por 4 horas. O pH foi verificado (6,2-6,4) e a mistura foi centrifugada a 3000 rpm

por 5 minutos. Esse tempo e velocidade da centrífuga foram adequados para separação das fases e para retirada do sobrenadante.

Para avaliação da bioacessibilidade nos procedimentos (II) e (III), uma alíquota de 4,0 mL de cada fase do sobrenadante, obtidas na digestão *in vitro* (fase gástrica e fase gastrointestinal), foram combinados com 2,0 mL ácido nítrico concentrado mais 1,0 mL de peróxido de hidrogênio e aquecidos a uma temperatura máxima de 180 °C e potência máxima de 800 W dentro do frasco de digestão do forno de micro-ondas, conforme apresentado na Tabela 10 (PEIXOTO *et al.*, 2016). Após o procedimento de digestão, os digeridos foram diluídos com água ultrapura para 15,0 mL e os analitos foram determinados por ICP OES.

Tabela 10. Procedimento para decomposição do sobrenadante obtido após extração, adaptado de Peixoto *et al.* (2016).

Etapa	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Potência _{máx.} (W)	Pressão (barr)
1	6	80	800	35
2	2	80	800	35
3	3	120	800	35
4	2	120	800	35
5	10	180	800	35
6	10	180	800	35
Ventilação	10	-	0	-

Os resultados obtidos pelos testes de extração *in vitro* (I), (II) e (III) foram comparados com aqueles obtidos pelo procedimento de decomposição usando forno de micro-ondas (3.4) para determinação da bioacessibilidade (%). A fração bioacessível (FB) foi calculada usando a Equação 1:

$$FB(\%) = \frac{EB}{ET} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que, EB é a fração do elemento bioacessível (em $\mu\text{g g}^{-1}$) dado pela concentração do elemento químico encontrado nos extratos gástricos e gastrointestinais e ET é a concentração total do elemento (em $\mu\text{g g}^{-1}$) nas amostras de linhaça e gergelim.

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1 Otimização da decomposição das amostras assistida por radiação de micro-ondas

A decomposição empregando forno de micro-ondas foi investigada usando um planejamento fatorial completo de 2^4 com quatro réplicas no ponto central para quantificação multielementar de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn por ICP OES em vários tipos de amostras de linhaça e gergelim. As seguintes variáveis foram estudadas: concentração de HNO_3 (2,0-4,0 mol L^{-1}), volume de H_2O_2 (0,0-1,0 mL), temperatura (180-210°C) e tempo na última etapa de digestão (10-30 min). As concentrações de carbono dissolvido dos digeridos foram usado como resposta (Tabela 11).

O teste de curvatura no planejamento fatorial permite a avaliação da resposta quimiométrica ao redor do ponto central dos experimentos. Para este teste, a curvatura foi calculada usando a seguinte Equação 2:

$$\text{Curvatura} = R_{\text{FD}} - R_{\text{CP}} \qquad \text{Equação 2}$$

Em que, R_{FD} é a média das respostas obtidas de experimentos especificados pelo planejamento fatorial, e R_{CP} é a média das respostas obtidas para o ponto central.

Os resultados de curvatura positiva indicam uma condição de resposta quimiométrica mínima próxima ao ponto central. Resultados negativos indicam uma condição de resposta quimiométrica máxima em torno do ponto central (JESUS *et al.*, 2013).

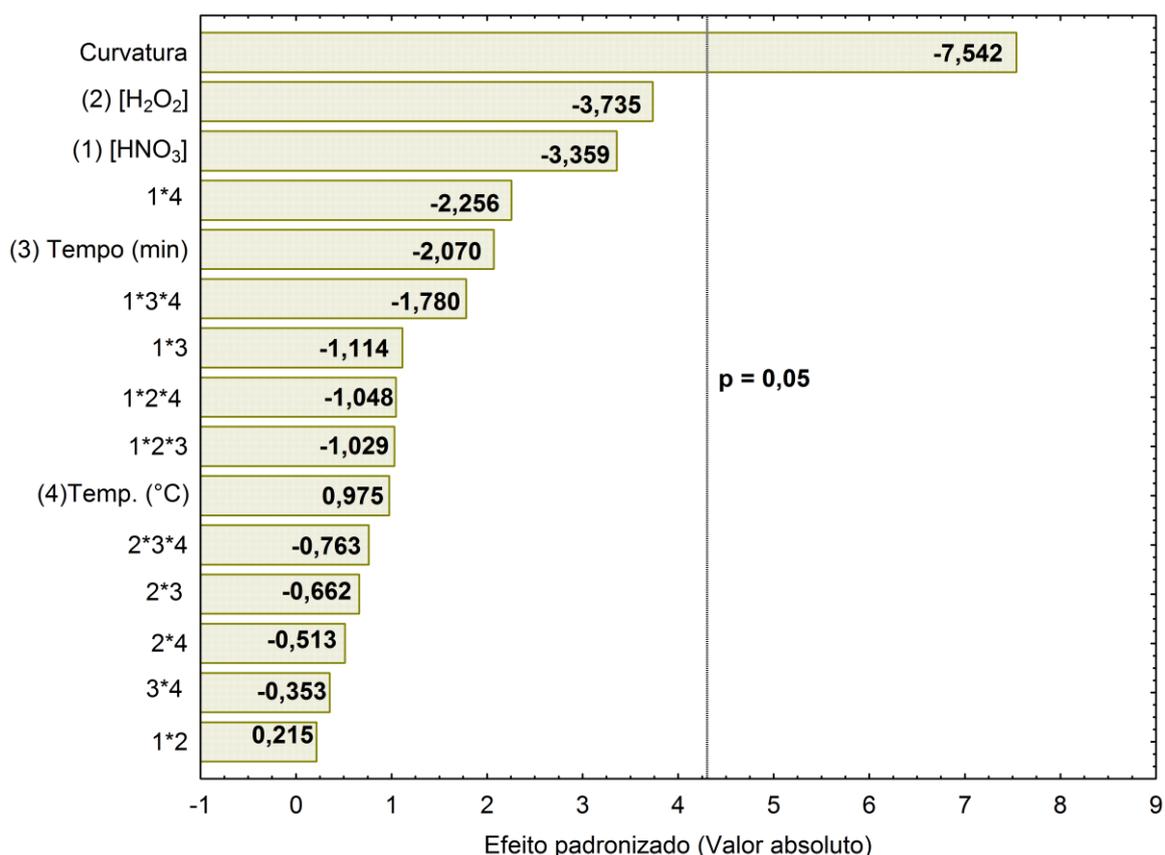
Tabela 11. Matrix do planejamento fatorial completo de dois níveis com os resultados das concentrações de carbono dissolvido para os digeridos.

Experimento	HNO₃, mol L⁻¹	H₂O₂, mL	Tempo, min	Temperatura, °C	DOC, % (m v⁻¹)
1	- (2)	- (0)	- (15)	- (180)	0,98
2	+ (4)	- (0)	- (15)	- (180)	0,95
3	- (2)	+ (1)	- (15)	- (180)	0,93
4	+ (4)	+ (1)	- (15)	- (180)	0,91
5	- (2)	- (0)	+ (25)	- (180)	0,96
6	+ (4)	- (0)	+ (25)	- (180)	0,92
7	- (2)	+ (1)	+ (25)	- (180)	0,88
8	+ (4)	+ (1)	+ (25)	- (180)	0,91
9	- (2)	- (0)	- (15)	- (210)	1,02
10	+ (4)	- (0)	- (15)	- (210)	0,94
11	- (2)	+ (1)	- (15)	- (210)	0,94
12	+ (4)	+ (1)	- (15)	- (210)	0,94
13	- (2)	- (0)	+ (25)	- (210)	1,00
14	+ (4)	- (0)	+ (25)	- (210)	0,93
15	- (2)	+ (1)	+ (25)	- (210)	0,98
16	+ (4)	+ (1)	+ (25)	- (210)	0,79
17 (PC)	0 (3)	0 (0,5)	0 (20)	0 (195)	0,70
18 (PC)	0 (3)	0 (0,5)	0 (20)	0 (195)	0,78
19 (PC)	0 (3)	0 (0,5)	0 (20)	0 (195)	0,83
20 (PC)	0 (3)	0 (0,5)	0 (20)	0 (195)	0,78

DOC: carbono orgânico dissolvido, PC: ponto central

A Figura 10 mostra o gráfico de Pareto e os resultados indicaram curvatura negativa, resultando em um máximo de condição de sinal analítico no ponto central (JESUS *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2016). Como a curvatura foi significativa ($p > 0,05$) e não houve falta de ajuste quando aplicado a análise de variância ($p\text{-valor} > 0,05$), para um nível de confiança de 95%, não foi necessário um estudo de superfície de resposta (FERREIRA, 2015), tais como, planejamento composto central (CCD), Matrix Doehlert (DM) ou planejamento de três níveis.

Figura 10. Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial aplicado na avaliação do procedimento de digestão de amostras de linhaça e gergelim.



Considerando como resposta os menores teores de carbono dissolvido na região do ponto central, bem como a sua relação com a eficiência de decomposição, ou seja, quanto menor o teor de carbono dissolvido, maior será sua eficiência de decomposição, o experimento do ponto central foi considerado adequado para decomposição das amostras.

Foi usado, então, para etapas subsequentes, 1,8 mL de HNO_3 , 65% m m⁻¹, (concentração final de 3,0 mol L⁻¹), 0,5 mL de H_2O_2 , 30% m m⁻¹, em seguida foi avolumado para 10 mL com água ultrapura. A temperatura foi de 195 °C, o tempo de 20 minutos na última etapa de digestão e, após a digestão ácida, os digeridos foram levados a um volume final de 15,0 mL. Esse volume foi adequado para assegurar uma baixa concentração ácida residual e um nível de concentração compatível com a técnica de análise escolhida para determinação dos analitos. Os resultados obtidos para as concentrações de carbono dissolvido e concentração ácida residual nas condições do ponto central foram 0,79% (m v⁻¹) e 1,35 mol L⁻¹, respectivamente.

4.2 Validação do método proposto

O método proposto foi validado, segundo ANVISA (2017), através dos seguintes parâmetros: limites de quantificação, limites de detecção, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados como a concentração de cada analito correspondente a multiplicação de dez vezes o desvio padrão de dez medidas independentes da solução do branco dividido pela inclinação da curva analítica. Os limites de detecção (LOD) foram calculados como a concentração de cada analito correspondente a multiplicação de três vezes o desvio padrão de dez medidas independentes da solução do branco dividido pela inclinação da curva analítica (ANVISA, 2017). Os valores dos LOQ e LOD, equações das retas, coeficientes de determinação e faixa linear de trabalho obtidos para os analitos determinados nas amostras de linhaça e gergelim por ICP OES, estão apresentados na Tabela 12.

Segundo a ANVISA (2017), a linearidade pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação (R) e pelo coeficiente de determinação (R²), sendo recomendado um valor do coeficiente igual a 0,99. Nota-se na Tabela 12 que os valores para os coeficientes supracitados estão de acordo com o valor recomendado pela ANVISA (2017). A faixa linear de trabalho é definida pela faixa de concentração que pode ser determinada com uma curva calibração linear, sendo o limite inferior da faixa o LOQ

que se estende até o limite superior a concentração na qual o sinal analítico desvia-se da linearidade.

Os resultados obtidos para os limites de quantificação encontrados foram comparados com um trabalho anteriormente realizado para os mesmos tipos de amostras (linhaça, gergelim, amaranto e chia) por Bolaños *et al.*, (2016). Foi empregado forno de micro-ondas para digestão ácida, usando 6 mL de HNO₃ 65% m m⁻¹, 1 mL de HCL 37% m m⁻¹ e 1 mL de solução de padrão interno de índio, a uma temperatura máxima de 235 °C durante 30 minutos, em seguida os digeridos foram avolumados para 50 mL e analisados por ICP OES.

De acordo com Bolaños *et al.*, (2016), os valores dos LOQ (em µg g⁻¹), estão concordantes com os valores encontrados neste trabalho. Por exemplo, para Cu, o valor do LOQ encontrado pelos autores foi de 0,107, enquanto que no presente trabalho o valor do LOQ foi de 0,15. Neste trabalho, para os demais elementos, foram observados maiores valores de LOQ, o que pode ser creditado ao fato de terem sido selecionadas diferentes linhas de emissão, em relação à razão sinal ruído, ao uso de diferentes ácidos e os volumes de reagentes utilizados durante o procedimento de digestão.

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (RSD) e como coeficiente de variância (CV) (ANVISA, 2017). Na Tabela 13 estão apresentados os resultados dos testes de repetitividade feitos com dez réplicas das amostras de linhaça e gergelim, respectivamente, para determinações por ICP OES. Os resultados para os CV nas amostras de linhaça variaram de 5 a 10% e nas amostras de gergelim de 3 a 9 %. Em todos os casos, os valores do CV não foram maiores do que 10%, o que está de acordo com o recomendado em ANVISA (2017).

Tabela 12. Valores de LOD, LOQ, equações das retas, coeficientes de determinação e faixa de trabalho para a determinação dos analitos por ICP OES, após decomposição das amostras em forno de micro-ondas.

Analitos	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	LOD (µg g⁻¹)	LOQ (µg g⁻¹)	Equação da Reta	R²	Faixa de trabalho (mg L⁻¹)
Ca	0,0004	0,001	0,16	0,54	$y = 27895x + 98691$	0,9995	0,001 a 200
Cu	0,0001	0,0004	0,04	0,15	$y = 285877x + 513$	0,9997	0,0004 a 5,0
Fe	0,001	0,003	0,32	1,07	$y = 22659x + 486$	0,9997	0,003 a 5,0
K	0,002	0,007	0,88	2,95	$y = 127343x + 556391$	0,9986	0,007 a 300
Mg	0,006	0,02	2,35	7,85	$y = 23413x + 56018$	0,9986	0,00013 a 200
Mn	0,00004	0,00013	0,02	0,05	$y = 218365x + 3605$	0,9994	0,0003 a 5,0
Mo	0,0001	0,0003	0,03	0,11	$y = 4347x + 56$	0,9999	0,0003 a 5,0
Na	0,003	0,008	1,00	3,35	$y = 705x + 2177$	0,9989	0,008 a 200
P	0,006	0,02	2,40	8,00	$y = 327x + 187$	0,9988	0,002 a 300
Zn	0,002	0,005	0,66	2,20	$y = 24143x + 684$	0,9999	0,005 a 5,0

Tabela 13. Resultados do teste de repetitividade nas amostras de linhaça marrom e gergelim marrom para determinações por ICP OES (n=10).

Analitos	Linhaça marrom			Gergelim marrom		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Desvio padrão	Coefficiente de variância (%)	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Desvio Padrão	Coefficiente de variância (%)
Ca	2518	215	9	12509	1149	9
Cu	27	2	8	37	1	3
Fe	120	12	10	203	6	3
K	8615	810	9	5961	308	5
Mg	3751	195	5	3511	152	4
Mn	54	5	9	43	1	3
P	5820	492	9	5923	177	3
Zn	113	10	9	159	11	7

A exatidão do método analítico foi confirmada através do grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência aceito de dois materiais certificados: farinha de arroz (CRM NIST 1568a) e farinha de soja (CRM NIST 3234). Para comparar os valores obtidos e os valores certificados, foi aplicado o teste t , ao nível de confiança de 95%, e o teste estatístico mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos analitos determinados. Os percentuais de recuperação variaram de 90 ± 2 a 98 ± 1 para farinha de soja e 90 ± 2 a 116 ± 3 para farinha de arroz, conforme apresentado nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Adicionalmente, o desempenho analítico do procedimento foi avaliado por um estudo de adição e recuperação em dois níveis de concentração: 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. As faixas do percentual de recuperação variaram de 87 a 107%, mostrando que o método analítico é exato para análise química quantitativa.

Tabela 14. Resultados obtidos pela análise do CRM NIST 3234 aplicando o método analítico proposto usando decomposição ácida assistida por micro-ondas e determinação por ICP OES

Elementos	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)	T_{cal} (T_{tab}=4,31)
Ca	3191 ± 56	2951 ± 120	94 ± 3	3,92
Cu	15,34 ± 0,26	13,77 ± 0,91	90 ± 2	3,37
Fe	80,3 ± 2,7	78,2 ± 3,5	97 ± 1	1,17
K	25010 ± 560	24546 ± 1113	98 ± 1	0,81
Mg	3487 ± 60	3247 ± 170	93 ± 2	2,75
Mn	36,78 ± 0,88	36,09 ± 1,31	98 ± 1	1,02
P	8080 ± 210	7955 ± 338	98 ± 1	0,72
Zn	48,9 ± 1,1	47,0 ± 2,0	96 ± 1	1,92

Resultados expressos em média ± SD (n=3)

Tabela 15. Resultados obtidos pela análise do CRM NIST 1866 aplicando o método analítico proposto usando decomposição ácida assistida por micro-ondas e determinação por ICP OES

Elementos	Valor certificado	Valor obtido	Recuperação (%)	T_{cal} T_{tab=4,31}
Ca	118,4 ± 3,1	119,1 ± 1,4	101 ± 1	0,89
Cu	2,35 ± 0,16	2,72 ± 0,14	116 ± 3	3,63
Fe	7,42 ± 0,44	7,44 ± 0,49	100 ± 1	0,05
K	1282 ± 11	1260 ± 57	98 ± 1	0,54
Mg	559 ± 10	560 ± 15	100 ± 1	0,13
Mn	19,2 ± 1,8	21,32 ± 0,97	111 ± 3	3,11
Mo	1,451 ± 0,048	1,399 ± 0,100	100 ± 1	0,01
Na	6,74 ± 0,19	6,05 ± 0,52	90 ± 2	1,87
P	1530 ± 40	1547 ± 37	101 ± 1	0,92
Zn	19,42 ± 0,26	19,75 ± 0,55	102 ± 1	0,85

Resultados expressos em média ± SD (n=3)

4.3 Determinação do teor total de elementos em amostras de linhaça e gergelim

O teor total de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn nas amostras de linhaça e gergelim estão apresentadas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. Maiores valores de concentração dos elementos foram encontrados para a maioria das amostras de linhaça dourada quando comparado com as amostras de linhaça marrom (Tabela 16). Isso pode se creditado ao fato da casca da semente de linhaça marrom ser mais resistente do que a casca da semente de linhaça dourada. As cascas das sementes de linhaça dourada são mais finas e suaves, que, por sua vez, podem aumentar a disponibilidade dos elementos durante a decomposição (MARQUES, 2008).

No que diz respeito às amostras de linhaça, as farinhas mostraram maiores valores de concentrações dos elementos, e isso pode ser, devido ao fato de que as farinhas de linhaça têm um menor tamanho de partícula do que a semente de

linhaça, desta forma, aumentando a área superficial e o contato com os reagentes durante a decomposição, conforme apresentado em trabalhos prévios por Souza (2015).

Os resultados para as amostras de gergelim, mostrados na Tabela 17, foram similares para os três tipos de amostras, exceto para a concentração de Ca e Na nas amostras de gergelim branco. As sementes de gergelim preto e marrom tem sua casca intacta, enquanto a semente de gergelim branco tem sua casca removida (QUEIROGA *et al.*, 2012). As concentrações de Ca nas sementes de gergelim branco foram menores do que as sementes de gergelim marrom e preto. Esse fato pode ser explicado, devido a casca dessa semente conter oxalato de cálcio e considerando que o gergelim branco passa por um processo de despeliculação, na qual possivelmente ocorre a perda de Ca. Por outro lado, os resultados da concentração de Na nas sementes de gergelim branco variaram de 191 ± 30 a 641 ± 47 , enquanto que nas sementes preta e marrom estavam abaixo do LOQ do método analítico.

Em geral, as amostras de linhaça e gergelim apresentaram maiores concentrações de Ca, K, Mg e P, normalmente maior do que $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ e baixas concentrações para os demais elementos químicos. Para algumas amostras, os resultados da concentração de Mo e Na estavam abaixo do LOQ.

Neste trabalho, os resultados encontrados para as concentrações dos elementos determinados, foram comparados com a TACO, a qual não define especificamente qual tipo de amostra, por exemplo, se marrom ou dourada (linhaça) ou se marrom, preto ou branco (gergelim), no entanto, as faixas dos valores aqui encontrados estão de acordo com os apresentados pela TACO (2011).

Resultados similares foram encontrados em trabalhos prévios realizados por Bolaños, Marchevsky e Camiña (2016) em amostras de linhaça e gergelim, exceto para Cu que estava abaixo do LOQ. Para a concentração de Fe que foi cerca de 20 vezes menor e para Mo que não foi determinado pelos autores. Essas diferenças podem ser creditadas a diferença do local de origem de cultivo, sendo um no Brasil e o outro na Turquia.

Tabela 16. Concentração dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos em amostras de linhaça e os valores da TACO (2011) e de Bolaños *et al.* (2016).

Amostras	Linhaça marrom									
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Zn
A	2471 ± 178	13,6 ± 0,2	57 ± 2	7682 ± 227	3636 ± 103	25 ± 1	0,39 ± 0,02	322 ± 14	5551 ± 326	47 ± 2
AF	2499 ± 208	14,41 ± 0,05	74 ± 2	8584 ± 516	3919 ± 70	38,3 ± 0,3	0,26 ± 0,02	60 ± 2	6075 ± 274	66 ± 1
B	2564 ± 233	15,5 ± 0,2	62,4 ± 0,8	6263 ± 226	3611 ± 138	28 ± 1	0,30 ± 0,03	851 ± 32	5840 ± 264	62 ± 2
C	2635 ± 187	13,1 ± 0,2	52 ± 2	8288 ± 116	3646 ± 131	32 ± 2	1,41 ± 0,04	<3,35	5963 ± 306	61 ± 2
D	2212 ± 163	13,2 ± 0,6	52 ± 2	6384 ± 490	3387 ± 209	24 ± 2	0,38 ± 0,03	664 ± 41	4683 ± 475	55 ± 2
E	2346 ± 26	13,6 ± 0,5	55 ± 1	9028 ± 224	3848 ± 68	37 ± 1	0,41 ± 0,01	<3,35	5839 ± 188	57 ± 2
G	2067 ± 151	13,3 ± 0,3	58 ± 1	8333 ± 247	3796 ± 117	28 ± 1	0,86 ± 0,01	933 ± 84	5964 ± 210	56,5 ± 0,2
I	2465 ± 127	13,7 ± 0,4	67 ± 1	8524 ± 237	3911 ± 79	29,4 ± 0,4	0,150 ± 0,001	<3,35	5814 ± 281	59,3 ± 0,8
L	2617 ± 122	14,2 ± 0,3	56,8 ± 0,9	6611 ± 373	3556 ± 125	27,3 ± 0,1	0,80 ± 0,03	747 ± 26	4989 ± 340	59 ± 2
M	2133 ± 60	12,1 ± 0,3	63,6 ± 0,3	8705 ± 719	4030 ± 182	26,2 ± 0,7	0,16 ± 0,01	44 ± 1	6267 ± 58	52,8 ± 0,9
O	3080 ± 128	15,7 ± 0,2	66 ± 6	6896 ± 296	3873 ± 37	30 ± 1	0,230 ± 0,005	866 ± 18	5745 ± 67	65 ± 2
P	2959 ± 99	13,0 ± 0,4	65,9 ± 0,9	8740 ± 354	3752 ± 132	59 ± 2	0,14 ± 0,01	113 ± 4	5826 ± 271	62 ± 3
Linhaça dourada										
A	2816 ± 120	11,9 ± 0,4	70 ± 1	7002 ± 66	3821 ± 25	31,6 ± ,5	0,43 ± 0,02	60 ± 2	5040 ± 76	48,8 ± 0,7
AF	2861 ± 258	12,6 ± 0,8	72 ± 5	6514 ± 306	3652 ± 227	37 ± 2	0,57 ± 0,05	123 ± 7	4705 ± 351	50 ± 3
B	3269 ± 239	16,4 ± 0,7	70,2 ± 0,9	9463 ± 726	4432 ± 314	43 ± 2	0,37 ± 0,01	<3,35	6542 ± 247	67 ± 3
D	3144 ± 51	17,4 ± 0,4	83,5 ± 0,6	9768 ± 419	4633 ± 112	29,6 ± 0,4	0,43 ± 0,04	<3,35	6117 ± 263	63 ± 2
G	3126 ± 189	22 ± 1	96 ± 8	9288 ± 126	4262 ± 149	37 ± 3	0,26 ± 0,01	<3,35	7014 ± 198	78,1 ± 0,9
H	2810 ± 49	15,4 ± 0,2	73 ± 2	7989 ± 180	3976 ± 107	29,6 ± 0,9	0,35 ± 0,03	<3,35	5841 ± 340	62 ± 3
I	2784 ± 195	16,5 ± 0,2	74 ± 1	9444 ± 443	4244 ± 167	43 ± 2	0,06 ± 0,01	<3,35	6717 ± 254	68 ± 3
J	3293 ± 173	17,4 ± 0,5	68 ± 2	8137 ± 204	3963 ± 107	39 ± 2	<0,11	<3,35	5889 ± 169	66,7 ± 0,4
K	2663 ± 147	21,2 ± 0,4	82,4 ± 0,1	7779 ± 435	4017 ± 110	39,1 ± 0,5	0,31 ± 0,02	17 ± 1	5696 ± 187	77 ± 3
L	2963 ± 102	16,5 ± 0,1	73,8 ± 0,5	9057 ± 58	4203 ± 28	47 ± 3	0,23 ± 0,01	<3,35	6201 ± 84	67 ± 1
M	3155 ± 194	17 ± 2	75 ± 3	8978 ± 778	4143 ± 243	41,8 ± 0,4	0,36 ± 0,01	<3,35	5757 ± 421	66 ± 4
N	3349 ± 249	13,0 ± 0,2	68 ± 4	7664 ± 547	4113 ± 254	29 ± 2	0,67 ± 0,02	44 ± 2	4956 ± 86	48 ± 3
O	2445 ± 41	17,4 ± 0,6	73 ± 1	9282 ± 476	3861 ± 33	61 ± 1	0,37 ± 0,03	<3,35	5684 ± 141	62,8 ± 0,9
FAIXA	2067-3349	11,9-21,2	52-96	6263-9463	3387-4633	24-61	<0,11-1,41	<3,35-866	4683-7014	47-77
TACO (2011)	2110	10,9	47	8690	3470	28,1	-	90	6150	44
Bolaños <i>et al.</i> (2016)	2121 ± 13	<0,107	0,08 ± 0,01	8070 ± 20	3681 ± 29	31,2 ± 0,3	-	234 ± 7	6275 ± 84	48,5 ± 0,9

F: farinha. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n= 3)

Tabela 17. Concentração dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos em amostras de gergelim e os valores da TACO (2011) e de Bolaños *et al.* (2016)

Gergelim marrom										
Amostras	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Zn
A	13216 ± 621	19 ± 5	73 ± 2	5762 ± 510	3432 ± 200	33,6 ± 0,6	2.35 ± 0,10	<3,35	5850 ± 247	94 ± 2
B	12825 ± 319	18,2 ± 0,7	103 ± 5,2	6152 ± 206	3568 ± 98	22,2 ± 0,7	2.55 ± 0,05	<3,35	5932 ± 137	81 ± 4
C	10317 ± 400	19 ± 1	74 ± 6	5503 ± 296	3405 ± 121	21,9 ± 0,7	1.05 ± 0,03	<3,35	5989 ± 212	82 ± 3
D	10570 ± 152	18,9 ± 0,5	55,6 ± 0,7	4526 ± 95	2527 ± 80	21,6 ± 0,7	0.30 ± 0,02	<3,35	3418 ± 86	81 ± 2
E	12793 ± 428	18,2 ± 0,7	105 ± 1	6165 ± 227	3684 ± 150	16,9 ± 0,2	0.66 ± 0,02	<3,35	6728 ± 266	93 ± 2
F	10364 ± 335	15,7 ± 0,3	79,2 ± 0,8	5723 ± 139	4176 ± 31	17,5 ± 0,3	1.77 ± 0,02	<3,35	5875 ± 104	76 ± 2
G	11165 ± 300	18,5 ± 0,6	83 ± 2	5959 ± 96	3309 ± 47	21,5 ± 0,2	2.36 ± 0,07	<3,35	5356 ± 167	81 ± 2
Gergelim preto										
A	15360 ± 804	17 ± 2	60 ± 3	4933 ± 291	2997 ± 251	21 ± 2	0,44 ± 0,02	<3,35	5191 ± 398	52 ± 5
B	14338 ± 212	15,5 ± 0,4	92 ± 6	5618 ± 31	3611 ± 62	12,3 ± 0,4	0,64 ± 0,01	<3,35	5597 ± 59	48,5 ± 0,3
C	15130 ± 891	15,4 ± 0,8	66 ± 3	5545 ± 469	3726 ± 273	18 ± 1	0,56 ± 0,02	<3,35	5629 ± 288	54 ± 2
D	14548 ± 776	15,4 ± 0,6	124 ± 8	5942 ± 285	3724 ± 171	34 ± 2	2,10 ± 0,16	<3,35	5733 ± 189	70 ± 2
E	14894 ± 987	14,9 ± 0,3	101 ± 3	5767 ± 478	3504 ± 291	32,5 ± 0,8	0,15 ± 0,01	<3,35	5163 ± 417	62 ± 5
Gergelim branco										
A	440 ± 26	17,8 ± 0,4	70 ± 3	5745 ± 198	3872 ± 128	20,9 ± 0,7	1,39 ± 0,04	239 ± 15	6806 ± 143	78 ± 4
B	595 ± 34	16,4 ± 0,7	65 ± 2	4956 ± 233	3861 ± 134	18 ± 1	1,14 ± 0,05	641 ± 47	6188 ± 161	69 ± 2
C	364 ± 25	19,0 ± 0,7	69 ± 1	5899 ± 272	3729 ± 167	19,1 ± 0,2	1,05 ± 0,01	207 ± 15	5880 ± 187	81 ± 3
D	737 ± 61	19,0 ± 0,2	68,7 ± 0,6	5684 ± 153	3505 ± 67	15,20 ± 0,01	0,63 ± 0,06	191 ± 30	5508 ± 107	72,7 ± 0,5
FAIXA	364-15360	15,4-19	55,6-124	4526-6165	2527-4176	12,3-34	0,30-2,55	<3,35-641	3418±6806	48,5-94
TACO (2011)	8250	15,1	54,0	3620	5460	26,7	-	30	7410	52,0
Bolaños <i>et al.</i> (2016)	10463 ± 152	<0,107	0,30 ± 0,01	5845 ± 77	3743 ± 49	13,7 ± 0,2	-	<0,759	8383 ± 114	66,1 ± 1,2

Resultados expressos como media ± desvio padrão (n= 3)

4.4 Emprego de diferentes métodos estáticos para avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de Cu, Fe, Mn e Zn

4.4.1 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão *in vitro* SBET

De acordo com Oomen *et al.* (2002), o SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test) é um modelo gástrico estático, o qual simula a mobilização de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em condições ácidas do estômago, enquanto o compartimento intestinal e saliva não são levados em consideração. Esse método imita as condições de jejum no trato gastrointestinal humano e foi aplicado para amostras de solo (1,0 g), utilizando-se como fluido de extração 100 mL de glicina a $0,4 \text{ mol L}^{-1}$, ajustado para pH 1,5 com ácido clorídrico concentrado, e colocado em uma incubadora com uma temperatura de 37° C durante 1h.

Pode-se perceber que é um método extremamente simples, por considerar apenas a simulação do estômago com glicina e HCl. Na Tabela 18, estão mostrados os valores de bioacessibilidade gástrica, obtidos em trabalho desenvolvido por Souza (2015), que variam de 21 a 116 % para a linhaça e 20 a 98% para gergelim. Estes valores indicam máxima extração dos elementos, uma vez que sob condições gástricas, alguns metais são facilmente liberados da matriz alimentar, permanecendo na sua forma solúvel a baixos valores de pH (HERRERA-AGUDELO, MIRÓ E ARRUDA, 2017).

Esses resultados indicam que os valores de bioacessibilidade são superestimados uma vez que a fase intestinal é desconsiderada, então os percentuais bioacessíveis encontrados são provavelmente superiores àqueles que seriam encontrados se fosse utilizada a fase intestinal, isto é, menores valores seriam observados para possível absorção pelo corpo humano.

Tabela 18. Valores de bioacessibilidade gástrica (em %) para as amostras de linhaça e gergelim usando o método SBET, adaptado de Souza (2015).

Linhaça	Cu	Fe	Mn	Zn
Marrom	36,4 ± 4,2	21,2 ± 0,1	59,6 ± 4,3	94,0 ± 7,0
Dourada	75,4 ± 4,1	25,8 ± 1,3	68,1 ± 1,2	116,0 ± 3,6
Gergelim	Cu	Fe	Mn	Zn
Marrom	44,4 ± 3,0	35,4 ± 2,3	66,8 ± 4,1	57,3 ± 4,4
Branco	57,2 ± 2,3	48,1 ± 1,6	79,2 ± 2,9	91,7 ± 2,6
Preto	20,0 ± 0,8	20,8 ± 0,5	32,2 ± 1,4	50,7 ± 4,8

Resultados expressos com média ± SD (n=3)

4.4.2 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão *in vitro* de Versantvoort *et al.* (2005).

Outro método investigado para comparação da bioacessibilidade *in vitro* de elementos essenciais foi aplicado de acordo com o trabalho desenvolvido por Silva *et al.* (2015), que usaram, como método de referência, o modelo de digestão *in vitro* descrito por Versantvoort *et al.* (2005). Esse método simula os processos digestivos sob condições de estado alimentado no trato gastrointestinal humano. Silva *et al.* (2015) utilizaram 3 g da amostra de mistura de farinhas e alimentos infantis e o volume dos fluidos salivares, gástricos, intestinais e biliares foram reduzidos à metade. Após a extração *in vitro*, os sobrenadantes (4 mL) foram coletados para posterior decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e comparação com o teor total. Vale ressaltar que os autores não realizaram nenhum tipo de validação para o método de digestão *in vitro*. Neste trabalho, o mesmo método foi aplicado em amostras de linhaça marrom e gergelim marrom, branco e preto, com o diferencial de que foi realizado o balanço de massa, de forma a validar o método de digestão *in vitro* empregado.

Devido à grande quantidade de amostra utilizada para extração *in vitro*, e , também pelo pequeno volume dos fluidos salivares e gástricos (9 mL), não foi possível realizar a coleta do sobrenadante para avaliar a bioacessibilidade gástrica nessa fase. Por conta disso, apenas a fase gastrointestinal foi avaliada e teve o sobrenadante coletado para decomposição ácida.

Foi observado também que os resultados obtidos para as amostras de linhaça marrom não apresentaram percentuais bioacessíveis detectáveis, uma vez que para todos os elementos determinados na fase gastrointestinal (Cu, Mn e Zn), os valores encontrados no teor total foram basicamente os mesmo encontrados nos resíduos e os valores bioacessíveis estão abaixo do LOQ para o método. Vale ressaltar, que dentre os elementos determinados, não foi possível determinar a bioacessibilidade de Fe nas amostras de linhaça e gergelim por esse método, uma vez que os valores das soluções dos brancos analíticos estavam acima do valor da amostra.

A Tabela 19 mostra os valores do teor total, teor bioacessível, teor do resíduo e os percentuais de recuperação encontrados para concentração de Mn, Cu e Zn nas amostras de linhaça dourada e gergelim branco, marrom e preto. Os resultados apresentaram percentuais de recuperação para, o balanço de massa, variando de 62,5 a 118% para as amostras de gergelim e 77 a 90% para as amostras de linhaça. Esses valores são concordantes com trabalhos anteriormente publicados por Herreta *et al.* (2017), cujos percentuais de recuperação variaram entre 64 e 120% e são considerados adequados para validação do método usando balanço de massa.

Tabela 19. Validação da extração *in vitro* GI de Versantvoort em linhaça e gergelim

Gergelim				
	Teor total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor bioacessível ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Resíduo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Preto				
Analito				
Mn	21,4 ± 2,0	0,30 ± 0,01 (1,4%)	21,3 ± 0,3	101 ± 1
Cu	17,3 ± 1,6	1,8 ± 0,1 (10,4%)	12 ± 1	80 ± 4
Zn	52,1 ± 4,7	<2,20	48,3 ± 0,7	92 ± 1
Marrom				
Analito				
Mn	21,5 ± 0,2	0,53 ± 0,01 (2,5%)	25,3 ± 0,8	118 ± 2
Cu	18,5 ± 0,6	2,66 ± 0,03 (14,4%)	11 ± 1	75,7 ± 0,3
Zn	80,6 ± 2,3	<2,20	83 ± 2	103 ± 2
Branco				
Analito				
Mn	19,1 ± 0,2	0,33 ± 0,03 (1,7%)	11,3 ± 0,5	62,5 ± 0,5
Cu	19,0 ± 0,7	2,6 ± 0,2 (13,7%)	15 ± 1	95 ± 4
Zn	80,7 ± 2,5	<2,20	85 ± 8	105 ± 4
Linhaça				
Dourada				
Analito				
Mn	39,1 ± 0,5	0,51 ± 0,01 (1,3%)	34 ± 1	86 ± 4
Cu	21,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2 (12,7%)	16 ± 1	90 ± 3
Zn	76,7 ± 3,3	<2,20	59 ± 2	77 ± 3

4.4.3 Bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, empregando o método de digestão *in vitro* UBM

As amostras de gergelim e linhaça foram submetidas a outro método de digestão *in vitro* UBM, desenvolvido pela BARGE, com o objetivo de produzir um procedimento validado e padronizado. Esse método foi aplicado por Tokaliogu *et al.* (2014) em amostras de suplemento nutricional, com algumas modificações, isto é, a massa e volume de reagentes foram reduzido à metade em relação ao método de referência, ou seja, mantendo a relação sólido-líquido. Essa simulação consiste em duas fases, sob condições de jejum, que produzem dois extratos por amostra teste. O primeiro extrato é o da fase gástrica que consiste de uma solução de extração removida do sistema após simulação da saliva e fluido gástrico, e o segundo extrato é o da fase gastrointestinal que consiste de uma solução de extração removida do sistema após simulação de todos os fluidos anteriores mais os fluidos duodenais e biliáticos.

A fração efetivamente liberada no trato gastrointestinal durante a digestão pode ser estimada pelos testes de bioacessibilidade. Dessa forma, esse método também foi aplicado nas amostras de linhaça dourada e marrom, e gergelim branco, marrom e preto, cujos resultados de bioacessibilidade nas fases gástrica e gastrointestinal, estão apresentados na Tabela 20.

Para todas as amostras, a bioacessibilidade dos elementos não foi maior do que 30% na fase gástrica e 10% na fase gastrointestinal. Para a linhaça, os maiores percentuais de bioacessibilidade na fase gástrica foram encontrados para concentração de Mn e Zn, e os menores percentuais foram encontrados para concentração de Cu e Fe. Para gergelim, a bioacessibilidade foi maior para os elementos Mn e Zn, e o menor para Cu e Fe. Para algumas amostras de linhaça, a bioacessibilidade para as amostras de linhaça dourada foram maiores do que a das amostras de linhaça marrom, por exemplo, Cu e Fe, na fase gástrica, e Fe e Mn na fase gastrointestinal.

Tabela 20. Frações bioacessíveis de elementos essenciais de linhaça e gergelim de acordo com o tipo de amostra, usando método UBM.

		Fase gástrica (%)			
	Amostras	Cu	Fe	Mn	Zn
Linhaça	Marrom	<0,15	4,3 ± 0,4	27 ± 1	22 ± 2
	Dourada	8,3 ± 0,7	5,6 ± 0,2	25,3 ± 0,6	18,4 ± 0,2
	Branco	12,7 ± 0,1	12,3 ± 0,1	22 ± 2	25 ± 1
Gergelim	Marrom	8,0 ± 0,8	8,6 ± 0,1	18,2 ± 0,6	20 ± 1
	Preto	3,6 ± 0,1	10,7 ± 0,1	18,5 ± 0,2	19 ± 2
		Fase gastrointestinal (%)			
Linhaça	Marrom	<0,15	3,5 ± 0,2	0,07 ± 0,04	6,8 ± 0,4
	Dourada	<0,15	4,5 ± 0,2	0,81 ± 0,08	4,3 ± 0,2
	Branco	<0,15	6,4 ± 0,2	<0,05	1,7 ± 0,1
Gergelim	Marrom	<0,15	4,9 ± 0,1	<0,05	<2,20
	Preto	<0,15	3,2 ± 0,1	<0,05	<2,20

Resultados expressos como média ± SD (n=3)

Os percentuais das frações bioacessíveis dos elementos da amostra gergelim branco, na fase gástrica, foram maiores para todas as concentrações dos elementos quando comparados com as amostras de gergelim preto e marrom. Entre esses dois tipos de gergelim, as concentrações de Fe e Mn não apresentaram diferenças significativas e apresentaram diferenças significativas para os elementos Cu (maior percentual para o gergelim marrom) e Mn (maior percentual para o gergelim preto).

Alguns fatores fisiológicos podem afetar a absorção de Cu, como por exemplo, o pH do estômago que é ácido e, conseqüentemente, favorece a disponibilidade do nutriente durante a digestão gástrica. No entanto, quando o pH é

alcalino (fase gastrointestinal), a absorção diminui devido à formação de complexos, hidróxidos e sais de cobre. Além do mais, altas concentrações de peptídeos, aminoácidos (histidina) e a competição entre cátions bivalentes (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) com quelantes bidentados prejudicam o transporte do cobre para processos no metabolismo (SCHÜMANN *et al.*, 2002, WHO, 2004; SILVA *et al.*, 2013).

Existem duas maneiras nas quais a concentração de Fe pode ser absorvido pelo intestino: (I) na forma Fe-heme, o qual está ligado ao centro do anel protoporfirina, formando uma estrutura denominada "heme", cujo nome está associado às hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina etc), a qual é facilmente absorvida pelo intestino delgado (HURRELL; EGLI, 2010.) e (II) na forma não-heme (Fe^{2+} e Fe^{3+}) que é encontrada, principalmente, em alimentos de origem vegetal e derivados de leite, necessitando de um quelante bivalente para transportá-lo.

Algumas substâncias encontradas nos alimentos podem favorecer ou inibir a absorção do Fe, modificando a sua disponibilidade. Durante a digestão gastrointestinal, os principais inibidores são: (I) a presença de fibras, que frequentemente contêm fitatos e ácidos oxálicos, os quais formam um forte quelante com diversos metais, entre eles, o Fe; (II) os polifenóis, que formam complexos insolúveis e estáveis com íons metálicos bivalentes como o Fe; (III) elevadas concentrações de cálcio inibem a absorção de ferro não-heme e (IV) as proteínas animais, como proteínas do leite, ovo e albumina inibem a absorção do Fe (COOK; MONSEN, 1976; BUZINARO; ALMEIDA; MAZETO, 2006; FANTINI *et al.*, 2008; HURRELL; EGLI, 2010).

Quando o pH varia do neutro ao básico (condição para simulação da fase gastrointestinal), a absorção do Fe não-heme (Fe^{3+}) é reduzida e há a formação do hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, e quando o pH é ácido (condição para simulação da fase gástrica), o Fe^{3+} é liberado (HURRELL; EGLI, 2010).

Na fase gástrica, cujo pH é ácido, o elemento Zn encontra-se na forma solúvel (Zn^{2+}) sendo, portanto, liberado da matriz alimentar. Este elemento encontra-se normalmente ligado a amins, grupos sulfídricos e aminoácidos (principalmente histidina e cisteína), que aumentam a absorção do Zn no intestino, pois formam complexos solúveis. Em contrapartida, a ingestão de alimentos de origem vegetal prejudicam a absorção de Zn, visto que esses alimentos contêm fitatos, fibras,

oxalatos, taninos e polifenóis que formam complexos insolúveis (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

A redução das frações bioacessíveis do Cu, Fe e Mn, na presença dos fluidos gastrointestinais (pH aproximadamente 6,3) é devido ao ferro poder formar complexos insolúveis, hidróxidos insolúveis ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), ou pela presença de fitato, o qual é carregado negativamente em uma ampla faixa de pH e tem impacto negativo em relação a biodisponibilidade de íons bivalentes e trivalentes, como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} , por exemplo. O fitato forma complexos com metais, preferencialmente, na seguinte ordem decrescente: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} (HERRERA, 2015). De acordo com Silva *et al.* (2013), a bioacessibilidade de Mn é inversamente correlacionada com a quantidade de fitato presente na amostra.

Em geral, a fração bioacessível foi maior na fase gástrica do que na fase intestinal. Isso pode ser explicado porque, na fase gástrica, devido ao baixo pH do fluido gástrico, a solubilidade do metal pode ser aumentada, podendo ocorrer a precipitação, complexação e absorção na fase gastrointestinal (TOKALIOĞLU *et al.*, 2014). A presença de componentes, tais como fitato e lignina, nas amostras de linhaça e gergelim pode afetar (diminuindo ou impedindo) a absorção dos elementos durante a digestão gastrointestinal (SANDBERG, 2002; BENEVIDES *et al.*, 2011; TOGNON, 2012). A fração bioacessível de Fe foi baixa por causa da interação do ferro com esses componentes, formando complexos (exemplo do fitato de ferro), diminuindo a bioacessibilidade desse metal (VOHRA, GRAY E KRATZER, 1965).

Para validação do método empregado, Tokalioğlu *et al.* (2014), usaram dois diferentes CRM que mais se assemelhavam às amostras de suplemento e aplicaram o mesmo procedimento de digestão *in vitro*. Segundo os autores, essa seria uma forma de comparar os resultados das frações bioacessíveis para as amostras com os valores de bioacessibilidade para os CRM. Os valores bioacessíveis para os elementos determinados mostraram similaridades entre o comportamento da amostra de suplemento nutricional, quando comparados com as amostras de material certificado durante a digestão simulada do trato gastrointestinal.

Neste trabalho, o mesmo procedimento de validação foi empregado e os valores da bioacessibilidade de Cu, Fe, Mn e Zn para o material certificado de farinha de soja e farinha de arroz, na fase gástrica e gastrointestinal, estão apresentados na Tabela 21.

Os percentuais bioacessíveis encontrados para a concentração dos elementos no CRM de farinha de soja na fase gástrica foram: Cu (2,38) e a faixa encontrada para as amostras de linhaça e gergelim variou de <0,15 a 12,7; Fe (5,16) e a faixa variou de 4,3 a 12,3; Mn (24,90) e a faixa variou de 18,2 a 27, e por fim, Zn (21,1) cuja faixa variou de 18,4 a 25. Esses resultados indicam que os percentuais de bioacessibilidade encontrados para os CRM estão dentro da faixa dos valores bioacessíveis de Cu, Fe, Mn e Zn encontrados para as amostras de linhaça e gergelim.

Em relação, aos valores dos percentuais bioacessíveis encontrados no CRM de farinha de soja, na fase gastrointestinal, foram: Cu (<0,15) e os valores de bioacessibilidade para as amostras de linhaça e gergelim estavam abaixo do limite de quantificação (<0,15); Fe (<1,07) e a faixa variou de 3,2 a 6,4, nesse caso, a diferença pode ser devido ao tamanho de partícula dos CRM que são finamente divididos, no qual há o aumento a área superficial; Mn (<0,05) e a faixa variou de <0,05 a 0,81, e finalmente Zn (2,20) e a faixa variou de <2,20 a 6,8.

Os valores de bioacessibilidade para o CRM de farinha de arroz estavam abaixo do LOQ, tanto para a fase gástrica quanto para a fase intestinal, isso pode ser devido à menor similaridade deste CRM, quando comparado com as amostras estudadas. Desta forma, o método de validação usado por Tokalioğlu *et al.* (2014), não é a maneira mais adequada de se validar o procedimento de digestão *in vitro*, sendo necessário a validação por meio do balanço de massa para cada amostra.

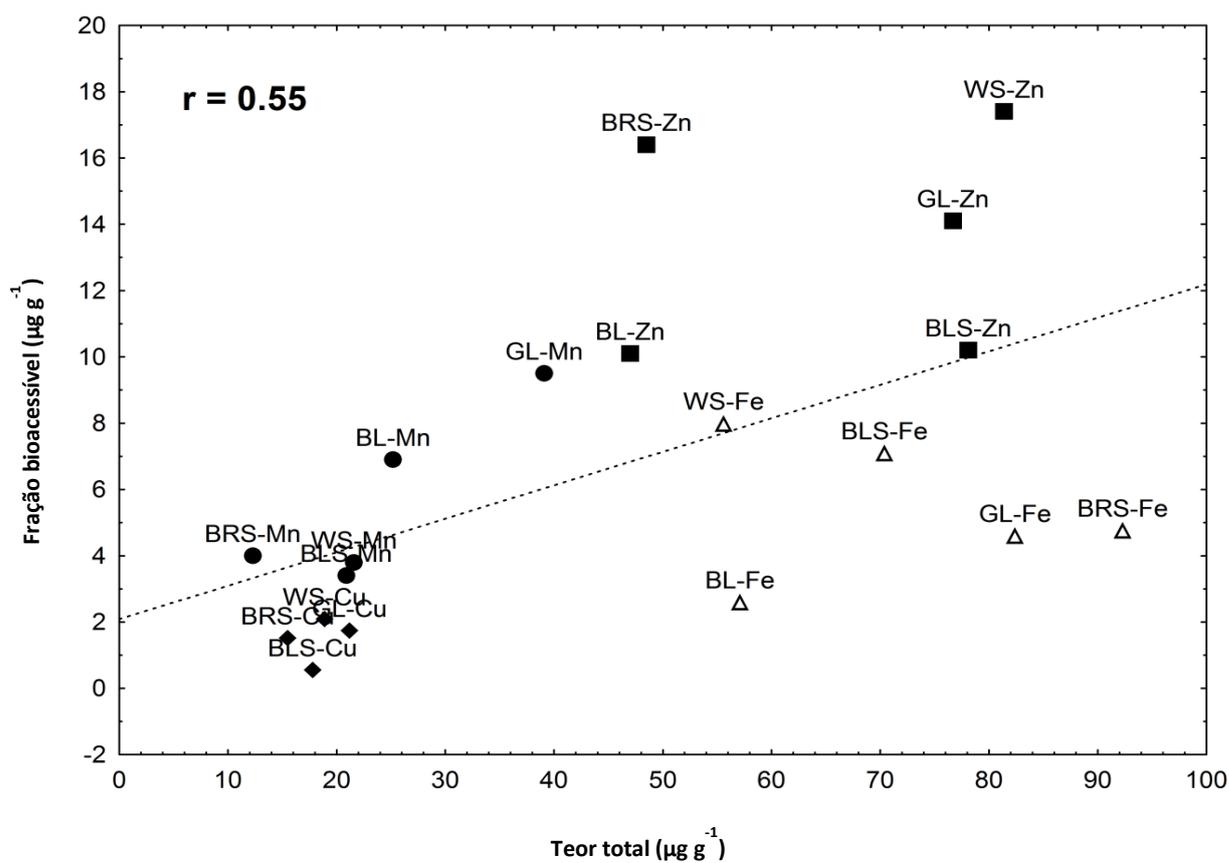
Tabela 21. Resultados para concentração total e fração bioacessível para os elementos em dois materiais de referência certificado (farinha de arroz e farinha de soja) empregando método UBM

Material de referência certificado	Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração total encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Fase gástrica ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB (%)	Fase gastrointestinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB (%)
FS	Cu	15,34 \pm 0,26	13,77 \pm 0,91	90 \pm 2	0,37 \pm 0,01	2,38	<0,15	<0,15
FA	Cu	2,35 \pm 0,16	2,72 \pm 0,14	116 \pm 3	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15
FS	Fe	80,3 \pm 2,7	78,2 \pm 3,5	97 \pm 1	4,14 \pm 0,27	5,16	<1,07	<1,07
FA	Fe	7,42 \pm 0,44	7,44 \pm 0,49	100 \pm 1	<1,07	<1,07	<1,07	<1,07
FS	Mn	36,78 \pm 0,88	36,09 \pm 1,31	98 \pm 1	9,16 \pm 0,22	24,90	<0,05	<0,05
FA	Mn	19,2 \pm 1,8	21,32 \pm 0,97	111 \pm 3	4,20 \pm 0,11	21,88	<0,05	<0,05
FS	Zn	48,9 \pm 1,1	47,0 \pm 2,0	96 \pm 1	10,32 \pm 0,22	21,10	<2,20	<2,20
FA	Zn	19,42 \pm 0,26	19,75 \pm 0,55	102 \pm 1	3,16 \pm 0,42	16,35	<2,20	<2,20

FS: farinha de soja, FA: farinha de arroz, FB: fração bioacessível. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n= 3)

Análises de regressão linear são importantes para avaliar a relação entre a concentração total e as frações bioacessíveis e esses resultados dependem do tipo de amostra analisada e elemento determinado (He e Wang, 2013). Assim, foram aplicadas análises de regressão linear entre o teor total e as frações bioacessíveis e Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça e gergelim obtendo uma correlação de 0,55. De acordo com os resultados, correlações foram observadas para Cu, Fe, Mn e Zn (Figura 11) e a liberação do teor bioacessível foi proporcional ao da concentração total.

Figura 11. Análises de regressão linear entre os teores totais e as frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça e gergelim. BL: linhaça marrom, GL: linhaça dourada, WS: gergelim branco, BRS: gergelim marrom, BLS: gergelim preto.



4.5 Comparação da bioacessibilidade in vitro de Cu, Fe, Mn e Zn empregando diferentes métodos estáticos

O método de digestão in vitro SBET, o qual leva em consideração apenas a simulação das condições gástricas, foi comparado com o método de digestão in vitro UBM (fase gástrica), para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn. Os resultados, em percentual bioacessível (%), indicaram que, para todas as concentrações dos elementos, as frações bioacessíveis foram maiores ao empregar o método SBET. Por exemplo, para as amostras de linhaça marrom, empregando o método SBET, o percentual de bioacessibilidade para Cu foi 36,5%, enquanto que no método UBM, os valores para esse elemento estavam abaixo do LOQ. Já para Fe, Mn e Zn os valores bioacessíveis foram cerca de 5, 2 e 4 vezes maiores, respectivamente, quando comparados aos resultados das frações bioacessíveis ao usar o método UBM.

Para as amostras de linhaça dourada, os percentuais das frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn e Zn foram 9, 5, 3 e 6 vezes maiores; para as amostras de gergelim marrom foram 6, 4, 8, 3 vezes maiores; para as amostras de gergelim branco foram cerca de 4 vezes maiores para todos os elementos e para as amostras de gergelim preto foram 6, 2, 2, 3 vezes maiores quando comparadas ao método de digestão in vitro UBM.

Desta forma, os valores dos percentuais bioacessíveis dos elementos, quando se emprega o método de digestão in vitro SBET, que usa apenas glicina e HCl e baixo pH do meio, são superestimados, uma vez que desconsideram enzimas importantes no processo de simulação gástrica, como por exemplo, albumina, pepsina e mucina. Além do mais, esse método também não leva em consideração a simulação da saliva, a qual é simulada a partir de soluções inorgânicas, orgânicas e enzimas que são essenciais no primeiro contato com o alimento durante a mastigação. Esse método não foi comparado ao método de digestão in vitro de Versantvoort, já que, nesse último método, não foi possível realizar a remoção do sobrenadante da fase gástrica, uma vez que a massa de amostra utilizada foi 10 vezes maior do que o recomendado pelo método. Portanto, a quantidade de volume utilizada para simulação da saliva e fluidos gástricos não foram suficientes para obter uma eficiente extração.

Entretanto, o método de digestão *in vitro* de Versantvoort foi comparado ao método de digestão *in vitro* UBM (fase intestinal). Para essa comparação, foram levadas em consideração as amostras de linhaça dourada e amostras de gergelim branco, marrom e preto, uma vez que os resultados de bioacessibilidade para as amostras de linhaça marrom estavam abaixo do LOQ para concentração de Cu, Mn e Zn. Vale ressaltar que, para o método de Versantvoort, os valores das concentrações de Fe nas soluções do branco analítico foram maiores do que nas amostras e a avaliação da bioacessibilidade desse elemento não foi possível.

Portanto, ao comparar estes dois métodos, foi possível observar que os valores dos percentuais de bioacessibilidade de Cu, Mn e Zn para as amostras de linhaça dourada empregando o método de digestão *in vitro* de Versantvoort, foram aproximadamente 12,7; 1,3 e ND (não determinado) %, respectivamente. Enquanto que, no método de digestão *in vitro* UBM, os percentuais bioacessíveis para Cu estavam abaixo do LOQ do método para as concentrações de Mn e Zn, foram 0,81 e 4,3 %, respectivamente.

Para as amostras de gergelim marrom, branco e preto, observou-se que os percentuais bioacessíveis de Cu no método de Versantvoort foram 14,4; 13,7 e 10,4, respectivamente. Em relação à concentração do Mn, os valores dos percentuais bioacessíveis foram 2,5; 1,7 e 1,4, respectivamente. Para concentração de Zn, os valores estavam abaixo do LOQ. Por outro lado, no método UBM os valores para concentração de Cu e Mn nas amostras de gergelim estavam abaixo do LOQ. Enquanto que, no método UBM, apenas para amostra de gergelim branco foram encontrados percentuais bioacessíveis de aproximadamente 1,7%

Diante dos resultados expostos comparando os dois métodos empregados (Versantvoort e UBM), notou-se que, a concentração dos três elementos avaliados (Cu, Mn e Zn), para todas as amostras de linhaça e gergelim, houve diferenças significativas entre os resultados, ao nível de confiança de 95%. Os valores para os percentuais bioacessíveis empregando o método de Versantvoort foram maiores que os do método do UBM, quando comparados os elementos Cu e Mn nas amostras de gergelim marrom e preto. Já nas amostras de linhaça dourada, as concentrações encontradas de Zn foram maiores no método UBM e menores para Cu quando comparados com o método de Versantvoort.

Em geral, pode-se dizer que os resultados usando o método de Versantvoort foram maiores do que os do método UBM, no entanto, é preciso ressaltar que mesmo este método usando maiores quantidades de amostras (3 g), não significa dizer que o aumento do percentual bioacessível foi maior por conta disso, uma vez que usando maior massa e menor volume dos extratos, não se tem uma eficiência de extração considerada adequada. Os maiores valores podem ser justificados pelo fato do método de Versantvoort fazer uso de maiores concentrações das enzimas quando comparado ao método UBM, o que pode influenciar em uma extração mais eficiente dos elementos nas amostras investigadas.

Vale ressaltar que, esses dois métodos são métodos importantes que simulam as condições do trato gastrointestinal desde a saliva até o intestino delgado, levando em consideração todos os reagentes envolvidos na simulação das soluções orgânicas, inorgânicas e enzimas, diferentemente do método SBET que é um método simplificado, que desconsidera a fase intestinal e o uso dos demais reagentes simulados nos fluidos digestivos.

Considerando que esses dois métodos são importantes referências na área de bioacessibilidade, é preciso ter cuidado nas adaptações realizadas nos mesmos, como no caso do método de Versantvoort empregado pelos autores Silva *et al.* (2013). Estes usaram uma relação sólido-líquido desproporcional e que levaram à impossibilidade da remoção do sobrenadante da fase gástrica devido ao baixo volume de solução saliva+gástrica e maior massa da amostra. Pode-se inferir, também, que essa relação sólido-líquido influencia na extração dos elementos das amostras e que os baixos percentuais bioacessíveis, bem como os altos valores nos resíduos, indicam que esse método deve ser reavaliado, conforme apresentado no Capítulo III desta tese.

Desta forma, considerando que no método UBM foram respeitadas essas relações sólido-líquido, ainda que tenham sido obtidos baixos percentuais de bioacessibilidade, uma vez que esse método faz uso de menores concentrações das enzimas aplicadas, bem como pelo método de agitação utilizado, este método foi escolhido como adequado para as análises de bioacessibilidade dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn para todos os tipos de amostras de linhaça e gergelim, quando comparados aos métodos de digestão *in vitro* SBET e de Versantvoort. Por conta

disso, os cálculos de contribuição do consumo de linhaça e gergelim para ingestão diária recomendada foram realizados levando em consideração os resultados encontrados quando aplicado o método de digestão in vitro UBM e estão apresentados no próximo item 4.6.

4.6 Contribuição do consumo de linhaça e gergelim para ingestão diária recomendada

Linhaça e gergelim são considerados importantes fontes de elementos essenciais, tais como Ca, Cu, Fe, K, Mg, P, Zn e Mn (Tabelas 16 e 17). No entanto, considerando a fração bioacessível, os valores das concentrações para a contribuição do consumo são reduzidos. A contribuição, em %, da linhaça e do gergelim (15 g dia⁻¹) para ingestão diária recomendada (IDR) de elementos essenciais está apresentada nas Tabelas 22 e 23, respectivamente (ANVISA, 2005).

O teor total e a fração bioacessível foram calculados a partir dos resultados obtidos, considerando o IDR para Cu (900 µg), Fe (14 mg), Mn (2,3 mg) e Zn (7 mg) para adultos com 70 Kg (ANVISA, 2005). A contribuição do teor total de Fe, por exemplo, nas amostras de linhaça marrom foi 3,7% (m m⁻¹), enquanto a fração bioacessível na fase gástrica foi 1,0% e na fase gastrointestinal foi 0,2% (m m⁻¹). O mesmo comportamento foi observado, também, para as amostras de linhaça dourada para todos os elementos. Para as amostras de gergelim marrom, a contribuição do teor total de Zn foi 20% (m m⁻¹), enquanto a fração bioacessível, na fase gástrica, foi 2,1% (m m⁻¹) e, na fase gastrointestinal foi 0,2% (m m⁻¹). Comportamento similar também foi observado para as amostras de gergelim preto e branco para todos os elementos. Desta forma, a avaliação da contribuição levando em consideração apenas a concentração total não é suficiente para estimar o risco ou benefício relacionado com a ingestão desses alimentos.

Tabela 22. Contribuição (%) do consumo de linhaça marrom e dourada para o IDR de elementos (15 g dia⁻¹).

Elemento	Teor total	Fração bioacessível- Fase gástrica	Fração bioacessível- Fase gastrointestinal
Cu	22	Até 2,90	0,91 – 3,50
Fe	6,2	0,20 – 0,48	0,51 – 0,86
Mn	16,4	4,5 – 6,2	2,2 – 2,5
Zn	10	2,2 – 3,0	2,1 – 3,7

Tabela 23. Contribuição (%) do consumo de gergelim branco, preto e marrom para o IDR dos elementos (15 g dia⁻¹).

Elemento	Teor total	Fração bioacessível- Fase gástrica	Fração bioacessível- Fase gastrointestinal
Cu	32	<0,15	<0,15
Fe	7,9	0,20 – 0,34	0,20 – 0,40
Mn	21,9	Até 0,20	<0,05
Zn	20,0	0,70	Até 0,30

5. Considerações finais

Observou-se que os diferentes métodos de digestão *in vitro* aplicados para avaliação da bioacessibilidade estática foram de extrema importância para entender o comportamento das amostras de linhaça e gergelim em condições cujo método é simplista ou completo. Com isso, pôde-se concluir que o método SBET, que não considera a fase intestinal, superestima os teores bioacessíveis, enquanto que os métodos mais completos, como o UBM e o de Versantvoort levam em consideração a fase intestinal e todos os reagentes inorgânicos, orgânicos e enzimas desde o fluido salivar até o fluido biliar.

Os dois últimos métodos, ambos são validados *in vivo*, mas a relação sólido-líquido utilizada pelos autores que empregaram o método baseado em Versantvoort deve ser verificada, uma vez que a fase gástrica não foi possível de ser realizada por não conter volume de sobrenadante suficiente para coleta, mesmo após centrifugação. Desta forma, o método empregado pelo autor que utilizou o UBM foi considerado o mais adequado entre os três avaliados, primeiro por ser um método completo e validado e, segundo, pelas proporções e relação sólido-líquido terem sido levadas em consideração.

A composição mineral e a fração bioacessível das amostras de linhaça marrom e dourada variaram de acordo com o tipo de amostra. As maiores concentrações em termos do teor total e da fração bioacessível foram encontradas para as amostras de linhaça dourada. As análises de regressão linear mostraram que há relação entre o teor total e a fração bioacessível para Cu, Fe, Mn e Zn. Em geral, os elementos presentes nas amostras de linhaça e gergelim não foram completamente liberados da matriz durante a digestão gastrointestinal e a contribuição do consumo de linhaça e gergelim para o IDR dos nutrientes foi menor, considerando as frações bioacessíveis do que o teor total. Esse fato mostra a importância da avaliação da bioacessibilidade de minerais para estimar o risco ou benefício relacionado com a ingestão desses alimentos.

Capítulo III. Sistema de microextração dinâmica de fluxo contínuo para avaliação *in vitro* automática da bioacessibilidade de Cu, Fe e Mn no quimo em linhaça

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar e propor um sistema dinâmico de fluxo automático hifenizado a um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado para explorar o trânsito do quimo do compartimento gástrico para os compartimentos duodenais com base no método de estado alimentado de Versantvoort demonstrada por análise on-line visando a determinação das concentrações bioacessíveis de micronutrientes (Mn, Fe e Cu) em linhaça dourada e marrom com alta resolução temporal.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar diferentes tipos de agitação (magnética, por inversão e orbital) aplicada aos métodos de digestão *in vitro* em batelada;
- Avaliar o uso de diferentes tipos de coluna de extração (célula de fluxo com agitação magnética e coluna de grande diâmetro);
- Verificar diferentes tipos de filtros de membrana (nylon e fluoreto de polivinilideno) e diferentes porosidades (0,45 e 5 μm);
- Avaliar três vazões do extratante (0,5, 1,0 e 1,5 mL min^{-1});
- Investigar o efeito da temperatura para o procedimento de extração *in vitro* (temperatura ambiente e 37 °C);
- Comparar o método de digestão *in vitro* em batelada com o método de extração em fluxo proposto;
- Comparar os valores das concentrações através do balanço de massa.

3. Experimental

O desenvolvimento do sistema por injeção sequencial proposto para o estudo da bioacessibilidade de micronutrientes em linhaça foi realizada na Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Maiorca, Espanha, no laboratório de Análisis para Inyección en Flujo y Análisis de Trazas (FI-TRACE), coordenado pelo Prof. Dr. Manuel Miró Lladó.

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas de reagentes analíticos usando água deionizada produzida por um sistema de purificação Milli-Q (18,2 MΩ cm, Millipore Synthesis A10, Billerica, EUA). Uma solução padrão multielementar 5 (TraceCERT, Fluka Sant Louis) foi usada para calibração no ICP OES. Os extratos gastrointestinal/quimo foram analisados por um protocolo de matriz combinada usando soluções de trabalho o padrão multielementar. O recipiente de polietileno (Corning®) e vidraria foi embebido em 10% (v/v) de ácido nítrico por aproximadamente 24h e enxaguado três vezes com água milli-Q.

Fluidos digestivos baseados fisiologicamente foram compostos de reagentes orgânicos, enzimas e sais de acordo com UBM (BARGE, 2011), no entanto com um aumento na concentração de enzimas por um fator de 4-10 (condições preservadas) ao longo dos vários fluidos corporais no mimetismo do estado alimentado, como previamente sugerido pelo método de Versantvoort (2005) e FOREhst (CAVE *et al.*, 2010).

Em resumo, a saliva *in vitro* (pH 6,8 ± 0,2) é composta por: 298 mg L⁻¹ NaCl, 200 mg L⁻¹ KSCN, 896 mg L⁻¹ KCl, 1694 mg L⁻¹ NaHCO₃, 570 mg L⁻¹ Na₂SO₄, 888 mg L⁻¹ NaH₂PO₄, 200 mg L⁻¹ ureia, 30 mg L⁻¹ ácido úrico, 580 mg L⁻¹ alfa amilase de *Bacillus* SP (1594 unidades mg⁻¹ proteína, Sigma, A-6814) e 50 mg L⁻¹ mucina de estômago porcino (tipo II, Sigma, M2378).

A fase gástrica simulada (pH 1,30 ± 0.02) consiste de 2752 mg L⁻¹ NaCl, 824 mg L⁻¹ KCl, 266 mg L⁻¹ NaH₂PO₄, 306 mg L⁻¹ NH₄Cl, 400 mg L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 85 mg L⁻¹ ureia, 20 mg L⁻¹ ácido glucurônico, 650 mg L⁻¹ glicose, 330 mg L⁻¹ hidrocloreto de glucosamina, 6,5 mL (HCl 37% m m⁻¹), 2000 mg L⁻¹ albumina de soro bovino (BSA, Merck, 112018, Darmstadt, Alemanha), 5000 mg L⁻¹ pepsina da mucosa gástrica suína (0,7 FIP-U mg⁻¹, Merck, 107185) e 6000 mg L⁻¹ mucina.

O fluido duodenal *in vitro* (pH 8,1 ± 0,2) consiste de 7012 mg L⁻¹ NaCl, 564 mg L⁻¹ KCl, 200 mg L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 50 mg L⁻¹ MgCl₂, 3388 mg L⁻¹ NaHCO₃, 80 mg L⁻¹ KH₂PO₄, 100mg L⁻¹ ureia, 180 μL L⁻¹ (HCl 37%), 2000 mg L⁻¹ BSA, 18000 mg L⁻¹ pancreatina de pâncreas de porco (24000 FIP-U g⁻¹ lipase, 1400 FIP-U g⁻¹ protease,

30000 FIP-U g⁻¹ amilase, Merck, 107133) e 3000 mg L⁻¹ lipase de pâncreas de porco (114 unidades mg⁻¹ proteínas, Sigma, L-3126).

O fluido biliar simulado (pH 8,2 ± 0,2) contém 5260 mg L⁻¹ NaCl, 376 mg L⁻¹ KCl, 222 mg L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 5785 mg L⁻¹ NaHCO₃, 250 mg L⁻¹ ureia, 150 µL L⁻¹ HCl (37%), 3600 mg L⁻¹ BSA e 60000 mg L⁻¹ bile de pâncreas de porco (Sigma, B-3883).

Todas as soluções corporais foram submetidas à agitação (100 rpm) por aproximadamente 3 h destinado à dissolução dos sais junto com componentes enzimáticos e orgânicos que foram mantidos durante a noite em temperatura ambiente. A presença de mucina, pancreatina e lipase nos fluidos corporais conta com a formação de suspensões. No mesmo dia das análises, os fluidos orais mencionados acima foram aquecidos a 37 ± 1 °C por 1h para ativação das enzimas. O extratante gástrico foi preparado pela mistura de 6,6 mL de saliva e 13,4 mL de fluido gástrico e o extratante GI/quimo foi preparado pela mistura de extrato gástrico com 13,4 mL de fluido duodenal, 6,6 mL de bile e 2,2 mL de NaHCO₃.

Ácido nítrico (69% m m⁻¹, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado para digestão assistida por micro-ondas de linhaça e resíduos de extração em estudo de validação de balanço de massa.

Linhaça dourada (BGL) e linhaça marrom (BL) a granel foram adquiridas em uma loja de alimentos naturais em Salvador, Bahia, Brasil e um pacote de linhaça dourada (SGL) foi adquirida em uma loja de comidas naturais em Palma de Maiorca, Ilhas Baleares, Espanha.

Antes dos ensaios de bioacessibilidade oral, as amostras de linhaça finamente moídas foram obtidas usando um moinho analítico (IKA M20, KG. Staufen, Alemanha) por 10 segundos de modo a imitar o processo de moagem na boca e obter informações sobre os grupos bioacessíveis máximos de micronutrientes, o que está de acordo com estudos anteriores que relatam estudos de bioacessibilidade em produtos alimentícios (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012; LAKSHMI E KAUL *et al.*, 2011; HORNER E BEAUCHEMIN, 2012; LAMSAL E BEAUCHEMIN, 2015). Deve ser levado em conta que o esmagamento de sementes e alimentos relacionados é uma prática comum nos últimos anos para tirar proveito de seus benefícios nutricionais humanos.

3.2 Instrumentação analítica

3.2.1 Diagrama de fluxo

A configuração física do sistema de fluxo hifenizado controlado pelo programa sem licença Cocosoft (COCOVI-SOLBERG E MIRÓ, 2015) para avaliação das concentrações bioacessíveis do quimo dinâmico de Cu, Fe e Mn, em linhaça marrom e dourada, está apresentada na Figura 12. O sistema em fluxo foi composto por uma bomba de micro-seringa bidirecional de 3000-passos autônoma (SP; CAVRO XP3000, Männedorf, Suíça) para manipulação dos fluidos digestivos e bombeamento dos plugs amostrais. O gerenciamento de soluções realizado pela micro-seringa foi realizado por controle de software viabilizando a interação entre os fluidos extratores e amostra em uma câmara de extração (LBC).

A SP foi constituída com seringa de êmbolo de vidro à prova de gás ($V_i = 5$ mL) (Hamilton, Suíça) e uma válvula solenóide de três vias, que permitia a aspiração do transportador (água milli-Q) do reservatório externo ou, alternativamente, o bombeamento do carregador através do caminho analítico. Uma válvula rotativa multiporta de 8 portas (SV; Crison Instruments, Espanha) foi empregada para manipulação automática dos fluidos gástrico e GI, assim como os extratos gástrico /quimo/ gastrointestinal. Os comandos de injeção em fluxo sequencial para cada porta da válvula de seleção estão apresentados na Tabela 24. As portas periféricas de SV servem, também, para conectar o SP com (i) câmara de extração (ver abaixo), (ii) um homogeneizador de extrato feito de uma ponta de pipeta de 5 mL, (iii) ICP OES (Figura 13), (iv) ar e (v) descarte, usando tubos de politetrafluoretileno (PTFE) (1,5 mm d.i.) e rosca de polieteretercetona. A SP foi conectado à porta central SV, usando um canal central (HC) feito de tubo de PTFE de 3,0 metros de comprimento com capacidade de 5,3 mL.

Para uma injeção precisa de volumes medidos de extratos do quimo/gastrointestinal por ICP OES, uma válvula injetora de 6 portas (IV) foi equipada com uma bobina de 300 μ L. As válvulas SV e IV se comunicaram através de uma linha de transferência de PTFE de 110 μ L com 0,76 mm de diâmetro interno.

Tabela 24. Comandos de injeção em fluxo sequencial para cada porta da válvula de seleção.

Porta 1	Aspirar o extratante para válvula de injeção
Porta 2	Aspirar ar para separar as soluções e enviar ar para homogeneizar o extratante na porta 4
Porta 3	Descartar excesso de soluções
Porta 4	Homogeneizar o extratante G/GI e verificar o pH
Porta 5	Enviar o composto de saliva + suco gástrico ou composto de bile + suco duodenal + NaHCO ₃ para LBC
Porta 6	Aspirar o composto de saliva + suco gástrico
Porta 7	Aspirar o composto de bile + suco duodenal + NaHCO ₃
Porta 8	Aspirar o extratante para o reservatório de extração e enviar o extratante para válvula de injeção

Figura 12. Ilustração esquemática do sistema de fluxo com análise on-line acoplado ao ICP OES para monitoramento automático da extração GI *in vitro* de Mn, Fe e Cu em linhaça dourada e marrom. HC: Canal central, IV: Válvula de injeção, PP: Bomba peristáltica, SV: Válvula de seleção de posições múltiplas, C: Transportador: água Milli-Q.

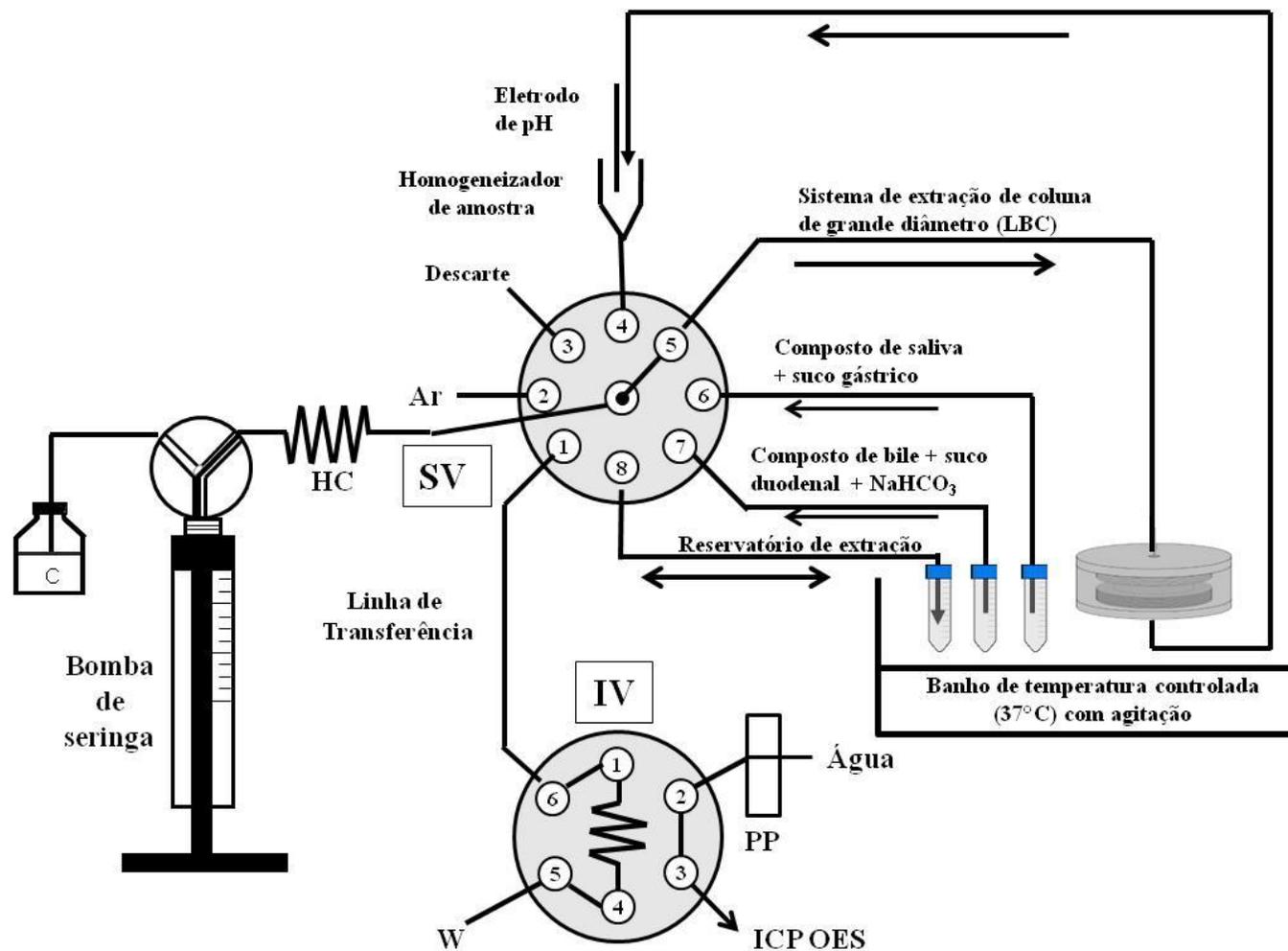


Figura 13. Sistema de injeção sequencial hifenizado ao espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.



3.2.2 Teste de extração dinâmica on-line para suporte de membrana

Neste trabalho, a câmara de extração empregada consistiu em uma coluna de grande diâmetro (LBC) composta por dois suportes de filtro de polipropileno com junção por rosqueamento e conectores de fluxo constituído de PTFE. Ambos os porta filtros foram perfurados radialmente com um número de 18 aberturas retangulares (5 mm de comprimento, 1 mm de largura), para permitir o livre fluxo do extrator e retenção das amostras alimentícias sólidas, atuando como um filtro de membrana. O dispositivo de extração em fluxo montado possui um volume interno de 2,8 mL (altura: 22 mm e diâmetro: 47 mm). A viabilidade da LBC para extrações gastrointestinais em linha foi comparada com câmara de fluxo com agitação magnética (SFC), previamente descrita na literatura para testes de bioacessibilidade de materiais do solo (SHIOWATANA *et al.*, 2001).

A diferença primária entre as câmaras de extração dinâmica (LBC vs SFC) é o uso de agitação magnética em SFC e os volumes mortos distintos da coluna. Enquanto SFC usualmente carrega volumes internos de 10-15 mL (Rosende *et al.*, 2014; Shiwatana *et al.*, 2001), os de LBC são geralmente < 3 mL (Buanuam *et al.*, 2006), que por sua vez, permitem alta resolução temporal no curso da extração dinâmica. Membrana de filtros de difluoreto de polivinilidene (PVDF, Merck, Millipore, Espanha) com tamanhos de poros de 0,45 ou 5,0 μm e membrana de filtro de nylon (GE, Osmonics Labsto, EUA) com tamanho de poro de 0,45 μm , cada um com diâmetro de 47 mm, foram avaliadas nas duas câmaras como um suporte para permitir que os constituintes de linhaça dissolvidos fluíssem sem o carreamento do extrato sólido para evitar a obstrução dos poros da membrana.

Na configuração final, o sistema LBC foi interfaceado entre a SV e o homogeneizador de extratos (Figura 12) usando tubo de PTFE (20 cm x 1,5 mm) na entrada, por um tubo de PTFE (53 cm x 0,8 mm) na saída, seguido por um tubo de PTFE (7 cm x 1,5 mm). Uma determinada quantidade de linhaça (250 ou 500 mg) foi pesada no filtro de membrana LBC e os suportes do filtro carregado de amostra foram apertados, aguardando incorporação na configuração de fluxo.

3.2.3 Aparelhos e técnica de detecção

Um agitador magnético e um dispositivo de aquecimento combinados com uma termoregulação digital (VELP Scintifica, Itália) foram usados para definição e monitoramento da temperatura do banho d'água, que incorporou os extratores gástricos e GI, e o dispositivo de extração de LBC carregado de amostra, a $37,0 \pm 2,0$ °C (ver Figura 12). O agitador foi afixado em 300 rpm para os constituintes gástricos e GI para estarem bem dispersos antes do uso.

Medidas automáticas de pH dos extratos GI foram gravadas continuamente usando um medidor de pH de pequeno volume (Eletrodo fino de poro duplo, Hamilton, Reno, EUA) conectado a um potenciômetro digital (Eutech Instruments, modelo PC2700, Toronto, Canadá).

Os extratos do fluido quimo/GI (micronutrientes bioacessíveis), a fração sólida residual (micronutrientes não-bioacessíveis) e a amostra de linhaça, após digestão assistida por micro-ondas (teor total do micronutriente), foram analisados por ICP OES (PerkinElmer Optima 5300DV), como detalhado na sequência:

I) Protocolo de digestão por micro-ondas

A linhaça dourada e marrom e os resíduos sólidos remanescentes da extração gastrointestinal foram digeridos para quantificação total de metais e frações de metais não bioacessíveis, respectivamente. As membranas do filtro PVDF contendo resíduos de linhaça, foram removidas do LBC e secas a 105 ° C durante a noite. A decomposição das amostras, resíduos e brancos foi realizada em um sistema de digestão por micro-ondas de vaso fechado equipado com vasos XP1500 (CEM MARS5, CEM Corporation, Matthews, NC, EUA).

As amostras sólidas pesadas (200 mg), ou o resíduo de digestão bioacessível total, foram digeridos usando 10 mL de HNO₃ (65% m m⁻¹) com um tempo de rampa de 15 min até 200 °C seguido de um tempo de espera de 15 min a 200 °C (CEM). Após o resfriamento, sempre que necessário, as digestões foram filtradas através de filtros de acetato de celulose (Whatman 40). As digestões límpidas foram transferidas para frascos de polietileno de 50 mL, compostas com

água Milli-Q e analisadas por ICP OES, usando um nebulizador Gen cone ® e calibração externa preparada em 2% (v/v) de HNO₃.

II) Análise automática on-line de extratos de GI por ICP OES

O espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer Optima 5300DV) foi equipado com um nebulizador de sólidos altamente dissolvidos Gen Cone e uma câmara de nebulização ciclônica. As análises foram registradas on-line com modo de visualização axial, tempo de leitura de 1 segundo e tempo de integração de 250 ms. A área do pico transitório foi utilizada como medida analítica para traçar as frações bioacessíveis dos micronutrientes na linhaça dourada e marrom. A Tabela 25 apresenta as condições de operação do espectrômetro.

Tabela 25. Condições de operação do equipamento ICP OES para determinação quantitativa de Cu, Fe e Mn.

Parâmetros de operação do equipamento ICP OES	
Tipo de nebulizador	Gen Cone®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Configuração do plasma	Axial
Potência de rádio frequência (W)	1300
Frequência	40 MHz
Vazão de argônio de refrigeração (L min ⁻¹)	15
Vazão de argônio auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Taxa de fluxo (L min ⁻¹)	0,7
Vazão do gás de nebulização (mL min ⁻¹)	1,0
Linhas de emissão (nm):	Fe (II) 238,204 e 259,939
Linha atômica (I)	Cu (I) 324,752 e 327,393
Linha iônica (II)	Mn (II) 257,610 e 259,372

Todas as sequências de vazão programáveis foram executadas por um computador pessoal executando o software Cocosoft 4.3 escrito em Python (COCOVI-SOLBERG E MIRÓ, 2015). O software permite, através de uma interface RS232, o controle de entrega de fluido SP, a seleção de portas periféricas do SV e IV e a ativação de retransmissão do espectrômetro através do conector de banda de barreira de 6 pinos da saída digital do Cavro XP300 SP autônomo.

3.3 Procedimento analítico para medida da bioacessibilidade do quimo on-line

O extrator LBC foi inicialmente carregado com uma quantidade de amostra de linhaça dourada ou marrom, usando um filtro de membrana (47 mm de diâmetro) para reter as partículas de alimentos. A bomba peristáltica do equipamento foi programada para trazer um fluxo constante do transportador para o espectrômetro usando a IV (Figura 12) modo de carga comutada. O equipamento foi alimentado com água mili-Q no lugar da solução de HNO_3 2% (v v^{-1}) para evitar a precipitação de proteínas dos extratos do quimo/GI nas condutas de vazão e nebulização também. O protocolo analítico automático é composto de quatro etapas distintas como detalhado na sequência:

I) Procedimento de extração gástrica dinâmica

O procedimento operacional começa pelo carregamento da linha de tubulação de 60cm-PTFE de 0,8 mm de diâmetro interno, conectando com o composto saliva + fluido gástrico (SV, porta 6 na Figura 12), e o HC com fluido gástrico e água mili-Q, respectivamente. O procedimento analítico automático continua com o desenho de 100 μL de ar (porta 2 de SV, Figura 12) em HC visando superar a mistura do fluido digestivo biorelevante com o transportador. Depois disso, uma quantidade do volume do fluido do suco gástrico simulado (4900 μL) foi aspirado da porta 6 (Figura 12) a 10 mL min^{-1} em direção ao HC. A SP foi, então, programada para atravessar o extrator contendo a amostra de linhaça (SV, porta 5 na

Figura 12) com o volume do extratante a uma taxa de fluxo fixa de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ainda mantendo o plugue de ar no HC.

O extrato gástrico foi coletado na ponta da pipeta de propileno, agindo como recipiente de extrato ligado a uma das portas do SV (porta 4, Figura 12). O recipiente do extrato permite coletar o extrato gástrico e remover das bolhas de gás que evoluíram durante a digestão da linhaça sob condições ácidas. Um volume de 1 mL de ar foi trazido para dentro do recipiente de extração para ajudar na homogeneização do extrato gástrico. O recipiente foi então esvaziado pela retirada do volume do extrato para o HC, e o SP foi então programado para bombear os primeiros 4,9 mL de lixiviado gástrico em direção ao reservatório de extrato na porta 8 da SV. O procedimento acima foi repetido três vezes usando alíquotas de $4900 \mu\text{L}$ extratante gástrico e mais uma vez com um volume de extratante de $400 \mu\text{L}$ para obter uma fase gástrica final de 20,0 mL, de modo a coincidir com os resultados experimentais das extrações em modo batelada, como será explicado no item **4.2.1**.

Depois disso, $1000 \mu\text{L}$ de ar foram trazidos de SV (porta 2, Figura 12) através da porta 8 para lavar as sobras da fase gástrica no tubo de ligação, seguido por aspiração de $500 \mu\text{L}$ de extrato gástrico homogeneizado (porta 8 de SV, Figura 12) a 10 mL min^{-1} . O SP foi então ativado para dispensar $500 \mu\text{L}$ do lixiviado gástrico em direção à bobina de injeção de IV a 5 mL min^{-1} de modo a coletar $300 \mu\text{L}$ para uma análise mais detalhada e o excedente de ar sendo entregue a 10 mL min^{-1} para o descarte. O equipamento foi então acionado por retransmissão e o IV virou-se para “injetar” para o registro do sinal transitório da fração gástrica global bioacessível de micronutrientes. As análises empregando o ICP OES estavam em todos os casos sincronizados com a amostragem das frações gástricas/quimo/GI.

II) Geração automática do extratante gastrointestinal:

Após o procedimento de extração gástrica dinâmica, $100 \mu\text{L}$ de ar e $4900 \mu\text{L}$ do composto duodeno + bile simulado + HCO_3^- para ajuste de pH (porta 7, Figura 12) foram consecutivamente direcionados para o HC a 10 mL min^{-1} . Após a reversão do fluxo, o fluido intestinal simulado foi misturado com o lixiviado gástrico no reservatório do extrato na porta 8 do SV. Essa etapa foi repetida três vezes pela

aspiração de 4900 μL de composto de duodeno + bile + HCO_3^- e uma vez mais com 2620 μL para somar um volume total do fluido intestinal de 22,22 mL para manter a proporção de volume da fase gástrica e gastrointestinal como endossado pelo método de Versantvoort (2005). O extratante gastrointestinal composto de extrato gástrico + o composto de duodeno + bile e HCO_3^- (para ajustar o pH), foi automaticamente gerado para posterior uso.

III) Análises on-line da bioacessibilidade de micronutrientes no quimo/GI em sementes:

Para avaliação dinâmica da bioacessibilidade do quimo/GI dos elementos, 100 μL de ar (porta 2 na Figura 12) e 650 μL de biofluido composto GI (porta 7) foram consecutivamente aspirados a 10 mL min^{-1} em HC. Invertendo o fluxo, o extrator GI atravessou o extrator LBC contendo linhaça, preenchido com o fluido gástrico em 1,0 mL min^{-1} (0,5, 1,0 ou 1,5 mL min^{-1} em testes preliminares), mantendo o volume de ar em HC. O conteúdo da fase gástrica nas linhas de fluxo e extrator LBC foi deslocado por lavagem com extratante GI. O primeiro extrato do quimo foi, então, colocado dentro do coletor de extração na porta 4 e homogeneizado por borbulhamento de 1,0 mL de plugue de ar a 10 mL min^{-1} . Após a etapa de homogeneização, o valor de pH foi automaticamente medido e o teor total do recipiente foi dispensado em um modo de reversão do sentido de fluxo em direção a bobina de injeção de IV a 5 mL min^{-1} .

O espectrômetro foi, então, acionado e o IV mudou de injeção para gravação dos sinais transientes. O procedimento automático acima foi repetido 19 vezes (19 frações), com um volume de extratante de 650 μL cada um, para investigação da cinética de bioacessibilidade de micronutrientes a partir do quimo, no trânsito para o duodeno com alta resolução temporal. O volume remanescente de extrato composto gástrico + duodenal foi processado on-line através da amostra, de modo a obter 10 frações adicionais (3 mL cada) dos nutrientes bioacessíveis GI. Após o ensaio de bioacessibilidade oral on-line, as condutas de fluxo e o extrator LBC foram lavados com 5 mL de 2% (v/v) de ácido nítrico seguido por 10 mL água mili-Q para contornar a contaminação cruzada da amostra.

IV) Calibração on-line automática do método baseado nas determinações por ICP OES:

Uma calibração externa de cinco pontos combinada por matriz (em meio GI filtrado através de membrana de PVDF de 5,0 μm) foi usada para determinação dos micronutrientes bioacessíveis no quimo/GI em linhaça dourada e marrom. Aqui, um conjunto de 5 padrões multi-elementares (0, 20, 50, 100 e 200 μL^{-1} de Mn e Cu, e 0, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe) foram aspirados da porta 4 de SV e analisado on-line por ICP OES.

3.4 Método em batelada

Os ensaios de extração fundamentados fisiologicamente em batelada foram baseados naquele proposto por Versantvoort *et al.* (2005) com algumas modificações. Em resumo, 6 mL de saliva foram adicionados a 0,5 g de linhaça moída e a mistura foi incubada a 37 ± 2 °C por 5 min. Depois disso, 12 mL de fluido gástrico foram adicionados e a mistura foi submetida a agitação orbital a 55 rpm a 37 ± 2 °C por 2h. Finalmente, 6 mL de bile, 12 mL de fluido duodenal e 2,0 mL de 1,0 mol L^{-1} de HCO_3^- foram consecutivamente adicionados e a mistura foi agitada por mais 2h na mesma temperatura usando agitação orbital a 55 rpm. Após os testes de extração *in vitro*, os tubos de digestão foram centrifugados a 2750 g (~3500 rpm) por 5 min, de modo a isolar o sobrenadante, isso é, o extrato GI da fração sólida. Finalmente, os extratos GI foram filtrados através de filtros de seringa de PVDF de 0,45 μm , acidificado com 2% (v v⁻¹) de HNO_3 para evitar hidrólise de metal e estocado a -20 °C antes das análises.

3.5 Avaliação operacional e variáveis analíticas

Uma investigação minuciosa da configuração do sistema em fluxo incluindo a configuração da minicoluna (LBC ou SFC) e a interface on-line para o equipamento nas determinações por ICP OES junto com as variáveis físico-químicas (a quantidade de amostra (250 ou 500 mg), a vazão do fluxo dos fluidos digestivos (0,5-1,0 mL min^{-1}), o tipo de filtro (nylon ou PVDF), as dimensões dos poros (0,45 ou 5,0 μm), a temperatura de extração (ambiente ou 37°C), o volume dos fluidos

gástrico e gastrointestinal, relação sólido-líquido e o número de frações) são identificada nas seções seguintes. De modo a assegurar perfis de extração de alta resolução temporal para monitoramento on-line automático da bioacessibilidade do quimo de micronutrientes em linhaça.

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1 Configuração do sistema

Resultados preliminares obtidos com SFC na ausência da amostra de alimento (só o fluido gastrointestinal) demonstraram que vazamento e acúmulo de pressão ocorreram a vazão de fluxos tão baixas quanto $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ para filtros de nylon ou PVDF, independentemente do tamanho de poro ($0,45$ ou $5,0 \mu\text{m}$), o que resultou na parada da bomba de seringa que opera como acionador de líquido. Vale ressaltar que os fluidos digestivos do método de Versantvoort *et al.* (2005) são soluções complexas compostas de um amplo número de espécies orgânicas, eletrólitos e enzimas, que produzem dispersões coloidais.

A manipulação automática dos fluidos fisiológicos (em particular fluidos duodenais e bile) ao longo do sistema em fluxo causa o entupimento gradual dos tubos da configuração de fluxo e da membrana do extrator de SFC por material suspenso. De fato, prévios sistemas de extração de fluxo contínuo para determinação de contaminantes bioacessíveis orais empregaram meios fluídicos excessivamente simples (DUFAILY *et al.*, 2008; LEUFROY *et al.*, 2012; HORNER E BEAUCHEMIN, 2012; LAMSAL E BEAUCHEMIN, 2015), sem adição de enzimas insolúveis (ROSENDE *et al.*, 2014). O mesmo comportamento foi observado sempre que o filtro de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ foi usado como principal na configuração LBC.

Do contrário, não houve alteração na resistência do sistema à movimentação do fluxo com o uso do filtro de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$, na ausência da amostra de linhaça, para 40 mL de extratante GI trazida para o LBC a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. É importante notar que membranas de PVDF retém muito menos proteínas do que filtros de nylon e que a exploração deles para filtração em linha de fluidos corporais biomimético tem sido reportada anteriormente (HERRERA *et al.*, 2016). Infelizmente, depois de carregar 500 mg de amostra de alimento, apenas 20 mL de fluido GI poderia ser

tratado a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ sem arriscar a estabilidade do sistema em fluxo, por causa do bloqueio dos poros da membrana pelos digeridos GI.

No entanto, efeitos de entupimento desconsideráveis e problemas de contrapressão foram observados no curso da digestão GI dinâmica *in vitro* total para 40 mL de fluido GI usando membrana de PVDF de $5,0 \text{ }\mu\text{m}$ sem e com amostras alimentícias. Apesar do aumento do tamanho do poro do filtro, os extratos GI dinâmicos foram em todos os instantes límpidos, sem a ocorrência de partículas sólidas e matéria coloidal que, por sua vez, promoveu a análise direta on-line dos digeridos GI por ICP OES sem necessidade de tratamento adicional com extrato. Assim sendo, o sistema que corresponde à combinação de LBC e membrana de PVDF de $5,0 \text{ }\mu\text{m}$ foi selecionado para o restante do trabalho.

O comportamento diferencial de LBC contra SFC para os testes de bioacessibilidade oral on-line foi atribuído a sua própria configuração e dinâmica de fluxo. Embora o diâmetro nominal do filtro seja, em ambos os casos, de 47 mm, a área efetiva real da superfície é de $4,9 \text{ cm}^2$ para SFC contra $11,3 \text{ cm}^2$ para LBC. Além disso, a tampa superior acima da membrana do filtro de vidro SFC (SHIOWATANA *et al.*, 2011), é normalmente feita para conter apenas 8 orifícios de saída de $0,78 \text{ mm}^2$, enquanto o LBC polimérico, aqui utilizado, apresenta 18 aberturas de saídas retangulares com uma área total de 90 mm^2 para fluxo livre das digestões filtradas.

4.2 Investigação dos parâmetros experimentais

4.2.1 Investigação da relação sólido-líquido e método de agitação do ensaios de bioacessibilidade em batelada

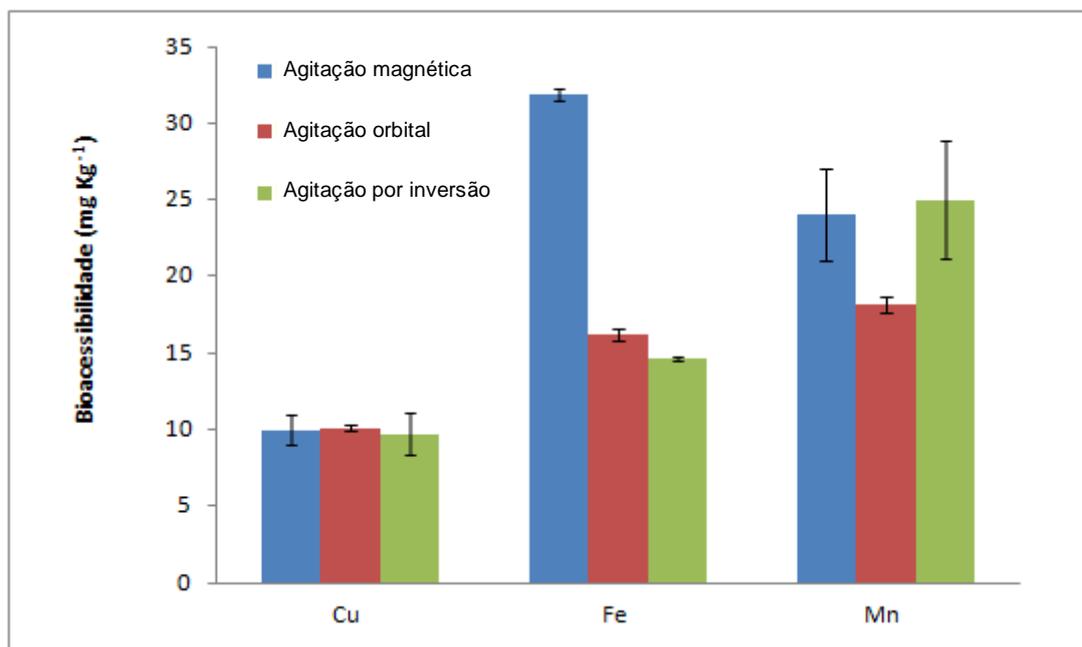
Como consequência da falta de harmonização e padronização das diferentes condições operacionais nos procedimentos de bioacessibilidade oral para espécies metálicas em materiais sólidos (NG *et al.*, 2015; INTAWONGSE E DEAN, 2006), estudos preliminares foram realizados para avaliar o efeito da bioacessibilidade oral sobre a relação líquido-sólido (L/S) em um modo de batelada. De fato, dois volumes de amostras contrastantes foram usados na literatura por autores (ex. $3,0 \text{ g}$ (SILVA *et al.*, 2013) e $0,5 \text{ g}$ (VERSANTVOORT *et al.*, 2005), seguindo o método de Versantvoort que proporcionou relação L/S de 12,6 e 76, respectivamente.

As bioacessibilidades GI dos três elementos foram <12% for L/S=12,6 contra as bioacessibilidades GI >20% for L/S=76, indicando que baixa relação L/S (<13) deve ser evitada para prevenir a saturação dos fluidos GI, portanto não servem para estimar a bioacessibilidade máxima de micronutrientes. Para esse fim, a massa da amostra 0,5 g foi fixada para no método estático para garantir a exaustiva extração dos micronutrientes sob condições GI fisiológicas relevantes. Na atual conjuntura, deve-se ressaltar que os testes anteriores de extração baseados fisiologicamente em batelada para sólidos ambientais empregavam apenas quantidades de amostra que variavam entre 0,3 g e 0,6 g (BARGE, 2011; ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012).

O método de agitação é outro parâmetro que deve ser definido operacionalmente, pois pode afetar notavelmente a bioacessibilidade dos nutrientes nos alimentos (JAMES *et al.*, 2018). Assim sendo, a extração gástrica de BGL baseada no método de Versantvoort foi realizada no modo em batelada recorrendo a uma variedade de abordagens de agitação (ex. agitação magnética, agitação por inversão e agitação orbital) a 55 rpm e 37 °C por 2 h. Como pode ser visto na Figura 14, a bioacessibilidade gástrica de Cu em BGL é independente do método de agitação da amostra. Para a bioacessibilidade gástrica de Mn, a agitação magnética e a rotação de ponta a ponta proporcionaram eficiência de extrações virtualmente idênticas.

De modo inverso, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas para a bioacessibilidade de Fe. Enquanto a agitação orbital e a rotação por inversão resultam em valores próximos da bioacessibilidade gástrica de Fe (<17 mg kg⁻¹), a agitação magnética, proporcionou bioacessibilidade superior, por exemplo, (31,9 ± 0,4 mg kg⁻¹). Considerando que a extração dinâmica aproveita o bombeamento contínuo de porções frescas de fluidos digestivos através da amostra sólida compactada com o conseqüente deslocamento do equilíbrio de extração para a fase líquida, promovendo assim uma maior capacidade de extração do metal (CAVE *et al.*, 2016), a agitação magnética, que proporcionou a maior bioacessibilidade do Fe, foi selecionada como um método de agitação de referência para obter informações sobre a capacidade de extração da fase gástrica máxima sob condições estáticas.

Figura 14. Comparação de diferentes métodos de agitação para avaliação da bioacessibilidade gástrica de Cu, Fe e Mn em linhaça dourada do Brasil (n=3). Barras de erro significam desvio padrão.



4.2.2 Investigação da relação sólido-líquido e ensaio de bioacessibilidade dinâmica on-line

Para comparar a bioacessibilidade gástrica dinâmica com a contrapartes em batelada, o efeito da relação L/S sob extração dinâmica de fluxo foi completamente investigado para 500 mg de amostra, aumentando o volume de composto de saliva + fase gástrica bombeado através da configuração de LBC carregada de linhaça dentro da faixa de 18 a 45 mL a 0,5 mL min⁻¹. Para BGL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas a um nível de significância de 0,05 para qualquer um dos micronutrientes, considerando os dois modos de extração (batelada versus dinâmica) para um volume de extração de 40 mL (Tabela 26). Isso também vale para maioria dos micronutrientes determinados nas amostras de linhaça marrom (BL) e amostras de linhaça dourada da Espanha (SGL).

Para tanto, um volume de 40 mL de saliva + composto de fluido gástrico, representando um L/S = 80, que está de acordo com os testes preliminares relatados acima, foi selecionado como a fase gástrica do sistema de extração dinâmica de fluxo para explorar a bioacessibilidade do quimo/GI de micronutrientes em sementes. A fim de manter o volume da fase gástrica e a fase duodenal + bile

(GI) na proporção de 1:1 conforme endossado por Versantvoort *et al.* (2005), o volume de suco duodenal e composto biliar foi ajustado para 40 mL (adicionado 4 mL de bicarbonato), que por sua vez resultou num volume final de fluido GI de aproximadamente 84 mL para explorar o quimo e a bioacessibilidade GI.

Entretanto, foi detectada uma queda significativa da vazão do fluxo para volumes GI acima de 60 mL, em que a quantidade de amostra, os volumes da solução gástrica e gastrointestinal e do bicarbonato foram reduzidos de um fator 2. Não obstante o fato de que a redução do tamanho da amostra de 500 para 250 mg poderia afetar a representatividade dos ensaios, valores de repetitividade da bioacessibilidade GI dos elementos estudados, dado como desvio padrão relativo, foram em todos os casos menor do que 9,2 %, independentemente da quantidade de amostra, demonstrando que resultados são confiáveis para extração dinâmica podem ser obtidos com 250 mg de amostra homogeneizada.

Tabela 26. Comparação das concentrações bioacessíveis gástricas de Fe, Cu e Mn obtidas pelo sistema de extração dinâmico baseado em fluxo e fisiológico contra o procedimento convencional de extração em batelada.

Amostras	Elementos	Bioacessibilidade gástrica (mg kg ⁻¹)			t _{exp} *
		Batelada (Agitação magnética)	Dinâmica (0,5 mL min ⁻¹)	Recuperação (%)	
SGL	Cu	11,6 ± 0,3	10,1 ± 0,4	87 ± 3	3.39
	Fe	28 ± 2	26 ± 2	93 ± 1	1.58
	Mn	16 ± 2	15 ± 1	94 ± 1	1.35
BL	Cu	12,3 ± 0,3	13 ± 1	108 ± 2	1.53
	Fe	27 ± 1	30 ± 4	111 ± 2	0.91
	Mn	15,5 ± 0,3	13 ± 1	84 ± 3	3.42
BGL	Cu	10 ± 1	9 ± 1	90 ± 2	0.99
	Fe	31,9 ± 0,4	32 ± 4	100 ± 1	0.07
	Mn	24 ± 3	25 ± 2	104 ± 1	0.54

Os resultados são expressos como a média de três repetições ± desvio padrão. * t_{crit}= 2.77 (d.f. =4)

4.2.3 Investigação da temperatura de extração e vazão de fluxo dos testes de bioacessibilidade dinâmica on-line

Foram estudados os efeitos da vazão de fluxo do fluido composto GI e da temperatura de extração na lixiviabilidade dinâmica dos nutrientes em BGL. Para este fim, três taxas do fluxo do extratante, por exemplo, 0,5, 1,0 e 1,5 mL min⁻¹ foram investigados. A maior vazão de fluxo foi descartada devido a efeitos ocasionais de contrapressão, mas os valores de bioacessibilidade foram estatisticamente idênticos ($\alpha = 0,05$) para 0,5 mL min⁻¹ e 1,0 mL min⁻¹. A taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ foi então escolhido para agilizar os ensaios automáticos. Quanto à temperatura de extração, temperatura ambiente, ou seja, 25 °C e temperatura fisiologicamente relevante, ou seja, 37 °C, para o sistema de coluna e fluidos corporais foram inicialmente avaliados usando uma vazão de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ para fluidos digestivos.

Entretanto, a capacidade de extração GI à temperatura ambiente não pôde ser investigada devido ao aumento da resistência do sistema à movimentação do fluxo. Vale ressaltar que a atividade e a solubilidade das enzimas são distintamente afetadas pela temperatura (OOMEN *et al.*, 2003), pelo que a desnaturação e a precipitação das proteínas podem ocorrer à temperatura ambiente. Portanto, a temperatura do banho de água foi fixada em 37 ± 1 °C durante todo o tempo.

4.3 Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do método de microextração de fluxo contínuo automático foi avaliado empregando precisão intermediária, faixa dinâmica, exatidão e limite de detecção como parâmetros analíticos. A faixa dinâmica linear foi avaliada em cinco níveis de concentração e abrangida de 20 a 200 µL⁻¹ para Cu e Mn e entre 50 a 500 µL⁻¹ para Fe usando curvas de calibração externa com simulação da matriz para evitar a dependência do GI na eficiência de nebulização das espécies. A solução simulada sem linhaça foi obtida por filtração através de membrana de PVDF de 5 µm do composto do fluido GI (saliva + estômago + duodeno + fluidos biliares + bicarbonato).

A solução com simulação da matriz foi injetada on-line diretamente no nebulizador do equipamento por meio de uma das portas (número 4) da válvula de seleção do sistema de fluxo hifenizado. A acidificação em linha dos extratos GI é considerada inviável como um resultado da precipitação das proteínas GI filtradas que, por sua vez, é responsável pelo uso de água mili-Q como transportadora do equipamento em vez de HNO₃ diluído.

A relação linear da área do pico (I) contra a concentração do analito (X em µg L⁻¹), por exemplo, $I = 620X + 1081$; ($p = 0,99$), $I = 383X + 1216$; ($p = 0,99$) e $I = 3451X + 5324$; ($p = 0,95$) para Cu, Mn e Fe, respectivamente, ao longo do intervalo 20-200 µg L⁻¹ para Cu e Mn e 50-500 µg L⁻¹ para Fe, usando a calibração de matriz combinada, foi demonstrada a 95% de nível de confiança. Os valores de p do teste de falta de ajuste dos modelos de regressão foram em todas as instâncias $\geq 0,05$.

Os valores de LOD dos micronutrientes nos extratos GI, com base no critério de $3S_{\text{branco}}$ (IUPAC, 1998) de dez réplicas da solução do branco do fluido GI, e refere-se ao volume discreto de 300 µL do extrato analisado em cada fração, foram 0,011 µg g⁻¹, 0,057 µg g⁻¹ e 0,008 µg g⁻¹ para Cu, Mn e Fe, respectivamente. Os valores dos desvios padrão relativos das concentrações dinâmicas de micronutrientes bioacessíveis na fase GI avaliado a partir de réplicas interdias de BGL, SGL e BL ($n = 3$), variou de 9 a 39% para Cu, 16 a 26% para Fe e 8 a 24% para Mn. O sistema de fluxo dinâmico proposto fornece precisão intermediária semelhante para a bioacessibilidade GI de Mn e melhor RSD para Fe em comparação com um protocolo GI baseado em UBM para soja transgênica com RSDs até 20% para Mn e dentro da faixa de 22-40% para Fe (HERRERA-AGUDELA, MIRÓ E ARRUDA, 2017).

A confiabilidade do método de microextração por fluxo para a determinação da bioacessibilidade no quimo de Fe, Cu e Mn em linhaça foi verificada usando-se o balanço de massa para BGL, BL e SGL ($n = 3$). A média da soma das concentrações bioacessíveis GI mais a fração residual (não extraível) (eixo X) para os elementos globais foram comparadas estatisticamente contra a concentração total de metal obtida por digestão ácida em forno de micro-ondas (eixo Y) usando um método de regressão de mínimos quadrados (MILLER E MILLER, 2005). A análise de regressão linear foi ajustada para $Y = (1,1 \pm 0,2)X - (2,2 \pm 7,4)$ ($R^2 = 0,97$).

A correlação entre os valores foi avaliada por meio de testes estatísticos de hipóteses para comparação da inclinação e intercepção com referência ao cenário ideal de inclinação de 1 e intercepção zero. As estatísticas t do intercepto e da inclinação foram calculadas, respectivamente, como segue: $t = (a - 0)/s_a$ e $t = (b - 1)/s_b$ onde a e b representam os valores de intercepção e inclinação, respectivamente, e s_a e s_b para o desvio padrão da intercepção e inclinação, respectivamente.

Como a estatística t da inclinação (0,46) e intercepção (0,34) estavam abaixo do valor de t crítico (2,36) para 7 graus de liberdade, não foram encontradas diferenças significativas ao nível de significância de 0,05 entre a soma das frações bioacessíveis e das frações residuais e as concentrações totais dos elementos obtidas após a decomposição assistida por micro-ondas para os elementos. A confiabilidade dos resultados de bioacessibilidade GI como determinado pelo método dinâmico automático foi assim demonstrada, o que torna desnecessário o uso do método de adição de analito para a análise dos extratos GI e do quimo. De fato, recuperações relativas (validação do balanço de massa) para os três elementos, como mostrado na Tabela 27, medido de 84 a 115%, 79-121% e 87-115%, para SGL, BL e BGL, respectivamente.

Tabela 27. Concentrações bioacessíveis do quimo/GI de Mn, Cu e Fe em amostras de linhaça e validação do balanço de massa do sistema de extração fisiológica on-line.

Amostra	Elemento	Bioacessibilidade GI (mg kg ⁻¹)	Bioacessibilidade quimo (mg kg ⁻¹)	Resíduo (mg kg ⁻¹) ^a	Total (mg kg ⁻¹) ^b	Digestão total por micro-ondas (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
SGL	Cu	2,0 ± 0,8 (21%)	2,0 ± 0,8 (21%)	6 ± 1	8 ± 1	9,5 ± 0,3	84 ± 11
	Fe	3,0 ± 0,5 (6%)	3,0 ± 0,5 (6%)	51 ± 7	54 ± 7	48 ± 2	115 ± 15
	Mn	15 ± 1 (56%)	5,8 ± 0,5 (21%)	10 ± 1	25,2 ± 0,3	27 ± 1	95 ± 1
BL	Cu	3 ± 1 (21%)	2,5 ± 1,0 (17%)	9 ± 3	11 ± 2	14,5 ± 0,1	79 ± 15
	Fe	3,0 ± 0,8 (7%)	3,0 ± 0,8 (7%)	47 ± 10	50 ± 10	44 ± 6	121 ± 24
	Mn	10 ± 1 (54%)	4 ± 1 (22%)	9 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	103 ± 7
BGL	Cu	11,1 ± 0,9 (74%)	4,5 ± 0,5 (30%)	6 ± 2	17 ± 1	15 ± 1	115 ± 6
	Fe	4,0 ± 0,7 (7%)	4,0 ± 0,7 (7%)	55 ± 16	59 ± 16	58 ± 4	101 ± 28
	Mn	15 ± 4 (45%)	7 ± 3 (21%)	14 ± 4	28,6 ± 0,3	33,1 ± 0,8	86,6 ± 0,8

Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (n=3).

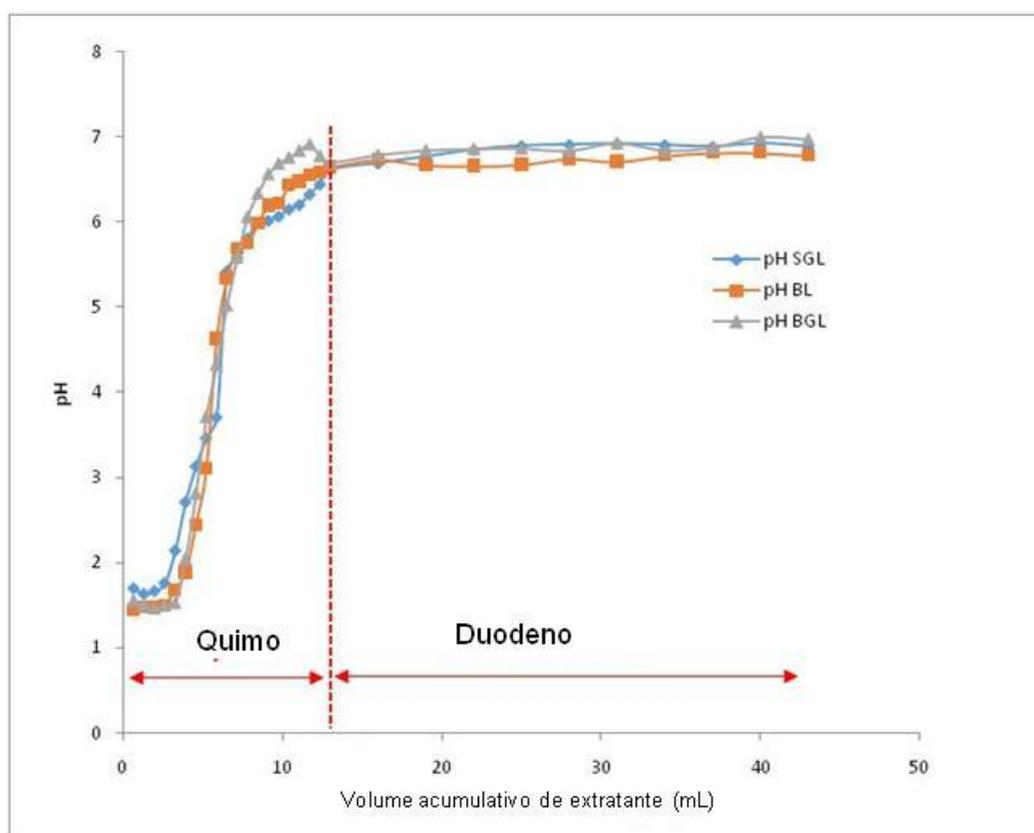
Entre parênteses, a porcentagem de bioacessibilidade do quimo é referida à quantidade total de micronutrientes.

^aA concentração de micronutriente não bioacessível é determinada por digestão ácida por micro-ondas do resíduo de linhaça filtrada.

^bSoma das porções bioacessíveis GI e concentração residual.

Neste trabalho, as informações sobre a bioacessibilidade *in vitro* de Cu, Fe e Mn no quimo foram obtidas pela primeira vez neste trabalho, usando o método de extração biomimético automático proposto com alta resolução temporal. Isto foi possível bombeando o extratante composto GI através do sistema de coluna de extração contendo o alimento envolvido pelo fluido gástrico (ex. quimo) para imitar o gradiente de pH através do trato GI (Figura 15). De fato, o quimo com pH 2 foi expelido pelo estômago no duodeno, em que, ao misturar com o fluido intestinal, o pH aumentou até 6,8-7,0 (GROPPER E SMITH, 2013). Procedimentos de bioacessibilidade oral dinâmica previamente estudados com detecção por espectrometria atômica on-line (DUFAILY *et al.*, 2006; LEUFROY *et al.*, 2012a; LEUFROY *et al.*, 2012b) não simulam corretamente condições do quimo porque os fluidos gástrico e gastrointestinal são usados discretamente, como é o caso dos procedimentos de extração sequencial (BACON E DAVIDSON, 2008).

Figura 15. Ilustração do gradiente de pH através do trato gastrointestinal simulado de digestões *in vitro* de linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL) obtidas por testes de extração dinâmicos baseados em fluxo.



Procedimentos de extração baseados fisiologicamente em batelada (ex. UBM) não permitiria a avaliação da bioacessibilidade do quimo por causa da mistura completa do extrato gástrico carregado de alimentos com soluções duodenais e biliares antes de iniciar a digestão GI *in vitro*. No sistema proposto neste trabalho, as análises do tempo de curso das porções bioacessíveis foram facilmente realizadas utilizando a integração da área de pico dos sinais transientes do espectrômetro referente aos extratos GI em linha, seguida pela representação gráfica das concentrações bioacessíveis GI contra o volume GI cumulativo, apresentado na Figura 16.

Tendências semelhantes foram observadas nos padrões de lixiviação, independentemente da variedade de linhaça. A extração de micronutrientes ocorreu dentro da fase gástrica, 54-68% da concentração total de Fe (Tabela 26) e a bioacessibilidade GI caiu significativamente para a linha de base dentro das primeiras 5 ou 6 frações (0,65 mL cada) do fluido composto GI (Figura 16). Considerando que o volume morto da coluna foi estimado para ser aproximadamente 2,8 mL, a bioacessibilidade GI global do Fe variou de 6 a 7% (Tabela 27) justamente porque é medido no quimo em condições extremamente ácidas, e já em pH próximo do neutro é atribuído à geração de oxihidróxidos de ferro de baixa solubilidade.

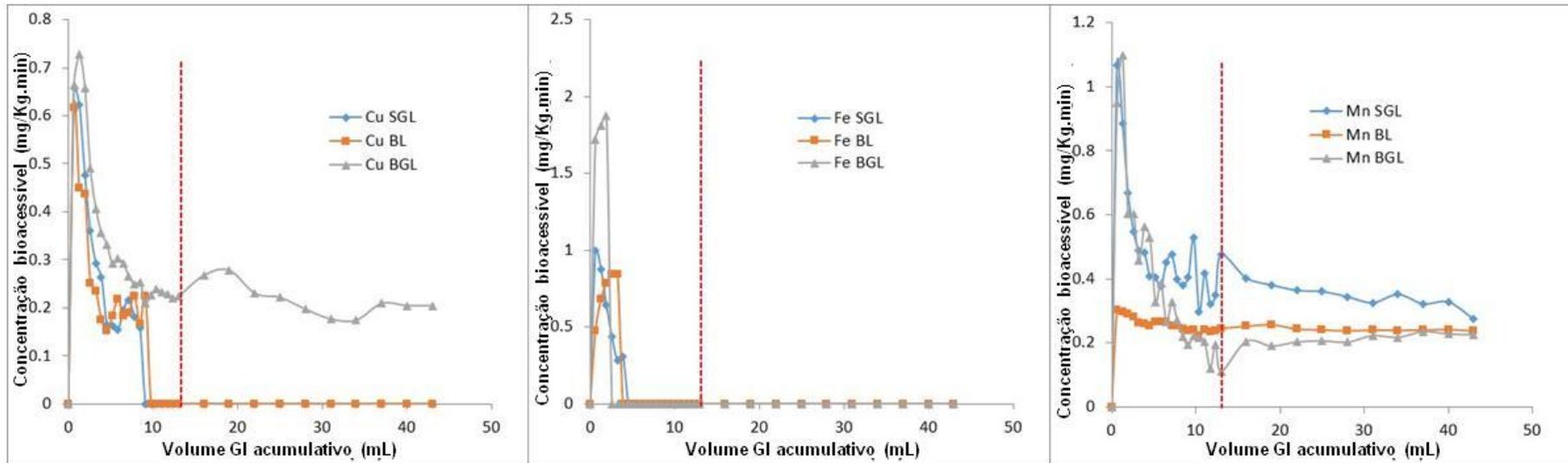
Em contraste com a tendência dos resultados obtidos para Fe, a soma das frações referente à bioacessibilidade de Mn apresentou uma diminuição de 68% para 54% e 71% para 45% para BL e BGL, respectivamente, no trânsito do estômago para as condições de extração duodenal (Figura 16). Já para SGL permaneceu invariável (56%) (Tabelas 25 e 26). De fato, a formação de oxihidróxidos parece ser parcialmente compensada pela capacidade de lixiviação do elemento sob condições GI. Resultados experimentais na Figura 16, demonstraram que a capacidade de lixiviação de Mn é constante ao longo do tempo após atingir as condições de pH intestinal (> 12 mL de extratante GI). Apesar das diferenças na variedade e origem da linhaça, extratogramas similares foram encontrados para Mn.

Em relação aos resultados obtidos para concentração de Cu, verificou-se que apenas os perfis de lixiviação bioacessíveis exibem diferenças apreciáveis entre as amostras. Enquanto este elemento químico foi apenas lixiviado no decurso do

trânsito do quimo para SGL e BL com bioacessibilidade de GI/quimo de 21 e 18%, respectivamente, o comportamento em BGL foi semelhante à concentração do Mn, com uma queda de bioacessibilidade acentuada durante o trânsito do quimo por lixiviação constante na fase duodenal. Por sua vez, verificou-se um aumento de bioacessibilidade GI de 2,5 vezes em comparação com o da fase do quimo.

Assim, neste trabalho, os micronutrientes mais e menos bioacessíveis em linhaça obtidos sob fluxo dinâmico através de condições de extração gastrointestinal foram Mn e Fe, respectivamente, o que está de acordo com os testes anteriores de extração biomimética em sementes de girassol de abóbora (Moreda-Piñeiro *et al.* 2016).

Figura 16. Ilustração de extratos de bioacessibilidade GI de Cu, Fe e Mn em linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL) para avaliação da cinética de lixiviação. A linha vertical pontilhada indica a separação entre as fases quimo e duodenal.



4.4 Comparação do conjunto de nutrientes bioacessíveis do quimo/GI contra extração em batelada

Para avaliar a confiabilidade dos resultados analíticos fornecido pelo método de extração de Versantvoort para avaliação da bioacessibilidade de porções de micronutrientes em gêneros alimentícios, três amostras de linhaça (BGL, BL, SGL) foram analisadas, usando o protocolo em batelada convencional ou o método de microextração baseada em LBC de fluxo contínuo proposto (ver ítems 3.3 e 3.4 da parte experimental). Os métodos foram validados pela avaliação do balanço de massa como aplicado para micronutrientes determinados, conforme apresentado na Tabela 28.

Como pode ser visto na Figura 17, os dois métodos forneceram resultados para bioacessibilidade contrastantes como informação da dissimilaridade nos princípios fundamentais subjacentes de ambas as abordagens, como observado anteriormente em procedimentos de extração dinâmica de elementos traço de incineração de resíduos sólidos (ROSENDE, MIRÓ E CERDA, 2008) e sólidos contaminados (SCHREIBER *et al.*, 2005). Para os resultados obtidos usando o método dinâmico proposto, observou-se um aumento da bioacessibilidade de Mn para a maioria das amostras de linhaça em comparação com o método em batelada, o que está de acordo com o estudo de CAVE *et al.* (2016), no qual foi avaliado a bioacessibilidade gástrica do Pb de um solo contaminado.

A extração dinâmica é baseada na renovação contínua do extratante usando fluidos orais, com o deslocamento subsequente dos equilíbrios da extração, o que, por sua vez, dá origem a uma percepção significativa da quantidade máxima de micronutrientes de bioacessibilidade. Do contrário, as concentrações elementares bioacessíveis medidas por protocolos em batelada (descontínuos) são limitadas pela constante de solubilidade do produto de sais no meio GI (CAVE *et al.*, 2016).

Diferentemente dos resultados obtidos para concentração de Mn, o método de extração em batelada proporcionou maiores percentuais da bioacessibilidade para Fe, com aumento de 2,6, 3,1, e 3,3 vezes para o SGL, BL, BGL, respectivamente, em comparação ao método dinâmico. O mesmo comportamento foi observado para a bioacessibilidade GI de Cu em BGL e BL, mas neste caso, o

aumento foi de 4,6 e 1,4 vezes, respectivamente. Vale ressaltar que, a presença de ácido fítico na linhaça em um nível de concentração de cerca de 1% (KRAUSE, SCHULTZ, DUDEK, 2002), pode levar à formação, preferencialmente, de complexos hidrossolúveis de fitato monoférrico (NIELSEN, TETENS E MEYER, 2013) e fitato de Cu (GARCÍA *et al.*, 1997) no trato gastrointestinal (pH=6,8).

Neste trabalho, o método em batelada provavelmente superestimou a bioacessibilidade GI e a potencial biodisponibilidade de Cu e Fe, o que pode ser creditado aos maiores tempos de extração do método em batelada, quando comparado com o método dinâmico, que podem promover reações concorrentes de quelação de Cu e Fe com fitato contra reações hidrolíticas sob condições GI. Apesar do fato de que os quelatos metálicos são conhecidos por dificultar a biodisponibilidade dos nutrientes.

Tabela 28. Concentração das frações bioacessíveis GI e validação do balanço de massa de Cu, Fe e Mn em amostras de linhaça usando o método de Versantvoot (2005) em batelada.

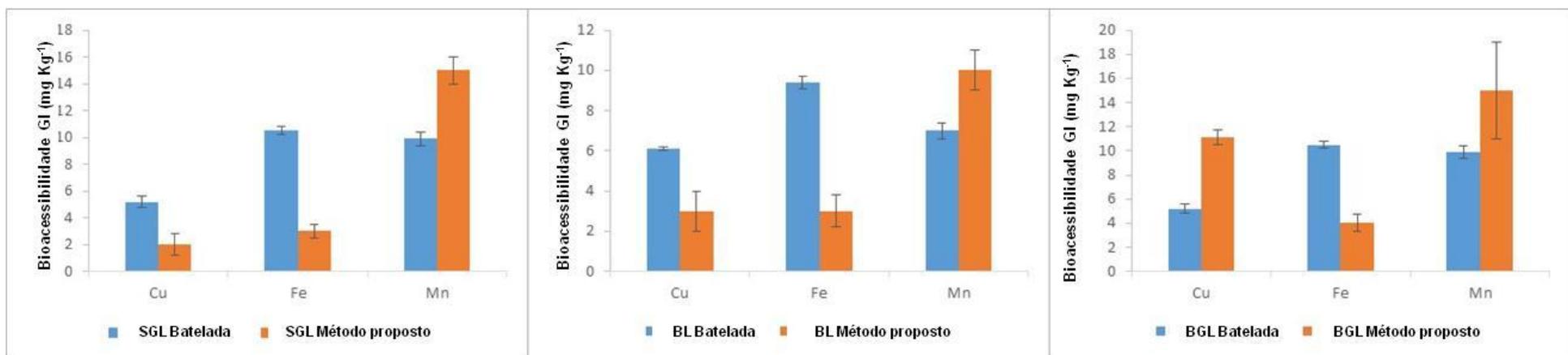
Amostra	Elemento	Bioacessibilidade GI (mg Kg ⁻¹)	Resíduo (mg Kg ⁻¹) ^a	Total (mg Kg ⁻¹) ^b	Digestão total por micro-ondas (mg Kg ⁻¹)	Recuperação (%)
SGL	Cu	5,2 ± 0,4 (58%)	5,1 ± 0,2	10,5 ± 0,1	9,5 ± 0,3	110 ± 1
	Fe	10,5 ± 0,3 (22%)	34,0 ± 0,5	45 ± 6	48 ± 2	93 ± 12
	Mn	9,9 ± 0,5 (37%)	11 ± 1	21 ± 1	27 ± 1	80 ± 4
BL	Cu	6,1 ± 0,1 (42%)	9,7 ± 0,8	16 ± 1	14,5 ± 0,1	112 ± 6
	Fe	9,4 ± 0,3 (52%)	21,4 ± 1	31 ± 3	44 ± 6	70 ± 3
	Mn	7,0 ± 0,4 (37%)	7,4 ± 0,5	14,4 ± 0,4	19 ± 1	76 ± 2
BGL	Cu	9,2 ± 0,7 (61%)	5,7 ± 0,5	14,9 ± 0,4	15 ± 1	99 ± 3
	Fe	9,9 ± 0,6 (17%)	52 ± 2	62 ± 2	58 ± 4	107 ± 4
	Mn	8,0 ± 0,4 (24%)	29 ± 8	36 ± 8	33,1 ± 0,8	110 ± 25

Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (n=3).

Entre parênteses, a porcentagem de bioacessibilidade GI é referida à quantidade total de micronutriente.

^aA concentração de micronutriente não bioacessível é determinada por digestão ácida por micro-ondas do resíduo de linhaça filtrada. ^bSoma das porções bioacessíveis GI e concentração residual

Figura 17. Comparação de porções bioacessíveis GI de Mn, Cu e Fe como obtidos pelo método de fluxo contínuo dinâmico em comparação com o método convencional de Versantvoort *et al.* (2005) em batelada para linhaça dourada Espanha (SGL), linhaça marrom (BL) e linhaça dourada Brasil (BGL). Barras de erro indicam desvio padrão.



5. Considerações finais

Para melhor conhecimento, esse é o primeiro trabalho reportando um método de extração GI dinâmico totalmente automatizado realizado em modo aditivo como recomendado pelos testes de extração baseado fisiologicamente (BARGE, 2011; Versantvoort *et al.*, 2005; Cave *et al.*, 2010). Neste trabalho, um fluxo dinâmico através do sistema de microextração com alta resolução temporal foi proposto pela primeira vez para mimetizar o trânsito do quimo do ambiente gástrico para o compartimento do duodeno.

A determinação das concentrações bioacessíveis de Cu, Fe e Mn em linhaça no trato gastrointestinal por ICP OES foi selecionada para mostrar a aplicabilidade do sistema proposto. Usando o sistema em fluxo proposto, o método de estado alimentado de Versantvoort foi totalmente automatizado em um formato dinâmico. Em resumo, o extrato gástrico foi misturado em linha com fluidos duodenais + biliares frescos; o pH do quimo foi monitorado *in situ* ao longo do método cinético; e as frações bioacessíveis GI foram continuamente analisadas por hifenização inteligente do sistema de extração por fluxo com espectrômetro.

Os resultados experimentais levam à conclusão de que o método de Versantvoort realizado em batelada superestima o potencial de biodisponibilidade de Cu e Fe comparado com o método dinâmico, porque os maiores tempos de extração usados no primeiro, desencadeiam a formação de complexos Cu e Fe com fitato solúveis em água ao invés de oxihidróxidos não solúveis em condições GI. Apesar do fato de que os complexos metálicos não estão biodisponíveis, eles são considerados bioacessíveis quando se utiliza o protocolo em batelada.

6. Conclusões

A partir do estudo proposto, foi possível verificar que os diferentes métodos de digestão *in vitro* disponíveis na literatura aplicados a uma mesma amostra apresentam diferenças significativas, principalmente, quando se compara métodos extremamente simples com métodos completos, os quais abordam todos os compartimentos, desde a boca ao duodeno, na fase intestinal, que, em métodos como o SBET, não são levados em consideração.

Adicionalmente, foi possível propor um método de digestão assistida por radiação de micro-ondas usando um procedimento com ácido nítrico diluído para determinação da concentração total dos elementos nas amostras de linhaça e gergelim empregando ICP OES, por meio de planejamento experimental.

Os valores de bioacessibilidade, quando aplicados usando métodos como SBET, são elevados quando comparado com métodos como UBM, desta forma pode-se concluir que os procedimentos que usam apenas o compartimento gástrico como simulação empregando somente glicina e HCl, superestimam os valores de bioacessibilidade dos elementos em amostras de linhaça e gergelim, devido ao baixo pH do meio. Em relação ao método de Versantvoort em batelada aplicado, foi possível verificar que as condições otimizadas não foram adequadas para a quantidade de amostra utilizada devido à relação sólido-líquido não ter sido levada em consideração.

Quando se trata da avaliação da contribuição do consumo de linhaça e gergelim para ingestão diária recomendada, o estudo permitiu aferir que a contribuição foi maior quando o teor total é utilizado para o cálculo e menor quando o teor bioacessível foi calculado, o que demonstra que o teor total não foi suficiente para avaliar a contribuição do consumo de linhaça e gergelim.

Foi possível, também, desenvolver um sistema dinâmico de fluxo automático pela primeira vez para explorar o trânsito do quimo do compartimento gástrico para os compartimentos duodenais com base no método de estado alimentado de Versantvoort para elucidação on-line de frações bioacessíveis de Cu, Fe e Mn bioacessível em linhaça e gergelim com alta resolução temporal.

Notou-se que o método de agitação que melhor estima o valor máximo de bioacessibilidade foi a agitação magnética, a coluna de extração que não apresenta problema de entupimento foi a de grande diâmetro, quando utilizada com uma menor massa de amostra, filtro de membrana de PVDF, que retém menos as proteínas e de maior porosidade. Além do mais, à temperatura ambiente pode levar a desnaturação das enzimas o que inviabiliza o uso do sistema sem ajuste de temperatura e, quando comparado ao método de digestão *in vitro*, em batelada e em fluxo observou-se que alguns conceitos inerentes à bioacessibilidade são desprezados quando se utiliza os métodos em batelada. Concluindo-se, dessa forma, que a melhor opção para os métodos de bioacessibilidade são os de sistema em fluxo. Todo o procedimento foi validado utilizando o balanço de massa.

Estudos complementares podem ser realizados para expandir o escopo do sistema de fluxo dinâmico automático para avaliação do quimo e da bioacessibilidade de contaminantes inorgânicos em matrizes alimentícias com detecção por ICP OES e de compostos bioativos e contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias com detecção por LC-MS. A partir deste estudo, serão obtidas, por exemplo, informações a respeito dos benefícios fisiológicos dos antioxidantes naturais presentes nos alimentos e também dos riscos associados aos contaminantes inorgânicos e orgânicos.

7. Referências

Lakshmi, A. J., Kaul, P., Nutritional potential, bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) sedes, *LWT - Food Sci. Techn.* 44 (2011) 1821-1826

Khanam, A., Platel, K., Bioaccessibility of selenium, selenomethionine and selenocysteine from foods and influence of heat processing on the same, *Food Chem.* 194 (2016) 1293–1299.

Leufroy, A., Noël, L., Beauchemin, D., Guérin, T., Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2849-2859.

Leufroy, A., Noël, L., Beauchemin, D., Guérin, T., Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood, *Food Chem.* 135 (2012) 623-633.

Nielsen, A. V. F., Tetens, I., Meyer, A. S., Potential of Phytase-Mediated Iron Release from Cereal-Based Foods: A Quantitative View, *Nutrients* 5 (2013) 3074-3098.

Mohdaly, A.A.A, I. Smetanska, M.F. Ramadanc, M.A. Sarhanb, A. Mahmoud, Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils, *Ind. Crop. Prod.* 34 (2011) 952–959.

Marques, A.C., Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

Silva de Lima, A.C., Soares, D.J., Ribeiro da Silva, L.M., Wilane de Figueiredo, R., P.H. Machado de Sousa, E. de Abreu Menezes, In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple

fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion, *Food Chem.* 161 (2014) 142-147.

Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., Wijnen, J.H.V., Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3326–3334.

Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., Sips, A.J.A.M., Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminant, *Arch. Environ. Con. Tox.* 44 (2003) 281–287.

Tognon, A.L., Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Couto, A.N., Wichmann, F.M.A., Efeitos da farinha da linhaça no perfil lipídico e antropométrico de mulheres, *Alim. Nutr.* 22 (2011) 601–608.

Sandberg, A.S., Bioavailability of minerals in legumes, *Brit. J. Nutr.* 88 (2002) 281–285.

Afonso, C.; Costa, S.; Cardoso, C.; Oliveira, R.; Lourenço, H.M.; Viula, A.; Batista, I.; Coelho, I.; Nunes, M.L. Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus spp.*) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. *Environmental Research*, 143, (2015)130-137.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Disposição sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. RDC, nº166, de 24 de julho de 2017.

Arpadjan, S.; Momchilova, S.; Venelinov, T.; Blagoeva, E.; Nikolova, M. Bioaccessibility of Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn in hazelnut and walnut kernels investigated by an enzymolysis approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2013) 6086-6091.

Kafaoglu, B., Fisher, A., Hill, S., Kara, D., Determination and evaluation of elemental bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method, *J. Food Compos. Anal.* 45 (2016) 58–65.

Laird, B.D., Chan, H. M., Bioaccessibility of metals in fish, shellfish, wild game, and seaweed harvested in British Columbia, Canada, *Food Chem. Toxicol.* 58 (2013) 381-387.

BARGE - INERIS, UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices, (2011) 1–10. https://www.bgs.ac.uk/barge/docs/BARGE_UBM_DEC_2010.pdf.

Bosso, S. T.; Enzweiler, J. Ensaios para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. *Química Nova*, 31, (2008), p. 394-400.

Brazil, 2005. ANVISA – Brazilian Agency for Sanitary Surveillance, Resolution # 269/2005. Technical Regulation on recommended daily ingestion of protein, vitamins and minerals.

Broadway, A.; Cave, M.R.; Wragg, J.; Fordyce, F.M.; Bewley, R.J.F.; Graham, M.C. Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. *Science of the total Environment*, 409, (2010) 267-277.

Brody, T. *Nutritional Biochemistry*, Second Edition, 693-878, 1999.

Katare, C., Saxena, S., Agrawal, S., Prasad, G., Flax Seed: A Potential Medicinal Food, *J. Nutr. Food Sci.* 2 (2012) 1-8.

Benevides, C. M. J., Souza, M.V., Souza, R.D.B., Lopes, M.V., Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional* 18 (2011) 67-79.

Patinha, C., Durães, N., Sousa, P., Dias, A. C., Reis, A. P., Noack, Y., Ferreira da Silva, E., Assessment of the influence of traffic-related particles in urban dust using sequential selective extraction and oral bioaccessibility tests, *Environ. Geochem. Health* 37 (2015) 707-724.

Collins, C.D., Craggs, M., Garcia-Alcega, S., Kademoglou, K., Lowe, Towards, S., Novaes, C.G., Ferreira, S.L.C., Neto, J.H.S., de Santana, F.A., Portugal, L.A., Goicoechea, H.C. A multiple response function for optimization of analytical strategies involving multi-elemental determination, *Curr. Anal. Chem.* 12 (2016) 94–101.

Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Van De Kamp, E., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 31-40.

CEM Applications Note: Acid digestion, Food/Plant/Animal Tissue: Soybean meal, (n.d.). <http://www.cem.com/downloads412.html>.

CHEDL – Chemical Education Digital Library. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/blog/?s=tabela>. Acesso em 7 de agosto de 2016.

Costa, S.; Afonso, C.; Cardoso, C.; Batista, I.; Chaveiro, N.; Nunes, M.L.; Bandarra, N.M. Fatty Acids, Mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an *in vitro* model: Effect of culinary treatment. *Food Chemistry*, 185, (2015)268-276.

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

Crews, H.M.; Burrell, J.A.; Mcweeny, D.J. Trace element solubility from food following enzymolysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 180, (1985) 0221-226.

Bolaños, D., Marchevsky, E. J., Camiña, J.M., Elemental analysis of amaranth, chia, sesame, linen, and quinoa seeds by ICP-OES: assessment of classification by chemometrics, *Food Anal. Method.* 9 (2016), 477–484.

D.J. Cocovi-Solberg, M. Miró, CocoSoft: Educational software for automation in the analytical chemistry laboratory, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6227-6233.

Dean, J.R. Bioavailability, bioaccessibility and mobility of environmental contaminants. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

Dundar, M.S.; Haswell, S.J. Use of a model gut system to study the effects of dietary fibre and multivitamins on the speciation of copper, zinc and iron. *Analyst*, 120, (1995) 2085-2088.

Nascimento da Silva, E. Do, Leme, A.B.P., Cidade, M., Cadore, S., Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods, *Talanta* 117 (2013) 184-188.

Silva, E.N., Heerdt, M.G., Cidade, C.T., Pereira, N.H., Cadore, S., Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe e Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.*, 119 (2015) 152–158.

Moraes, F.P., Colla, L.M., Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde, *Rev. Eletr. Farm*,3, (2006) 109–122.

Fennema, O. R; Parkin, K.; Damodaran, S. *Food Chemistry*. 4^a ed. Boca Raton: RC Press, 2008.

Funes-Collado, V.; Rubio, R.; López-Sánchez, J.F. Does boiling affect the bioaccessibility of selenium from cabbage?. *Food Chemistry*, 105, (2015) 304-309, 2015.

G. Schoeters, The REACH perspective: toward a new concept of toxicity testing., *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 13 (2010) 232-41. doi:10.1080/10937404.2010.483938.

Gao, S.; Wang, W.X. Oral bioaccessibility of toxic metals in contaminated oysters and relationships with metal internal sequestration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, (2014) 261-268.

He, M.; Wang, W.X.. Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs. *Food Chemistry*, 55,(2013) 627-636.

Hedrén, E.; Diaz, V.; Svanberg, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, (2002) 425-430.

Herrera, M.A.; Rosende, M.; Arruda, M.A.Z.; Miró, M. On-line coupling of physiologically relevant bioaccessibility testing to inductively coupled plasma spectrometry: Proof of concept for fast assessment of gastrointestinal bioaccessibility of micronutrients from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, doi: 10.1016/j.aca.2016.07.030.

http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_269_2005.pdf/36ef25bc-80d4-465a-ac85-340587a7b850. Accessed 14 November 2016

Intawongse, M.; Dean, J.R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, (2006) 876-886.

Intawongse, M.; Dean, J.R. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution*, 152, (2008) 60-72.

International Organization for Standardization (ISO), ISO 5725-1 (1998) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions. ISO, Geneva.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules-1997, 3rd ed., Blackwell, Oxford 1998.

Buanuam, J., Tiptanasup, K., Shiowatana, J., Miró, M., Hansen, E.H., Development of a simple extraction cell with bi-directional continuous flow coupled on-line to ICP-MS for assessment of elemental associations in solid samples, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 1248-1254.

Buanuam, J., Wennrich, R., Study of leachability and fractional alteration of arsenic and co-existing elements in stabilized contaminated sludge using a flow-through extraction system, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 1672-1677.

Ng, J. C., Juhasz, A., Smith, E., Naidu, R., Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 8802-8825.

Moreda-Piñero, J., Herbello-Hermelo, P., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñero, A., Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds, *Food Chem.* 205 (2016) 146-154.

Miller J. N. and Miller J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Ltd., Essex, 5th edn (2005) ch. 5, pp. 115-118.

Shiowatana, J., Tantidanai, N., Nookabkaew, S., Nacapricha, D., A flow system for the determination of metal speciation in soil by sequential extraction, *Environ. Int.* 26 (2001) 381-387.

Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., An interlaboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 4026–4030.

Quintana, J.B., Rosende, M., Montes, R., Rodríguez-Álvarez, T., Rodil, R., Cela, R., Miró, M., In-vitro estimation of bioaccessibility of chlorinated organophosphate flame retardants in indoor dust by fasting and fed physiologically relevant extraction tests, *Sci. Total Environ.* 580 (2017) 540-549.

Ng, J.C. Juhasz, A., Smith, E., Naidu, R., Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids, *Environ. Sci. Poll. Res.* 22 (2015), 8802-8825.

Kim, J.H., Seo, W.D., Lee, S.K., Lee, Y.B., Park, C.H., Ryuf, H.W., Lee, J.H., Comparative assessment of compositional components, antioxidant effects, and lignin extractions from Korean white and black sesame (*Sesamum indicum L.*) seeds for different crop years, *J. Funct. Food* 7 (2014) 495–505.

Krause, J.P., Schultz, M., Dudek, S., Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*), *J. Sci. Food Agric.* 82 (2002) 970-976.

Bacon, J.R., Davidson, C.M., Is there a future for sequential chemical extraction?, *Analyst* 133 (2008) 25-46.

James, K. , Peters, R.E., Cave, M.R., Wickstrom, M., Siciliano, S.D., In vitro prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon bioavailability of 14 different incidentally ingested soils in juvenile swine, *Sci. Total Environ.* In press, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.244>

Kafaoglu, B.; Fisher, A.; Hill, S.; Kara, D. Determination and evaluation of elemental bioaccessibility in some nuts and seeds by *in-vitro* gastro-intestinal method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, (2016) 58-65.

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

Kosu, H.; Nakata, Y.; Nakajima, M.; Neves, M.A.; Uemura, K.; Sato, S. Development of a human gastric digestion simulator equipped with peristalsis function for the direct observation and analysis of the food digestion process. *Food Science and Technology Research*, 20 (2014) 225-233.

Laird, B.D.; Chan, H.M. Bioaccessibility of metals in fish , sellfish, wild game, and seaweed harvested in British Columbia, Canada. *Journal and Chemical Toxicology*. 58, 381-387, 2013.

Laird, B.D.; Shade, C.D.; Gantner, N.; Chan, H.M.; Siciliano, S.D. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an *in vitro* gastrointestinal model independent on mercury concentration. *Science Total Environmental*. 407 (2009) 6003-6008.

Lamsal, R.P.; Beauchemin, D. Estimation of the bio-accessible fraction of Cr, As, Cd and Pb in locally available bread using on-line continuous leaching method coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 867, (2015) 9-17.

Laparra, J.M; Vélez, D.; Montoro, R.; Barberá, R.; Farré, R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by na *in vitro* digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003) 6080-6085.

Leal, F.; Catarino, R.; Pimenta, A.; Souto, R. Importância da especiação de metais na avaliação do seu impacto na saúde humana – desenvolvimento de metodologias voltamétricas com eletrodos de filme de bismuto. *Revista de Faculdade de Ciências e Saúde, Porto*, 6 (2009) 220-230.

Leufroy, A.; Noel, L.; Beauchemin, D.; Guérin, A. Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 402, (2012b) 2849-285.

Leufroy, A.; Noel, L.; Beauchemin, D.; Guérin, T. Use of continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. *Food Chemistry*, 135, (2012a) 623-633.

Lima, A.C.S.; Soares, D.J.; Silva, L.M.R.; Figueiredo, R.W.; Sousa, P.H.M.; Menezes, E.A. *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew Apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale L.*) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*. 161 (2014) 142-147.

Linder, M.C. Nutritional biochemistry and metabolism with clinical application. 2. Ed. International Edhion. East Norwak: CT. Prentice-Hall Internacional Inc., cap.6, nutrition and metabolism of the major minerals- cap. 7, nutrition and metabolism of the trace elements, (1991) p. 191-276.

Llorente-mirandes, T.; Llorens-Muñoz, M.; Funes-Collado, V.; Sahuquillo, A.; López-Sánchez, J.F. Assessment of arsenic bioaccessibility in raw and cooked edible mushrooms by a PBET method. *Food Chemistry*, 194 (2016) 849-856.

Luten, J.; Crews, H.; Flynn, A.; Dael, P.V.; Kastenmayer, P.; Hurreal, R.; Deelstra, H.; Shen, L.H.; Fairweather-Tait, S.; Hickson, K.; Farre, R.; Schlemmer, U.; Frohlich, W. Inter-laboratory trial on the determination of the *in vitro* iron dialyzability from food. *Journal science Food Agricultural*. 72 (1996) 415-424.

Herrera-Agudelo, M. A. , Miró, M., Arruda, M.A.Z., *In vitro* oral bioaccessibility and total content of Cu, Fe, Mn and Zn from transgenic (through cp4 EPSPS gene) and nontransgenic precursor/successor soybean seeds, *Food Chem*. 225 (2017) 125-131.

He , M., Wang, W.X. Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs, *Food Chem. Toxicol.* 55 (2013) 627–636.

Intawongse, M., Dean, J. R., In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 875-886.

Minekus, M., Alminger , M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Miró, M., Hansen, E.H., Chomchoei, R., Frenzel, W., Dynamic flow-through approaches for metal fractionation in environmentally relevant solid samples, *TrAC-Trends Anal. Chem* 24 (2005) 759-771.

Rosende, M., Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Miró, M., Assessing oral bioaccessibility of trace elements in soils under worst-case scenarios by automated in-line dynamic extraction as a front end to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 842 (2014) 1-10.

M. Rosende, M. Miró, Recent trends in automatic dynamic leaching tests for assessing bioaccessible forms of trace elements in solid substrates, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 67-78.

M. Rosende, M. Miró, V. Cerda, Fluidized-bed column method for automatic dynamic extraction and determination of trace element bioaccessibility in highly heterogeneous solid wastes, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 41-48.

Rosende, M., Miró, M., Cerda, V., Fluidized-bed column method for automatic dynamic extraction and determination of trace element bioaccessibility in highly heterogeneous solid wastes, *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 192-201

Rosende, M., Segundo, M.A., Magalhaes, L.M., Miró, M., Automated microdialysis-based system for in-situ microsampling and investigation of lead bioavailability in terrestrial environments under physiologically-based extraction conditions, *Environ. Sci. Techn.* 47 (2013) 11668-11675.

Schreiber , M., Otto, M., Fedotov, P.S., Wennrich, R., Dynamic studies on the mobility of trace elements in soil and sediment samples influenced by dumping of

residues of the flood in the Mulde River region in 2002, *Chemosphere* 61 (2005) 107-115.

Herrera, M.A., Rosende, M., Arruda, M.A.Z., Miró, M., On-line coupling of physiologically relevant bioaccessibility testing to inductively coupled plasma spectrometry: Proof of concept for fast assessment of gastrointestinal bioaccessibility of micronutrients from soybeans, *Anal. Chim. Acta* 939 (2016) 1–9.

García M.C., Torre, M., Marina, M.L., Laborda, F., Composition and characterization M.P. Beeston, H.J. Glass, J.T. van Elteren, Z. Slejkovec, Assessment of elemental mobility in soil using a fluidised bed approach with on-line ICP-MS analysis, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 264.

Cave, M.R., Wragg, J., Harrison, I., Vane, C. H., A comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples, *Environ. Sci. Technol.*, 44 (2010) 2654-2660.

Cave, M.R., Rosende, M., Mounteney, I., Gardner, A., Miró, M., New Insights into the Reliability of Automatic Dynamic Methods for Oral Bioaccessibility Testing: A Case Study for BGS102 soil, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 9479-9486.

Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., GoldadePost, G., Harnois, M., Edwards, D., Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3697–3705.

Matos, J.; Lourenço, H.M.; Brito, P.; Maulvault, A.L.; Martins, L.L.; Afonso, C. Influence of bioaccessibility of total mercury, methyl-mercury and selenium on the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked blue shark (*Prionace glauca*). *Environmental Research*, 143 (2015) 123-239.

Miller, D.D.; Schrickler, B.R.; Rasmussen, R.R.; Van Campen, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34 (1981) 2248-2256, 1981.

Horner, N.S. , Beauchemin, D., A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 1-6.

Fennema, O.R., Parkin, K., Damodaran, S., (Eds.), *Fennema's food chemistry*, fourth ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.

Olayinka, K.O.; Haswell, S.I.; Grzeskowiak, R. Speciation of cadmium in crab meat by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrothermal atomic absorption detection in a model gut system. *Journal Analytical Atomic Spectrometric*, 4 (1989) 171-173.

Oomen, A.G.; Hack, A.; Minekus, M.; Zeijdner, E.; Cornelis, C.; Schoeters, G.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T.; Wragg, J.; Rompelberg, C.J.M.; Sips, A.J.A.M.; Wijnen, J.H.V. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environment Science Technology*, 36 (2002) 3326- 3334.

Oomen, A.G.; Rompelberg, C.J.M.; Bruil, M.A.; Dobbe, C.J.G.; Pereboom, DPKH.; Sips, A.J.A.M. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44 (2003) 281-287.

Vohra, P., Gray, G.A., Kratzer, F.H., Phytic acid-metal complexes, *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 120 (1965) 447–454.

Peixoto, R.R.A. Elementos metálicos em achocolatados: teores totais e frações bioacessíveis e biodisponíveis. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Salvador, 2015.

Peixoto, R.R.A.; Devesa, V.; Vélez, D.; Cervera, M.L.; Cadore, S. Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. *Journal of Food Composition and Analysis*. 48 (2016) 41-47.

Peixoto, R.R.A.; Mazon, E.A.M.; Cadore, S. Estimation of the bioaccessibility of metallic elements in chocolate drink powder using an *in vitro* digestion method and

spectrometric techniques. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24 (2013) 884-890.

Platel, K.; Eipeson, S. W.; Srinivasan, K. Bioaccessible mineral content of malted finger millet (*Eleusine coracana*), Wheat (*Triticum aestivum*), and Barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 8100-8103.

Pohl, P.; Steck, H.; Greda, K.; Jamroz, P. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chemistry*, 134 (2012) 392–396, 2012.

Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, I. S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A., A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus, *Food Funct.* 5 (2014) 1113-1124.

Jesus, R. M., Silva, L. O., Castro, J. T., Azevedo Neto, A. D., Jesus, R. M., Ferreira, S. L., Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry, *Talanta* 106 (2013) 293–297.

Lamsal, R.P., Beauchemin, D., Estimation of the bio-accessible fraction of Cr, As, Cd and Pb in locally available bread using on-line continuous leaching method coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 867 (2015) 9-17.
R.R.A. Peixoto, V. Devesa, D. Vélez, M.L. Cervera, S. Cadore, Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder, *J. Food Compos. Anal.* 48 (2016) 41–47.

Rosende, M., Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Miro, M. Assessing oral bioaccessibility of trace elements in soils under worst-case scenarios by automated in-line dynamic extraction as a front end to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 842 (2014) 1-10, 2014.

Rosende, M., Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Miro, M. Automated microdialysis-based system for in situ microsampling and investigation of lead bioavailability in

terrestrial environments under physiologically based extraction conditions. *Environmental Science & Technology*, 47(2013) 11668-11675.

Ruby, M.V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D.E.; Casteel, S.W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environment Science Technology*, 33 (1999) 3697–3705.

Ruzik, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. *Talanta*, v. 93 (2012) 18-3.

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., Feidt, C., In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6252-6260.

Jin, S., Ou, B., Decker, E.A., McClements, D.J., In vitro human digestion models for food applications, *Food Chem.* 125 (2011) 1-12.

Tokalioglu, S., Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis, *Food Chem.* 134 (2012) 2504–2508.

Tokalioglu, S., Clough, R., Foulkes, M., Worsfold, P., Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method, *Food Chem.* 150 (2014) 321–327.

Cozzolino, S.M.F., Biodisponibilidade de nutrientes, first ed., Manole, Barueri, 2007.

Gropper, S.S., Smith, J.L., *Advanced Nutrition and Human Metabolism (6th Ed.)*, Wadsworth, Cengage Learning, Belmont, CA, chapter 2 (2013) pp.33-58.

Bosso, S.T., Enzweiler, J., Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão, *Quim Nova* 31 (2008) 394–400.

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

Sherwood, L. Human physiology-from cells to systems. Brooks/Cole, Cengage Learning, 7th ed., 2010, Canada.

Silva, E.N.; Heerdt, G.; Cidade, M.; Pereira, C.T.; Morgon, N.H.; Cadore, S. Use of *in vitro* digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe e Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 119 (2015) 152-158.

Silva, E.N.; Leme, A.P.B.; Cidade, M.; Cadore, S. Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. *Talanta*, 117 (2013) 184-188, 2013.

Souza, L.A. Determinação e avaliação da bioacessibilidade de minerais em amostras de linhaça e gergelim por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

Staden, J. F. V. Application of phthalocyanines in flow- and sequential-injection analysis and microfluidics systems: A review. *Talanta*. v.139, (2015) p.75-88.

Stelmach, E.; Pohl, P.; Szymczycha-Madeja, A. Evaluation of bioaccessibility of Ca, Fe, Mg and Mn in ground coffee infusions by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25 (2014) 1993-1999.

Stelmach, E.; Szymczycha-Madeja.; Pohl, P. A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews. *Food Chemistry*, 197 (2016) 388-394.

Sun, L.; Gaoxiang, L.; Yang, M.; Zhuang, Y. Bioaccessibility of cadmium in fresh and cooked *Agaricus blazei Muril* assessed by *in vitro* biomimetic digestion system. *Food and Chemical Toxicology*. 50 (2012) 1729-173.

Llorente-mirandes, T., Llorens-Muñoz, M., Funes-Collado, V., Sahuquillo, A., López-Sánchez, J.F., Assessment of arsenic bioaccessibility in raw and cooked edible mushrooms by a PBET method, *Food Chem*. 194 (2016) 849–856.

Nguyen, T.T.P., Bhandari, B., Cichero, J., Prakash, S., A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula, *Food Res. Int.* 76 (2015) 373-386.

The United States Pharmacopeia (USP) and National Formulary USP36–NF 31, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, USA, 2013.

Dufailly, V., Guérin, T., Noël, L., Frémy, J.M., Beauchemin, D., A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 1263-1268.

Romarís-hortas, V., Bermejo-barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Pireiño, A., Speciation of the bio-available iodine and bromine forms in edible seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 24-32.

Queiroga, V.P., Freire, R.M.M., Firmino, P.T., Marinho, D.R.F., Silva, A.C., Barbosa, W.T., Queiroga, D.A.N., Avaliação da qualidade das sementes de gergelim submetidas aos processos de despliculação manual, físico e mecânico, *Revist. Bras. Prod. Agroind.* 14 (2012) 307–315.

Van de Wiele, T.R.; Oomen, A.G.; Wragg, J.; Cave, M.; Minekus, M.; Hack, A.; Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science*, 42 (2007) 1203-1211.

Versantvoort, C.H.M.; Oomen, A.G.; Van de Kamp, E.; Rompelberg, C.J.M.; Sips, A.J.A.M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chemistry Toxicology*. 43 (2005) 31-40.

Versantvoort, C.H.M.; Van de Kamp, E.; Rompelberg, C.J.M. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Report n°320102002, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands, 2004.

Brack, W. , Bandow, N., Schwab, K., Schulze, T., Streck, G., Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 543-549.

Wang, C.; Duan, H.Y.; Teng, J.W. Assessment of microwave cooking on the bioaccessibility of cadmium from various food matrices using an *in vitro* digestion model. *Biological Trace Elemental Residual.* 160 (2014) 276-284.

Wang, Z.; Ichikawa, S.; Kozu, H.; Neves, M.A.; Nakajima, M.; Uemura, K.; Kobayashi, I. Direct observation and evaluation of cooked white and brown rice digestion by gastric digestion simulator provided with peristaltic function. *Food Research International*, 71 (2015) 16-22.

Wojcieszek, J.; Ruzik, L. Operationally defined species characterization and bioaccessibility evaluation of cobalt, copper and selenium in Cape gooseberry (*Physalis Peruviana* L.) by SEC-ICP MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 34 (2016) 15-21.

Wragg, J.; Cave, M.; Basta, N.; Brandon, E.; Casteel, S.; Denys, S. An interlaboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the total Environmental*, 409 (2011) 4026-4030.

Wragg, J.; Cave, M.; Taylor, H.; Basta, N.; Brandon, E.; Casteel, S.; Gron, C.; Oomen, A.; Van de Wiele, T. Inter-laboratory trial of a unified bioaccessibility procedure. *British Geological, Survey Open Report, OR/07/027.* (2009) 90pp.

Cuevas, Z.O, Sangronis, E., Caracterizacion de semillas de linaza (*Linum usitatissimum* L.) cultivadas em Venezuela, *Arch. Lationoam. Nutr.* 62 (2012) 192–200.

Zaccari, F.; Cabrera, M.C.; Ramos, A.; Saadoun, A. *In vitro* bioaccessibility β -carotene , Ca, Mg and Zn in landrace carrots (*Daucus carota*, L.). *Food Chemistry*, 166 (2015) 365-371.