



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

TAIANA ANDRADE DA ANUNCIÇÃO

**DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM FÓRMULAS
NUTRICIONAIS ENTERAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO
ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO
EMPREGANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO**

Salvador

2020

TAIANA ANDRADE DA ANUNCIÇÃO

**DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM FÓRMULAS
NUTRICIONAIS ENTERAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO
ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO
EMPREGANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena
Gomes Teixeira

Salvador

2020



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA




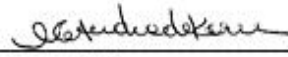
TERMO DE APROVAÇÃO

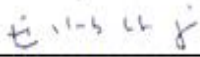
TAIANA ANDRADE DA ANUNCIÇÃO

"DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM FÓRMULAS NUTRICIONAIS ENTERAIS
POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO EMPREGANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr.ª Maria das Graças Andrade Korn 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 16 de outubro de 2020.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

A636 Anunciação, Taiana Andrade da

Determinação multielementar em fórmulas nutricionais enterais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado empregando amostragem em suspensão/ Taiana Andrade da Anunciação. – Salvador, 2020.

77 f.

Orientador: Prof. Dr Leonardo Sena Gomes Teixeira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2020.

1. Química Analítica. 2. Análise Espectral. 3. Nutrição Enteral. I. Teixeira, Leonardo Sena Gomes. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 543.42

“Acho maravilhoso perceber o quanto algumas vidas interagem com a nossa de um jeito tão mágico e bonito. Todo encontro que verdadeiramente nos toca é uma espécie de milagre num mundo de bilhões de seres humanos. Algumas pessoas a gente nem imaginava que existiam, mas, meu Deus, que agrado bom é para a alma descobrir que vivem. Pessoas que fazem muita diferença na nossa jornada, com as quais trocamos figurinhas raras para o nosso álbum. ” (Ana Jácomo)

AGRADECIMENTOS

Por mais que a gratidão seja sempre presente na minha vida, reservo esse espaço para, mais uma vez, agradecer as pessoas que fizeram diferença nessa jornada.

Ao professor Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira, por ter acreditado em mim, pela paciência e pelo cuidado de, antes de tudo, me enxergar como ser humano.

A todos os integrantes do grupo IDEIA, em especial a Diego, Laís e Vanessa pelo convívio e pelos momentos de descontração, e a Luana Araújo, a quem hoje posso chamar de amiga.

Aos vizinhos do Lab 403 que tanto me ajudaram: Leilane, Filipe, Ana Clara, Laís, Wellington, Sarah, que me ofereceram ora uma palavra de conforto, ora auxílio para uso de equipamentos e vidrarias, e sempre e mais importante, o tempo deles.

A todos os professores do instituto de química da UFBA que compartilharam seus conhecimentos. Em especial, gostaria de agradecer a professora Dra. Maria das Graças Korn, que teve influência direta para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, e aos órgãos de fomento: FAPESB, CNPq e CAPES.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA pela oportunidade, e aos seus funcionários pelo apoio, em especial Luciana, Michel e Victor.

A todos os técnicos da instituição, em especial a Aldo. Ele sabe que eu não sou muito de falar, mas, nesse caso, de fato, me faltam palavras para agradecê-lo.

Por fim, gostaria de agradecer a minha família. Meus pais, Cristina e Reginaldo, tudo que faço nessa vida é por vocês, para vocês. Minhas irmãs, Taise e Talita, eu sou metade do que nossos pais nos ensinaram, e a outra metade uma tentativa de ser igual a vocês. A Eduardo, por sempre acreditar em mim. Minha avó Rosália. Meus amigos Thi, Ju e Leu, presentes que a graduação me deu. Pati e Ju, amigas de uma vida inteira. Tias, tios, primos, primas, Marie, Sirius, Duda, Tommy, Juliana, Timtim, Cássia, Natanael, Renato e Juracy. Para mim, a parte mais bonita da química, sem dúvidas, é perceber a forma como nossas vidas interagem. Gratidão.

RESUMO

Uma dieta nutricional adequada e a absorção dos nutrientes pelo organismo humano são fatores fundamentais para o seu funcionamento. Porém, em alguns pacientes hospitalizados, a ingestão e absorção de alimentos são dificultadas, sendo necessário o uso de técnicas nutricionais, a exemplo da terapia de nutrição enteral. Grande parte dessas fórmulas utilizadas contém vitaminas e minerais, sendo necessária a administração rigorosa dos mesmos de modo a se evitar danos aos pacientes. Dessa forma, um controle de qualidade desses produtos é importante, o que inclui a determinação de espécies inorgânicas. Neste trabalho, foi desenvolvida uma estratégia analítica para determinação de Cu, Fe, K, P e Zn, presente no rótulo das formulas de nutrição enteral, por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) empregando amostragem em suspensão. Para determinar as condições ótimas experimentais, quanto ao uso de agentes estabilizantes da suspensão (HNO_3 , etanol e Triton X-100), foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 . Estabeleceu-se como parâmetro dependente as intensidades dos sinais obtidos no ICP OES para cada analito (na forma de resposta múltipla) e como variáveis independentes as concentrações dos agentes estabilizantes utilizados no preparo das suspensões. O domínio experimental envolveu valores máximos de concentração de HNO_3 , etanol e Triton X-100 em 10%, 6,0% e 0,5% v v⁻¹, respectivamente, e valores mínimos de 0%. As suspensões foram preparadas em meio contendo os agentes estabilizantes e 0,20 g da amostra líquida para um volume final de 20,0 mL, seguido de agitação manual. Verificou-se que nenhum dos agentes testados apresentou influência significativa na intensidade dos sinais obtidos no domínio experimental estudado, indicando que a amostra poderia ser analisada diretamente, após simples diluição. Entretanto, no procedimento recomendado, indicou-se o uso de HNO_3 10% v v⁻¹ para melhor extração dos analitos da matriz. Nas condições indicadas, foi possível observar efeito de matriz, de tal forma que a construção das curvas de calibração foi feita na presença da amostra empregando curvas com adição dos analitos. O método permitiu a determinação de Cu, Fe, Zn, K e P em fórmulas nutricionais enterais com limites de detecção na ordem de mg L^{-1} (0,005; 0,009; 0,011; 24,0; 8,0, respectivamente). Ensaios de adição e recuperação dos analitos foram realizadas nas amostras com resultados entre 96 e 120%. O método proposto foi aplicado para análise de fórmulas nutricionais enterais por amostragem em suspensão. Os resultados foram comparados com os obtidos após digestão das amostras em forno de micro-ondas e não foram observadas diferenças significativas. As faixas de concentração encontradas nas amostras analisadas, em mg L^{-1} , foram: Cu (0,41 – 0,50), Fe (2,0 – 3,1), Zn (1,7 – 4,7), K (682 – 1409) e P (217 – 344). O trabalho apresenta grande valor acadêmico integrado, uma vez que é o primeiro trabalho com registro na literatura que propôs uma alternativa para determinação de Cu, Fe, K, P e Zn presente no rótulo das formulas de nutrição enteral.

Palavras-chave: Amostragem em suspensão, ICP OES, nutrição enteral, determinação multielementar.

ABSTRACT

An adequate nutritional dietary and an efficient absorption of nutrients by the human body are fundamental factors for its functioning. However, for some hospitalized patients, the ingestion and absorption of food is difficult, requiring the use of nutritional techniques, such as enteral nutrition therapy. Most of these nutritional formulas contains vitamins and minerals, requiring strict administration of these nutrients in order to prevent harm to patients. Thus, a quality control of these products is important, which includes the determination of inorganic species. In this work, an analytical strategy for the determination of Cu, Fe, K, P and Zn was developed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) in enteral nutritional formulas using slurry sampling. To determine the best experimental conditions, in relation to the use of suspension stabilizing reagents (HNO₃, ethanol and Triton X-100), a factorial experimental design 2³ was carried out. The intensity of the signals obtained in the ICP OES was established as a dependent parameter for each analyte (as multiple response) and as independent variables the concentrations of stabilizing reagents used in the preparation of suspensions. The experimental domain involved maximum values of HNO₃, ethanol and Triton X-100 concentration in 10%, 6.0% and 0.5% v v⁻¹, respectively, and minimum values of 0%. The suspensions were prepared in an environment containing the stabilizing agents and 0.20 g of the sample to a final volume of 20.0 mL, followed by manual stirring. It was found that none of the tested reagents had a significant influence on the intensity of the signals obtained in the experimental domain studied, indicating that the sample could be analyzed directly, after simple dilution. However, in the recommended procedure, the use of 10% v v⁻¹ HNO₃ was indicated for better extraction of the analytes from the matrix. Under the conditions indicated, it was possible to observe the matrix effect, in such a way that the construction of the calibration curves was done in the presence of the sample using curves with the addition of analytes. The method allowed the determination of Cu, Fe, Zn, K and P in enteral nutritional formulas with detection limits in the order of mg L⁻¹ (0.005; 0.009; 0.011; 24.0; 8.0, respectively). Addition and recovery tests in enteral nutritional formulas were performed with results between 96 and 120%. The proposed method was applied to analyze enteral nutritional formulas by slurry sampling. The results were compared with those obtained after digestion of samples in a microwave oven and no significant differences were observed. The concentration ranges found in the samples analyzed, in mg L⁻¹, were: Cu (0.41 - 0.5), Fe (2.0 - 3.1), Zn (1.7 - 4.7), K (682 - 1409) and P (217 - 344). The work has great integrated academic value, since it is the first work registered in the literature that proposed an alternative for determining Cu, Fe, K, P and Zn present on the label of enteral nutrition formulas.

Keywords: Slurry sampling, ICP OES, enteral nutrition, multielement determination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias de administração da nutrição enteral. 1A – via nasoentérica, 1B – via nasogástrica, 1C – via jejunostomia e 1D – via gastrostomia.	18
Figura 2	Formas de administração da nutrição enteral.	20
Figura 3	Rótulo de embalagem de uma formulação de nutrição enteral.	22
Figura 4	Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas na etapa de definição do melhor agente estabilizante no preparo da suspensão.	55
Figura 5	Representação esquemática da reação que leva à CMC.	57
Figura 6	Gráfico da intensidade (cps) x fator de diluição para Cu, Fe, P e Zn.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidades de minerais permitidos para fórmula padrão para nutrição enteral em 100 mL.	21
Tabela 2	Determinação de espécies inorgânicas em fórmulas nutricionais enterais.	26
Tabela 3	Determinação de espécies inorgânicas em amostras de alimentos por ICP OES empregando amostragem em suspensão.	36
Tabela 4	Parâmetros operacionais do ICP OES empregados neste trabalho.	46
Tabela 5	Amostras de solução nutricional enteral utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho.	47
Tabela 6	Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial 2 ³ .	48
Tabela 7	Matriz experimental do planejamento fatorial (2 ³).	49
Tabela 8	Rampa de aquecimento para digestão das amostras de formulação nutricional enteral no forno de micro-ondas.	50
Tabela 9	Equações curvas de calibração obtidas para determinação de Cu, Fe, Zn, K e P por ICP OES.	60
Tabela 10	Resultados do ensaio de adição e recuperação aplicado em amostras de solução nutricional enteral por amostragem em suspensão e determinação por ICP OES.	66
Tabela 11	Resultados da análise de amostras de formulações nutricionais enterais por ICP OES empregando amostragem em suspensão e após digestão por micro-ondas	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Analistas Químicos Oficiais (do inglês <i>Association of Official Agricultural Chemists</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BEC	Concentração equivalente do sinal de fundo (do inglês <i>background equivalente concentration</i>)
CMC	Carboximetilcelulose (CMC)
CRM	Material de referência certificado (do inglês <i>Certified Reference Material</i>)
CV	Coeficiente de variação
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês <i>Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>)
HG AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i>)
IBRANUTRI	Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar
ICP	Plasma de acoplamento indutivo (do inglês <i>inductively coupled plasma</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)

ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês, <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCC	Celulose microcristalina
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (do inglês, <i>microwave induced plasma optical emission spectrometry</i>)
MS	Ministério da Saúde
NE	Nutrição enteral
NO	Nutrição oral
NP	Nutrição Parenteral
PC	Ponto central
PVC	Polivinilpropileno
RCD	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
SBR	Relação sinal-fundo (do inglês <i>signal-to-background ratio</i>)
TGI	Trato gastrointestinal
TN	Terapia de nutrição
TNE	Terapia de nutrição enteral
TNO	Terapia de nutrição oral
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (do inglês, <i>tetramethylammo- hydroxide</i>)
TSD	Teores de sólidos dissolvidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 TERAPIA NUTRICIONAL	15
3.2 NUTRIÇÃO ENTERAL	17
3.3 PRESENÇA DE METAIS EM AMOSTRAS DE NUTRIÇÃO ENTERAL	22
3.4 PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS	29
3.4.1 Amostragem em suspensão	31
4. PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1 MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES	44
4.2 INSTRUMENTAÇÃO	45
4.3 AMOSTRAS	47
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.4.1 Preparo das suspensões	48
4.4.2 Planejamento experimental 2³	48
4.4.3 Curvas analíticas	49
4.4.4 Procedimento para digestão das amostras por forno de microondas	50
4.4.5 Otimização	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 AVALIAÇÃO DO FATOR DE DILUIÇÃO	58
5.2 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO	59
5.3 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ	59
5.4 FIGURAS DE MÉRITO E APLICAÇÃO	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
7. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Algumas patologias podem causar um balanço hidroeletrolítico negativo no ser humano. Dessa forma, a ingestão e absorção de uma dieta nutricional adequada são dificultadas, sendo necessário o uso de técnicas nutricionais para o fornecimento dos nutrientes necessários para uma boa recuperação do indivíduo. Dentre essas técnicas, pode-se citar a terapia de nutrição enteral (NE) (GOPALAN, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a terapia de nutrição enteral é um conjunto de procedimentos terapêuticos para manutenção ou recuperação do estado nutricional do paciente por meio de NE. A NE compreende alimento para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, elaborada para uso por sondas ou via oral, para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, conforme suas necessidades nutricionais (BRASIL, 2000). Em geral, a NE deve ser indicada para indivíduos que apresentem trato gastrointestinal funcionante, mas com impossibilidade de prover ingestão via oral (IVO) <60% das necessidades diárias nutricionais recomendadas e, por isso, é aplicada com sucesso em pacientes que apresentem patologias como AIDS, falência respiratória, traumas, queimaduras, recuperações cirúrgicas, dentre outras, tanto no campo neonatal e pediátrico quanto no geriátrico, e estejam associados a prejuízos do organismo. Por outro lado, a NE não é recomendada para pacientes que apresentem obstrução intestinal, vômitos constantes e diarreias severas. Para esses casos, devem ser utilizadas outras técnicas da nutrição (BRASIL, 2015).

Grande parte dessas fórmulas nutricionais contém vitaminas e minerais, que são necessários para contemplar a maioria dos pacientes. Dentre os minerais, pode-se citar elementos metálicos como ferro, manganês e zinco, que são indispensáveis a vida, mas podem ser tóxicos em elevadas concentrações. Sendo assim, a administração com valor distinto do recomendado desses micronutrientes pode acarretar danos aos pacientes, aumentando seu tempo de internação, custos hospitalares, além de problemas mais severos como a desnutrição. Dessa forma, faz-se necessário um controle de qualidade rigoroso desses produtos.

Poucos estudos são reportados na literatura envolvendo esse tipo de amostra com o objetivo de desenvolver estratégias que possibilitem monitorar espécies químicas. Dentre as técnicas mais utilizadas para análise de alimentos, podem-se citar a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Todas as técnicas, porém, necessitam, em geral, de uma etapa de preparo da amostra, muitas vezes envolvendo pré-concentração do analito (MACAROVSCHA, 2011; BRANDÃO, 2011).

A amostragem em suspensão surge como uma alternativa, sendo um procedimento de preparo de amostra que apresenta como vantagens a simplificação da etapa de pré-tratamento da amostra, diminuindo o tempo de análise e o trabalho operacional; não é necessária uma etapa adicional de digestão da amostra; minimização do risco de contaminação da amostra pela redução de reagentes; eliminação ou redução de perdas de analitos que podem eventualmente se volatilizar durante a etapa de pré-tratamento; e redução do consumo de reagentes (BRANDÃO, 2011). Na etapa de otimização dos métodos que empregam a amostragem em suspensão, um conjunto de fatores químicos e físicos devem ser avaliados: o meio líquido utilizado para o preparo da suspensão, tamanho das partículas, concentração da suspensão, partição do analito, homogeneização da suspensão, e uso de agentes estabilizantes (MAGALHÃES, 1998).

Dentre as técnicas espectroanalíticas, a ICP OES apresenta-se como uma boa alternativa, já que apresenta como vantagens a possibilidade de determinação multielementar, considerando que as fórmulas nutricionais enterais apresentam em seu conteúdo uma variedade de espécies inorgânicas, rapidez e, no caso em questão, disponibilidade de equipamento. Assim, apresenta-se, neste trabalho, o desenvolvimento de um método analítico utilizando amostragem em suspensão, para determinação multielementar empregando a ICP OES em amostras de fórmulas nutricionais enteral.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma estratégia analítica, empregando amostragem em suspensão, para determinação multielementar em fórmulas nutricionais enterais por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar diferentes agentes estabilizantes para o preparo da suspensão das fórmulas nutricionais enterais;
- Determinar as figuras de mérito e validar o método desenvolvido;
- Indicar o protocolo analítico para a determinação simultânea de espécies inorgânicas (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P e Zn) em fórmulas nutricionais enterais;
- Aplicar o método desenvolvido para análise de fórmulas nutricionais enterais.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 TERAPIA NUTRICIONAL

A terapia nutricional (TN) é o conjunto de procedimentos terapêuticos utilizados para manutenção ou recuperação do estado nutricional (EN) de um indivíduo (BRASIL, 2000). O EN adequado consiste no equilíbrio entre as necessidades nutricionais, ingestão alimentar e absorção de nutrientes. Assim, quando há o desequilíbrio entre o consumo alimentar e o gasto energético, observa-se alterações no EN em decorrência, principalmente, do aumento da necessidade calórico-proteica, consumo inadequado de nutrientes e desequilíbrios metabólicos (SAMPAIO *et al.*, 2012). Para esses casos, a ingestão e absorção de alimentos são dificultadas, interferindo na recuperação e maior risco de desnutrição, resultando maiores riscos de contaminação se em ambiente ambulatorial ou hospitalar, em hospitalização prolongada, e maiores custos associados (CÔRTEZ *et al.*, 2003).

Um estudo realizado na década de 90, em hospitais brasileiros, pelo Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar (IBRANUTRI), constatou-se que cerca de 48% dos pacientes hospitalizados da rede pública apresentavam desnutrição hospitalar, dentre os quais 12,5% apresentavam desnutrição grave e 35,5%, moderada (WAITZBERGET, CAIAFFA & CORREIA, 2001). Esse estudo alertou sobre a prevalência de desnutrição em pacientes hospitalizados no Brasil e a importância da TN. Em um estudo realizado por Duarte *et al.* (2016), analisou-se o risco nutricional em pacientes hospitalizados durante o período de internação nos meses de julho a setembro de 2015, em um hospital público de Santa Maria-RS. A análise dos dados encontrados sugeriu que os pacientes com um período de internação maior que 15 dias apresentaram maior risco nutricional devido à perda de massa magra e, conseqüentemente, alteração do Índice de Massa Corporal (IMC), percentual de perda de peso e de parâmetros bioquímicos, embora não o suficiente para serem considerados desnutridos. Porém, a perda ponderal e desequilíbrios metabólicos aumentam o risco de infecções, diminuem a cicatrização e aumentam o risco de mortalidade (DUARTE *et al.*, 2016). A partir de diversos estudos reportados na literatura faz-se necessário o uso de terapias nutricionais para o fornecimento dos nutrientes necessários afim de promover a recuperação da saúde desses pacientes e diminuir o tempo de internação e os custos associados.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RCD N° 63, de 6 de julho de 2000 da ANVISA, agência reguladora vinculada ao Ministério da Saúde que exerce o controle sanitário de todos os produtos e serviços (nacionais ou importados) submetidos à vigilância sanitária, tais como medicamentos e alimentos, a TN é definida como “conjunto de procedimentos terapêuticos que visam a manutenção ou recuperação do estado nutricional do paciente”, e pode ser oferecida através de suplementos nutricionais orais, por meio da nutrição parenteral (NP) ou nutrição enteral (NE), de forma isoladas ou combinadas, em pacientes incapazes de satisfazer adequadamente suas necessidades nutricionais e metabólicas por via oral (BRASIL, 2000).

Além da manutenção e recuperação do estado nutricional do paciente, a TN tem como objetivos reverter o quadro de desnutrição; oferecer condições favoráveis para o estabelecimento do plano terapêutico; oferecer nutrientes em quantidades adequadas para manter as funções vitais e a homeostase; recuperar a atividade do sistema imune; reduzir os riscos da hiperalimentação; e garantir a oferta de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais adequadas para minimizar o catabolismo (CARVALHO *et al.*, 2014).

A TN oral consiste na administração de nutrientes por meio de suplementos nutricionais associados à alimentação diária. Esses suplementos devem conter os nutrientes necessários para cada tipo de paciente de forma concentrada. Identificada à necessidade de TN, a melhor via é a oral, que deve ser, sempre que possível, preservada, em situações que o trato gastrointestinal (TGI) esteja total ou parcialmente funcional (CARVALHO *et al.*, 2014). A NP consiste numa solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas, em situações que o trato digestivo seja completamente excluído no processo (CUPPARI, 2013). Por sua vez, NE compreende alimento para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida ou estimada, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializado ou não, utilizada exclusiva ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou

não, conforme suas necessidades nutricionais, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar (BRASIL, 2000).

A TN oferecida por meio da NE, comparada com a NP, seja total ou parcialmente, é preferível visto a sua simplicidade, tornando-se uma rota mais barata e acessível, além de ser mais fisiológica, oferecendo menores riscos de infecção (CÔRTEZ *et al.*, 2003). Somado a isso, a NP está associada ao aumento do risco de infecções, maior crescimento de bactérias no intestino delgado, ao aumento das transaminases hepáticas, estase biliar e diminuição da depuração de toxinas e drogas (CARVALHO *et al.*, 2014).

3.2 NUTRIÇÃO ENTERAL

Segundo a RCD Nº 63 de 2000 da ANVISA, a terapia de nutrição enteral (TNE) compreende um conjunto de procedimentos terapêuticos para manutenção ou recuperação do estado nutricional do paciente por meio de NE. Dentre os objetivos da NE, pode-se destacar a diminuição da permanência hospitalar/ambulatorial do paciente, reduzindo custos, bem como a diminuição de complicações infecciosas inerentes ao ambiente (CARTOLANO, CARUSO & SORIANO, 2009). Além disso, a terapia de nutrição enteral tem como objetivos melhorar a cicatrização e reduzir a morbimortalidade.

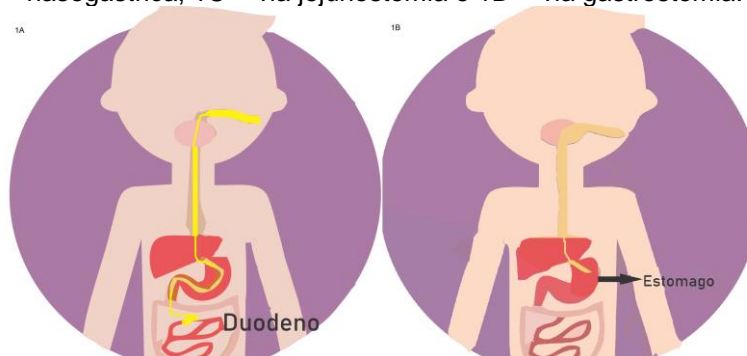
A TNE é indicada para pacientes que apresentem ingestão oral menor que 60% das necessidades nutricionais diárias; quando o trato gastrointestinal (TGI) estiver totalmente ou parcialmente funcional; ou em situações em que o tubo digestivo está íntegro, mas o paciente não quer, não pode ou não deve alimentar-se pela boca. Para a seleção dos diversos tipos de NE, é necessário conhecer as exigências e condições de cada paciente, tais quais: integridade do TGI (capacidade digestiva e absorptiva do paciente), estado geral e condições clínicas, presença de doença específica, situação metabólica, necessidade de restrição hídrica e/ou de algum nutriente específico, e composição da fórmula: conteúdo de minerais e eletrólitos, especialmente, para pacientes com disfunções como renal, hepática e cardíaca (BRASIL, 2016; CUPPARI, 2013).

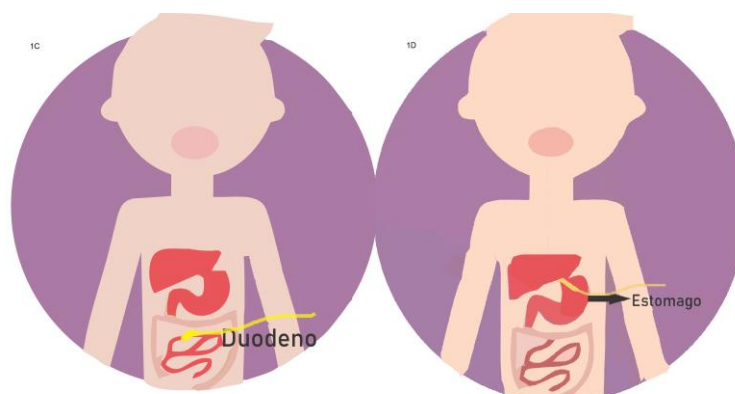
Desse modo, a NE pode ser aplicada em pacientes que apresentem quadros de anorexia, pacientes com nível de consciência rebaixado, pacientes submetidos à

cirurgia maxilo-facial, queimaduras extensas, depressão grave, má absorção, alergia alimentar múltipla, politraumatismo, insuficiência hepática e grave disfunção renal, AIDS, falência respiratória, câncer associado à quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia e recuperações cirúrgicas, dentre outros casos, tanto no campo neonatal e pediátrico, quanto no geriátrico. Por outro lado, as contraindicações, relativas ou temporárias, mais frequentemente observadas incluem pacientes com doença terminal, pancreatite aguda grave, vômitos e diarreias severas e disfunção do TGI ou condições que requerem repouso intestinal (CUPPARI, 2013).

Após a definição por parte da equipe médica da administração da TNE, uma das formas de administração da NE se dá através de sondas, que consiste num tubo fino, macio, e flexível, de poliuretano, polivinilpropileno (PVC) ou silicone, através da via nasogástrica ou orogástrica, na qual a sonda é passada pelo nariz ou pela boca até o estômago, ou pela via nasoentérica ou oroentérica, na qual a sonda é passada pelo nariz ou pela boca até o intestino delgado, ou através de intervenções cirúrgicas denominadas ostomias, as quais se dividem em gastrostomia – a sonda é implantada cirurgicamente ou via endoscópica e permanece em um orifício (estoma) diretamente no estômago – e jejunostomia – a sonda é implantada e permanece em um orifício diretamente no intestino delgado (jejuno) (Figura 1).

Figura 1 - Vias de administração da nutrição enteral. 1A – via nasoentérica, 1B – via nasogástrica, 1C – via jejunostomia e 1D – via gastrostomia.





Fonte: Adaptado de <http://enfermagemilustrada.com/sonda-nasogastrica-x-sonda-nasoenteral-as-diferencas-na-nutricao-enteral/>, acesso em 16 de novembro de 2020.

Os métodos de alimentação enteral subdividem-se em três: contínua, cíclica, intermitente ou em bolus (seringa). Por sua vez, sua forma de elaboração subdivide-se em dois: sistema aberto ou sistema fechado. Através de sistemas abertos pode-se apresentar na forma de pó, para reconstituição em água ou outro líquido, em porções individuais de pacotes hermeticamente fechados ou em latas/potes, permitindo a individualização da fórmula quanto à composição e volume (Figura 2a). A forma de elaboração por sistema aberto também pode-se apresentar na forma líquida semipronta para uso na qual apresenta-se em latas, frascos ou embalagens *Tetra Slim* (Figura 2b), exigindo pouca manipulação antes de sua administração, praticidade e oferta adequada de micronutrientes, em quantidades suficientes para um horário de dieta. Já a forma de elaboração por sistema fechado, se apresenta como formulações líquidas industrializadas, estéreis, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados, em frascos de vidro ou bolsas próprias, diretamente acopladas no equipamento (Figuras 2c e 2d), prontas para uso, acarretando numa menor manipulação e menor risco de contaminação.

Figura 2 - Formas de administração da nutrição enteral. (a) Sistema aberto para reconstituição em pó; (b) Sistema aberto com líquida semipronto para uso; (c) Sistema fechado; (d) Sistema fechado.



Fonte: Adaptado de Araújo, I. S., Santos, H. V. G. Guia multiprofissional de orientação para pacientes em uso de nutrição enteral domiciliar. HEWAB/HU-UNIVASF, Petrolina, 2017.

As fórmulas nutricionais podem ser do tipo industrializadas ou artesanais. As artesanais são preparadas à base de alimentos *in natura* ou produtos naturais, acrescidas ou não de produtos industrializados, com o intuito de complementar a oferta de nutrientes. As fórmulas artesanais devem ser liquidificadas e coadas, e possuem composição nutricional pouco estimada, necessitando, em sua maioria de complementação de vitaminas e minerais, acarretando, portanto, em maior risco de contaminação do paciente. Para as fórmulas industrializadas, espera-se que sejam nutricionalmente completas, de composição precisa e apresentem um menor risco de contaminação comparada às artesanais. Por essa razão, são frequentemente mais utilizadas, principalmente, no ambiente hospitalar.

A maioria das fórmulas nutricionais enterais contém proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais necessários para atingir as necessidades da maioria dos pacientes. Dentre o termo minerais, estão englobadas espécies metálicas, a exemplo de cromo, cobre, ferro, sódio, potássio e zinco, elementos essenciais, mas que em concentrações elevadas podem ser tóxicos. Este tipo de

alimento é altamente concentrado em nutrientes e utilizado em grandes volumes nos pacientes, apresentando elevado risco de contaminação, e a administração do alimento com over ou sobredosagem pode acarretar em danos. Assim, faz-se necessário um controle de qualidade rigoroso destes produtos.

A Resolução da Diretoria Colegiada, RCD N° 21, de 13 de maio de 2015 da ANVISA, dispõe sobre o regulamento técnico de fórmulas para nutrição enteral. No anexo II da RCD N° 21, está descrito quais minerais uma fórmula para NE deve possuir, e as quantidades, que não devem ser inferiores aos limites mínimos e que não ultrapassem os valores máximos dispostos no anexo, que pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidades de minerais permitidos para fórmula padrão para nutrição enteral em 100 mL.

Minerais (unidade)	Limite mínimo (100 mL)	Limite Máximo (100 mL)
Cálcio (mg)	50	125
Cloro (mg)	29	180
Cobre (µg)	45	500
Cromo (µg)	1,8	10
Ferro (mg)	0,7	2,3
Fósforo (mg)	35	200
Magnésio (mg)	13	34
Manganês (mg)	0,12	0,55
Potássio (mg)	80	327
Sódio (mg)	29	115
Zinco (mg)	0,35	2

Fonte: BRASIL (N° 21, de 13 de maio de 2015).

A sobredosagem desses minerais pode acarretar danos ao paciente. O controle de qualidade desses produtos deve ser rigoroso para minimizar possíveis erros. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que envolvam procedimentos mais simples e com menor uso de reagente e geração de

resíduos. Neste contexto, o uso de amostragem de suspensão para determinação de espécies inorgânicas para ser uma alternativa que deve ser considerada.

3.3 PRESENÇA DE ESPÉCIES INORGÂNICAS EM AMOSTRAS DE NUTRIÇÃO ENTERAL

As informações sobre as espécies químicas presentes nos rótulos das fórmulas de nutrição enteral compreendem espécies inorgânicas essenciais para um organismo humano. A faixa de concentração para esses elementos varia na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} . Essas espécies inorgânicas são adicionadas nas formulações industrializadas na forma de sais ou contra-íons de ânions orgânicos (íon que acompanha uma espécie iônica de maneira a manter a neutralidade elétrica), conforme descrito no rótulo de suas embalagens. Como exemplo, pode-se citar o sódio, presente nesse tipo de alimento a partir do fosfato de sódio dibásico, ou o cálcio, presente na forma de citrato de cálcio, como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 – Rótulo de embalagem de uma formulação de nutrição enteral.

Cálcio (mg)	80	8%
Ferro (mg)	1,6	11%
Sódio (mg)	100	**
Potássio (mg)	150	**
Cloro (mg)	125	**
Fósforo (mg)	72	10%
Magnésio (mg)	23	9%
Zinco (mg)	1,2	17%
Cobre (mcg)	180	20%
Manganês (mg)	0,33	13%
Flúor (mg)	0,1	3%
Molibdênio (mcg)	10	22%
Selênio (mcg)	5,7	17%
Cromo (mcg)	6,7	19%
Iodo (mcg)	13	10%
Vitamina A (mcg RE)	82	14%
Carotenoides (mg)	0,2	**
Vitamina D (mcg)	0,7	14%
Vitamina E (mg TE)	1,2	12%
Vitamina K (mcg)	5,3	8%
Vitamina B1 (mg)	0,15	13%
Vitamina B2 (mg)	0,16	12%
Niacina (mg)	1,8	11%
Ácido Pantotênico (mg)	0,53	11%
Vitamina B6 (mg)	0,17	13%
Ácido Fólico (mcg)	27	11%
Vitamina B12 (mcg)	0,21	9%
Biotina (mcg)	4	13%
Vitamina C (mg)	10	22%
Colina (mg)	37	7%

Fonte: Disponível em <https://www.vitaesaude.com.br/dieta-enteral-danone-nutrison-standard-1-0-1-litro>, acesso em: 16 de novembro de 2020.

As espécies inorgânicas, citadas anteriormente, incluem, por exemplo, sódio, cálcio, ferro, potássio, zinco e magnésio, que são essenciais no funcionamento do organismo, uma vez que desempenham atividades metabólicas importantes, sendo recomendados em quantidades específicas para cada paciente a depender da sua necessidade. Por outro lado, em elevadas concentrações podem apresentar riscos à saúde, já que se comportam como bioacumuladores quando expostos por longos períodos, e em baixas concentrações podem causar deficiência e ocasionar riscos à saúde (PAIXÃO, 2016; SOUSA, BACCAN & CADORE, 2011).

A toxicidade das espécies inorgânicas depende da forma química que assumem, sendo em sua grande maioria pela interação entre a forma livre do íon metálico e membranas celulares, interrompendo ou alterando processos biológicos (GOMES *et al.*, 2005; CUPPARI, 2013; CUPPARI e BAZANELLI, 2010; SEVERO *et al.*, 2015; MACEDO *et al.*, 2010; STIVANIN, 2014; MACAROVSCHA, 2011).

A importância do cálcio na nutrição humana está associada com a formação de ossos e dentes e o transporte em nível de membrana celular, contração muscular, transmissão e impulsos nervosos e secreção glandular. O excesso de cálcio causa formação de cálculos renais, síndrome de hipercalcemia e insuficiência renal, enquanto a deficiência causa osteomalácia e osteoporose (CUPPARI, 2013).

Já o cromo participa do metabolismo de carboidratos, potencializando a ação da insulina *in vivo* e *in vitro* e, com isso, aumenta a tolerância à glicose. Os riscos associados ao excesso de Cr ou a deficiência desse mineral são poucos conhecidos. Alguns estudos relacionam o excesso de Cr a distúrbios do sono, alterações de humor, cefaleia, aumento da excreção de minerais-traços e alteração do metabolismo do ferro, uma vez que esse mineral compete com o ferro pela ligação com a transferrina, proteína responsável pelo transporte de ferro recém absorvido (GOMES *et al.*, 2005).

Cobre participa de diversos processos metabólicos por ser componente de diversas enzimas. Atua como agente catalisador de diversas reações, como fosforilação oxidativa, maturação de proteínas e morte celular. Catalisa a oxidação do íon férrico a ferroso e possui importante função no sistema adrenérgico no cérebro, nas terminações nervosas e na medula suprarrenal. O excesso pode causar convulsão, anemia, irritabilidade, tremores; pode progredir para coma,

necrose hepática, colapso vascular e até a morte. A deficiência é caracterizada por anemia, neutropenia e anormalidades esqueléticas, especialmente em reações de desmineralização óssea (MACEDO *et al.*, 2010; MOZRZYMAS, 2018).

Ferro é indispensável aos seres vivos, e está presente em várias proteínas e enzimas, incluindo hemoglobina e mioglobina. A hemoglobina é uma molécula que tem como principal função a troca de gases (CO_2 e O_2) no organismo. O excesso está associado à náusea, vômito e hipotensão, enquanto a deficiência pode causar anemia ferropriva (CUPPARI, 2013; MACAROVSKA, 2011).

Potássio é fundamental no metabolismo celular e do balanço ácido-básico. Juntamente com o sódio, é importante para manutenção do equilíbrio hídrico normal e, com o cálcio, participa da regulação da atividade neuromuscular, de processos como a síntese de proteína e glicogênio e no balanço acidobásico. O excesso pode ser um problema na insuficiência renal, arritmia cardíaca e na acidose grave. A deficiência está associada à hipocalcemia, cujas consequências adversas são fraqueza muscular, câimbra e intolerância à glicose (CUPPARI e BAZANELLI, 2010; STIVANIN, 2014).

O magnésio está presente em ossos e músculos, tecidos moles e fluidos corporais e atua como cofator em mais de 300 reações metabólicas. Atua no transporte de íons potássio e cálcio, modula sinais de transdução, participa do metabolismo de energia, incluindo a produção de adenosina trifosfato (ATP), e proliferação celular. A sua deficiência pode causar desaparecimento do reflexo do tendão, sonolência, respiração difícil, alterações cardiovasculares, hipotensão, cansaço, hipocalcemia, náuseas, vômitos e manifestações cutâneas. A deficiência de Mg inclui sintomas neurológicos, incluindo anorexia, apatia e náusea (CUPPARI, 2013; MACEDO *et al.*, 2010).

O sódio é importante para manutenção do equilíbrio osmótico e do potencial de membrana. O excesso está associado ao aumento da pressão arterial, fator de risco para doenças cardiovasculares e renais, paralisia e convulsões. Já a deficiência (hiponatremia) pode causar o inverso, a hipotensão, fraqueza muscular, câimbra e confusões (CUPPARI, 2013; STIVANIN, 2014).

O fósforo possui papel importante na estrutura e no funcionamento de todas as células vivas, participa das reações de produção de energia, componente

principal de ossos e dentes, crescimento e reparo dos tecidos. O excesso está associado a hipocalcemia e hiperparatireoidismo, enquanto na deficiência ocorrem anormalidades neuromusculares, esqueléticas, hematológicas e renais (CUPPARI, 2013; COZZOLINO, 2005).

Zinco é um elemento de grande importância nutricional por ser componente essencial para a atividade de mais de 300 enzimas. Participa da síntese e degradação de ácidos nucleicos e ribossomos. Envolvido no metabolismo de macronutrientes, é essencial nos processos de diferenciação e replicação celular, assim como nos processos de transporte, função imunológica e informação genética. Desenvolve várias funções no organismo atuando no sistema de defesa por ação antioxidante, evitando a ocorrência de lesões oxidativas relacionadas à ação de espécies reativas de oxigênio. Seu excesso está associado à deficiência de cobre, caracterizada por anemia e neutropenia; função imune comprometida; redução nos níveis de HDL (do inglês, *High Density Lipoproteins* ou lipoproteínas de alta densidade). Por outro lado, a deficiência de zinco pode comprometer o crescimento, hipogonadismo, diminuir a sensação do paladar e ocasionar queda de cabelos em adolescentes com anorexia e, também, em atletas e gestantes (MACEDO *et al.*, 2010; COZZOLINO, 2005).

Por apresentarem dupla ação no organismo humano, ou seja, terem efeito tanto negativo, quanto positivo, é importante determinar essas espécies inorgânicas em amostras alimentícias. Na literatura foram reportados alguns trabalhos envolvendo a determinação de espécies inorgânicas em fórmulas nutricionais (Tabela 2). Diferentes técnicas e procedimentos foram utilizados para determinações uni e multielementar.

Tabela 2 - Determinação de espécies inorgânicas em fórmulas nutricionais enterais.

Técnica	Analitos	Procedimento	Volume da amostra, mL	Limite de detecção	Referências
ICP OES e GF AAS	Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sr, V e Zn	Digestão por micro-ondas empregando 1,0 g das amostras + 2 mL de HNO ₃ (conc.) + 1 mL de H ₂ O ₂ (30%, v v ⁻¹) + 5 mL de água deionizada	25	Al (0,03), As (0,013), Ba (0,001), Ca (0,004), Cd (0,001), Co (0,001), Cr (0,002), Cu (0,004), Fe (0,000), Hg (0,007), K (0,032), Mg (0,001), Mn (0,000), Mo (0,002), Na (1,774), Ni (0,002), P (0,011), Pb (0,012), Sb (0,011), Se (0,019), Sr (0,001), V (0,003) e Zn (0,001), em mg mL ⁻¹	MACAROVSCHA, G. T., 2011
GF AAS	Al	Digestão ácida empregando 1% de HNO ₃ (conc.)	1	87,6 – 961,2 ng mL ⁻¹	BAYDER <i>et al.</i> , 1997

Zn, Cu, Fe e Mn	Decomposição por combustão -			BUNKER & CLAYTON,
F AAS	20 g de amostra foram queimadas para cinzas secas a 460°C	-	-	1983

*ICP OES: Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente; GF AAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite;
F AAS: Espectrometria de absorção atômica em chama.

Estudos envolvendo a determinação de espécies inorgânicas em fórmulas nutricionais enterais têm sido descritos empregando diferentes procedimentos para pré-tratamento desse tipo de amostra. Na Tabela 2 pode ser visto um levantamento de trabalhos descritos na literatura envolvendo fórmulas nutricionais enterais. Apesar de serem descritos poucos trabalhos na literatura envolvendo esse tipo de amostra, foi possível observar que, de uma forma geral, faz-se necessário uma etapa de pré-tratamento da mesma antes da análise, seja uni ou multielementar.

A partir dos trabalhos encontrados, pode-se observar que estudos envolvendo o elemento alumínio foram majoritariamente determinados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Isso se deve ao fato de o Al ser uma espécie metálica frequente em alimentos, que apresenta grande interesse, uma vez que não existe um requisito biológico estabelecido para Al em seres humanos, mas existem efeitos tóxicos associados ao acúmulo do mesmo em cérebro, ossos e glóbulos vermelhos. Além disso, o Al está relacionado a doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose (BAYDER *et al.*, 1997). Por estar presente em níveis muito baixos, não se faz possível sua determinação por ICP OES (MACAROVSKA, 2011).

Com uma exceção, a maior parte dos estudos empregaram ácido nítrico no procedimento envolvido no pré-tratamento da amostra. Isso se deve ao fato do ácido nítrico ser um agente oxidante poderoso (KRUG & ROCHA, 2016).

Além disso, pode-se observar que o trabalho desenvolvido por BUNKER & CLAYTON, utiliza uma grande quantidade de amostra (BUNKER & CLAYTON, 1983). Porém, em alguns casos, o analista na hora da análise não tem disponível essa quantidade, sendo necessário, portanto, desenvolver métodos que requeiram a menor quantidade possível.

Através do levantamento bibliográfico não foram encontrados estudos envolvendo amostragem em suspensão como pré-tratamento da amostra com o objetivo de determinar os analitos pela técnica de ICP OES. Assim, é necessário dispor de métodos alternativos que possibilitem a determinação de elementos traço em amostras fórmulas nutricionais enterais por técnicas de ICP OES, buscando otimizar o tempo de análise, – visto que há procedimentos que podem envolver várias etapas, aumentando o tempo de análise, a exemplo da digestão por micro-

ondas (MACAROVSCHA, 2011) – minimizar o gasto de reagentes, e os riscos de contaminação e as perdas por volatilização, levando à obtenção de resultados pouco confiáveis (KRUG & ROCHA, 2016), a exemplo dos procedimentos que envolvem decomposição por combustão e digestão ácida (BAYDER *et al.*, 1997; BUNKER & CLAYTON, 1983).

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

A análise química quantitativa envolve uma sequência de etapas até a solução do problema analítico (SKOOG, HOLLER & CROUCH, 2007). Essa sequência, chamada de sequência analítica, compreende as seguintes etapas: definição do problema – informação analítica desejada, escolha do método – forma que a informação analítica será obtida, amostragem – pequena e representativa parte que será submetida a análise, pré-tratamento da amostra – conversão da amostra na forma mais adequada para análise, medida – obtenção de dados analíticos, calibração – calibração dos dados analíticos a partir de soluções de referência, avaliação – interpretação dos resultados, e ação – resposta do problema definido anteriormente. Dentre todas as operações analíticas, a etapa de pré-tratamento da amostra é a mais crítica. Em geral, esta etapa é mais passível de erros e requer a maior parte do trabalho analítico (KRUG & ROCHA, 2016).

Com os avanços das técnicas espectrométricas, a determinação de espécies químicas em níveis de mg L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ tornou-se cada vez mais comum em laboratórios de análises químicas. No entanto, para maioria das técnicas espectroanalíticas uma etapa de pré-tratamento é requerida antes da medida devido a fatores como sensibilidade instrumental ou interferências provenientes da matriz. Normalmente, mesmo as amostras mais simples não estão adequadas para análise direta, o que requer tratamento prévio, seja pelo analito estar muito diluído ou concentrado, ou por inadequação da natureza da amostra (KRUG & ROCHA, 2016).

O pré-tratamento da amostra envolve um conjunto de procedimentos necessários para converter física e quimicamente a amostra de forma a deixar os analitos suscetíveis para as determinações a fim de quantificá-los de forma precisa e exata. Esses tratamentos de conversão dependem da natureza da amostra, do elemento a ser determinado e sua concentração, e da precisão e exatidão

desejadas. Dessa forma, pode influenciar na precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão dos resultados obtidos, e o tempo total e esforço envolvidos na análise (BRANDÃO, 2011).

Para análise de alimentos, a maioria das técnicas requer que as amostras estejam na forma de soluções, o que envolve um pré-tratamento com a completa destruição da matéria orgânica (KORN *et al.*, 2008). Dentre os procedimentos utilizados para conversão química e física das amostras, o mais comum é a decomposição por via seca ou úmida. Para a primeira via, as amostras são submetidas a aquecimento por meio de um bico de gás ou em forno mufla, através de um processo denominado cinzas. Nesse processo, ocorre a queima da fração orgânica da amostra na presença de oxigênio, resultando em um resíduo inorgânico solúvel em ácido. Já na fusão, ocorre uma reação heterogênea entre fundente e o material da amostra, resultando em um mineral ou fase refratária que são facilmente dissolvidos em ácidos, bases ou até mesmo água. A temperatura conveniente para remoção da matéria orgânica compreende uma faixa de 450 a 800 °C (HOENIG, 2001; VASSILEVA *et al.*, 2001). As principais vantagens da decomposição por via seca são a simplicidade, possibilidade de analisar grandes quantidades de amostra, volume final flexível e não requer o uso de ácidos concentrados. As desvantagens incluem a perda por volatilização de alguns elementos e risco de contaminação (KORN *et al.*, 2008; MOMEN *et al.*, 2006).

Os procedimentos envolvendo a decomposição por via úmida baseiam-se no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante (HNO_3 , H_2SO_4 ou HClO_4), ou misturas de ácidos e/ou agente oxidante auxiliar (H_2O_2). Podem ser conduzidos em sistemas abertos ou fechados, com aquecimento condutivo (placa de aquecimento ou bloco digestor) ou por radiação micro-ondas, com a utilização de forno de micro-ondas com cavidade ou focalizados. A principal vantagem da decomposição por via úmida com relação a decomposição por via seca está em relação a utilização de menores temperaturas, reduzindo as perdas por volatilização (KRUG & ROCHA, 2016). Entretanto, pela demanda da presença de um ácido mineral oxidante, que dependerá da força, potencial oxidante, potencial complexante, ponto de ebulição, solubilidade dos sais resultantes e alta pureza, os riscos de contaminações são maiores, oferecendo maiores riscos de manipulação e grande quantidade de resíduos gerados. Aliado a essas limitações, pode-se citar a

limitação quanto à aplicação, tendo em vista que amostras com alto teor de gordura e proteínas podem não sofrer a digestão completa, impossibilidade de checar o processo de digestão por se tratar de sistemas fechados, altas temperaturas e pressões envolvidas e, dependendo da metodologia utilizada, pode ser dispendioso e demorado (KORN *et al.*, 2008; PAIXÃO, 2016).

Tendo em vista as desvantagens associadas a esses tipos de tratamento de amostra, tem-se desenvolvido métodos que requeiram nenhum ou o mínimo de tratamento prévio, a exemplo da análise direta de sólidos.

A análise direta de sólidos não requer dissolução das amostras, apresentando como vantagens na determinação de matrizes complexas um menor risco de contaminação, menor consumo de amostra, menor custo, maior confiabilidade dos resultados e obtenção de melhores limites de detecção (MAGALHÃES *et al.*, 1998; KRUG & ROCHA, 2016). Um exemplo da análise direta de sólidos é a amostragem em suspensão.

3.4.1 Amostragem em suspensão

A amostragem em suspensão consiste, de maneira geral, de partículas sólidas dispersas em uma fase líquida. Em uma breve comparação com os procedimentos convencionais citados anteriormente, apresenta como vantagens a simplificação no pré-tratamento da amostra, diminuindo o tempo gasto nesta etapa, consequentemente aumentando a frequência analítica; menores riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes; pouca manipulação ou exposição ao ambiente; nenhum, ou menores riscos, de perdas do analito de interesse; menor periculosidade devido a utilização de reagentes pouco tóxicos ou corrosivos e em menores concentrações; possibilidade do uso da calibração externa; minimização da geração de resíduos; possibilidade de se analisar pequena quantidade de amostra; aplicação na análise de amostras orgânicas e inorgânicas; especiação e determinação de elementos voláteis (KRUG & ROCHA, 2016; WELNA, SZYMCZYCHA-MADEJA, & POHL, 2015). Além disso, a quantidade da amostra e volume de reagentes requeridos não são fatores críticos como na digestão assistida por micro-ondas (FERREIRA *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens associadas à amostragem em suspensão, algumas desvantagens devem ser consideradas no momento da sua aplicação, a fim de serem evitadas. A dificuldade de homogeneização da suspensão, por exemplo, pode afetar a exatidão e precisão, assim como a estabilização da mesma durante toda a análise (TOKMAN, 2007). Outro problema é quanto à calibração e a dificuldade de encontrar materiais de referência certificadoS (CRM), quando não é possível a calibração com padrões aquosos. Podem ser observados altos sinais de fundo, dependendo do comprimento de onda a ser medido e das características da matriz e dificuldade de operação em equipamentos que utilizam o plasma acoplado indutivamente (ICP) devido ao tamanho da partícula (geralmente, < 5 µm). Dentre as desvantagens citadas, a mais comum, principalmente para introdução de sistemas em plasma, está a homogeneização e tamanho das partículas da suspensão, uma vez que interferem na estabilidade da suspensão e eficiência no transporte do analito. Para contornar esse problema, pode-se utilizar procedimento de moagem da amostra sólida, antes da formação da suspensão. Também, para garantir uma homogeneização satisfatória, deve-se adotar um procedimento de agitação da amostra imediatamente antes da análise, garantindo que uma alíquota representativa da solução seja introduzida no sistema de detecção (SILVA, 2006; BRANDÃO, 2011; KRUG & ROCHA, 2016).

A fim de tentar evitar as desvantagens citadas associadas à amostragem em suspensão, deve-se levar em consideração um conjunto de fatores: o meio líquido utilizado para o preparo da suspensão, o tamanho das partículas, concentração da suspensão (razão entre a massa da amostra e o volume da suspensão), homogeneização da suspensão e a adição de agentes estabilizantes (TOKMAN, 2007).

O meio líquido utilizado no preparo da suspensão deve ser escolhido de modo que funcione também como um extrator do analito. Dessa forma, a escolha do meio dependerá do analito de interesse e da matriz da amostra. O mais comum para o preparo de suspensões é o ácido nítrico, embora seja reportado na literatura o uso de peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, e ácido fluorídrico, de forma isolada ou combinações destas com o HNO₃ (FERREIRA *et al.*, 2010).

O tamanho das partículas deve ser levado em consideração, pois pode influenciar na homogeneidade e estabilidade da suspensão, bem como influenciar no transporte e atomização das espécies, em particular quando se usa as técnicas de ICP OES e F AAS com nebulizadores convencionais, que são prejudicados pelo risco de entupimento. Os nebulizadores do tipo Babington ou ranhura em V (V-Groove) são os mais populares para uso em amostragem em suspensão, já que apresentam maior tolerância aos sólidos dissolvidos (FERREIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2011). Em geral, pequenos tamanhos de partículas (< 50 µm) melhoram a precisão e exatidão. A homogeneização das suspensões pode ser obtida por agitação manual, agitação magnética, misturador por efeito vortex, borbulhamento de gás e agitação ultrassônica, ou ainda por meio do uso de agentes estabilizantes, meio líquido viscoso, conhecido também como agentes tixotrópicos, surfactantes, espessantes ou dispersantes. Esses agentes têm, geralmente, função de dispersar as partículas do material sólido e/ou evitar sedimentação de partículas no meio líquido, bem como estabilizar a suspensão, a exemplo do glicerol, viscalex e Triton X-100 (SILVA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010; BRANDÃO, 2011).

A razão entre a massa da amostra e o volume do diluente adequado deve ser considerada. De modo geral, para amostras que contém baixas concentrações do analito devem ser utilizadas suspensões concentradas a fim de obter melhores limites de detecção e quantificação (FERREIRA *et al.*, 2010).

A partição do analito é a percentagem do analito extraída disponível no meio líquido. Esse fator depende da força com que o analito está ligado a matriz, a concentração e o tipo de diluente. Altos valores de extração estão associados a baixos desvios (SILVA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010).

A amostragem em suspensão vem sendo cada vez mais utilizada pelas vantagens que oferece, sendo amplamente e com sucesso empregada na GF AAS, F AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) e espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) (AMORIM *et al.*, 2017).

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente e a espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente são excelentes fontes de vaporização, atomização, ionização e excitação de espécies

químicas. Na maioria das aplicações analíticas, a amostra é introduzida na forma de solução devido ao sistema de nebulização de líquidos. No entanto, não há nenhuma limitação que impeça o uso das técnicas envolvendo ICP para análise direta de sólidos ou suspensões. Pelo contrário, as características dessas fontes como a elevada energia do plasma, que melhora a eficiência de atomização, torna essas técnicas potencialmente atrativas para essa função (KRUG, 2006).

Uma vez que as amostras podem ser introduzidas nas formas gasosa, líquida ou sólida, a ICP OES pode ser associada à amostragem em suspensão. Entretanto, deve-se estar atento às dificuldades inerentes a essa associação. A principal dificuldade encontrada é em relação ao tamanho da partícula, que deve garantir uma nebulização eficiente para que a sensibilidade não seja prejudicada. Neste caso, a calibração deve ser realizada utilizando amostras semelhantes, tanto considerando a composição química quanto o tamanho das partículas (SILVA, BLANCO, & NÓBREGA, 2002).

Outro problema associado a análise de amostras na forma de suspensão ou com elevado teor de sólidos dissolvidos e o ICP OES é que o primeiro pode ocasionar a obstrução do sistema de nebulização e/ou danificação da tocha. O sistema de nebulização consiste em um nebulizador concêntrico acoplado a uma câmara ciclônica. Os nebulizadores concêntricos costumam apresentar boa estabilidade a longo-prazo e robustez para soluções; entretanto, devido a sua pequena abertura anular (10 - 35 μm), partículas presentes na solução podem causar obstrução do sistema, limitando seu uso para análises na forma de amostragem em suspensão.

O uso do sistema de nebulização composto por câmara Sturman-Master e nebulizador do tipo V-Groove, aumentam a eficiência de nebulização, permitindo a introdução de soluções com elevado teor de sólidos dissolvidos. Para contornar as limitações citadas, foi desenvolvido o nebulizador concêntrico OneNeb, ideal para análises rotineiras de amostras com até 25% de teor de sólidos dissolvidos, com boa precisão e melhor sensibilidade do que um nebulizador de vidro concêntrico; a construção inerte o torna adequado para a maioria dos tipos de solução, sendo um substituto direto para a maioria dos outros nebulizadores, incluindo os do tipo inerte e concêntrico de vidro convencional usados com instrumentos de ICP-OES.

Por fim, a tocha consiste em três tubos de quartzo concêntricos através dos quais passa o fluxo de gás argônio. Quando utiliza-se amostras contendo elevados teores de sólidos dissolvidos (TSD) ou suspensão, ocorre um desgaste mais acentuado da tocha em um curto período de tempo, diminuindo sua vida útil (GINÉ, 1998; JESUS, 2010).

Na Tabela 3, são apresentados trabalhos envolvendo a utilização de amostragem de suspensão em amostras de alimentos com determinação por ICP OES.

Tabela 3 - Determinação de espécies inorgânicas em amostras de alimentos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando amostragem em suspensão.

Amostra	Analitos	Preparo da suspensão	Limite de detecção, mg mL ⁻¹	Referências
Farinha de trigo e alimentos pré forno a base de farinha	Na, K, Ca, Mg, S, P, Fe, Mn, Cu e Zn	0,1 g de amostra em pó + 0,05 g de Triton X-100 (0,1% m v ⁻¹) + 6 mL de HNO ₃ (6%, v v ⁻¹) + 15–25 mL de água com sonicação por 15 min.	Na (7,51), K (61,1), Mg (0,645), Ca (1,59), P (5,25), S (4,58), Fe (1,50), Zn (1,07), Mn (0,867) e Cu (1,58)	CERNOHORSKY <i>et al.</i> , 2008.
	Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Zn, Cu e Cr, Ni, V	0,1-0,2 g de amostra + 6 mL de HNO ₃ (6%, v v ⁻¹) + 30-50 mL de água e sonicação por 15 min.	*Ca (5,13), Mg (7,93), K (2,42), P (1,85), Fe (0,0128), Zn (0,0194), Mn (0,00866), Cu (0,0130), Cr (0,00187), Ni (0,00247), V (0,00322)	KREJCĀOVA' <i>et al.</i> , 2006

Adoçante sólido	As, Ca, Cd, Cu, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se e Zn	1 g de amostra em HNO ₃ 0,3% (v v ⁻¹)	As (0,7), Ca (0,09), Cd (0,05), Cu (0,25), Co (0,07), Fe (0,07), K (2,3), Mg (0,03), Mn (0,01), Na (2,2), Ni (0,33), Pb (0,9), Se (0,7) e Zn (0,05)	SOUSA, BACCAN & CADORE, 2011
Caldo de cana	Ca, Cu, Fe, K e Mg	5,0 mL de amostra + 870 µL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) + 700 µL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹) + água para 10 mL com sonicação por 7 min e 40 s.	Ca (112,5), Cu (1164), Fe (14,56), K (611) e Mg (112,7)	SOUZA <i>et al.</i> , 2019
Fórmula infantil, leite em pó e leite líquido	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	0,25 g de leite em pó ou 2,5 g de leite líquido ou fórmula infantil + 15 mL de água (37 °C) com agitação vórtex. Depois, adição de 250 mL de solução de Triton X-100 (10%, v v ⁻¹).	-	MCKINSTRY, INDYK & KIM, 1999

Cacau e café em pó	Ag, Al, B, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Mg, Mn, Ni, Pb, Tl e Zn	Suspensão contendo Triton X-100 (0,5%, v v ⁻¹) e HNO ₃ (1%, v v ⁻¹).	Ag (0,53), Al (0,75), B (0,64), Bi (4,9), Ca (0,015), Cd (0,52), Co (0,81), Cr (0,73), Cu (0,28), Fe (0,35), Ga (3,0), In (4,5), Mg (0,033), Mn (0,12), Ni (1,8), Pb (6,1), Tl (15,5), Zn (0,56)	ANTHEMIDIS & PLIATSIKA, 2005
Fórmula infantil	Ca, P, Mg, Zn, Fe, Cu e Mn	0,40 g de amostra + 10 mL de solução contendo 250 µL de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (10%, m v ⁻¹) ou NH ₄ OH (25%, m v ⁻¹) com sonicação por 2–5 min.	**Ca (400), P (653), Mg (120), Zn (100), Fe (35), Cu (6,0), Mn (3,0)	SOLA-LARRAÑAGA & NAVARRO-BLASCO, 2009

Fígado bovino	Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	500 mg da amostra moída + HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ com sonicação por 30 min.	-	MOKGALAKA, WONDIMU & MCCRINDI, 2008
Preparações multivitamínicas/ multimineral	Ca, Mg, Mn, Fe, Cr, Al, Ag, B, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, In, Ni, Pb, Zn, As e Se	1 g + 5 mL de HNO ₃ 0,8 mol L ⁻¹ de	Ag (0,1), Al (11,0), B (0,04), Ba (0,7), Bi (23), Ca (0,3), Cd (0,3), Co (0,7), Cr (1,4), Cu (0,03), Fe (0,1), Ga (1,3), In (5,1), Mg (0,01), Mn (0,05), Ni (9,5), Pb (114), Zn (0,4), As (66), Se (151)	ZACHARIADIS, G. A., & OLYMPIOU, A. F., 2008

*mg g⁻¹; ** µg 100 g⁻¹

Através da Tabela 3 é possível observar que, de uma forma geral, as análises de amostras de alimentos por ICP OES empregando amostragem em suspensão envolvem em sua maior parte determinações multielementares. Além disso, com exceção de alguns trabalhos, percebe-se em sua maioria o emprego do HNO_3 no preparo da suspensão, que pode ser justificado pela ação de disponibilização dos analitos por meio de extração da matriz para fase aquosa, facilitando a análise por ICP OES. As exceções são os estudos desenvolvidos por Sola-Larrañaga & Navarro-Blasco (2009), cujo trabalho envolveu o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e NH_4OH , e por McKinstry e colaboradores (1999), que utilizou padrão Lu (50 ppm), para minimizar os efeitos de matriz, e solução de Triton X-100.

O uso do padrão Lu (50 ppm) foi utilizado por McKinstry e colaboradores (1999), que observaram que as amostras preparadas como suspensões e determinadas contra padrões aquosos seguindo da adição de Lu como padrão interno compensaram os potenciais efeitos da matriz. Embora a técnica de adição de padrão seja bem aceita, foi selecionado o método de padrão interno através da incorporação de Lu, que compensou as variações da matriz na eficiência do transporte e atomização entre padrões e as amostras de leite para todos os elementos do estudo. Essa abordagem eliminou a necessidade de correspondência de matriz, melhorando a exatidão e a precisão (MCKINSTRY, INDYK & KIM, 1999).

Sola-Larrañaga e colaboradores (2009) justificaram o uso de TMAH e NH_4OH , considerando sua amostra em estudo, enfatizando a dissolução adequada para amostras de leite em meio alcalino que pode evitar a precipitação de proteínas (SOLA-LARRAÑAGA & NAVARRO-BLASCO, 2009).

Dos trabalhos envolvendo HNO_3 no preparo de suspensões, alguns associaram ao uso de Triton X-100. Cernohorsky e colaboradores (2008) desenvolveram um método para determinação de Na, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, e Zn em amostras de farinha de trigo utilizando ácido nítrico 6% (v v^{-1}) e Triton X-100 0,1% (m v^{-1}). Neste estudo, o HNO_3 foi usado devido às suas propriedades oxidantes e facilitação da extração dos analitos. Porém, foi

observado que no caso de partículas menores que 10 μm , a presença de ácido nítrico apenas pareceu não ser suficiente para obter boa homogeneidade. O uso do Triton X-100 melhorou e encurtou o processo de preparação da suspensão, evitando a formação de aglomerados de amostra, o que ocorreu especialmente para farinhas na presença apenas de ácido. Uma deposição gradual da fase sólida na superfície interna da câmara de pulverização também foi reduzida (CERNOHORSKY *et al.*, 2008).

Krejčová e colaboradores (2006) testaram o uso de HNO_3 e do Triton X-100 no preparo de suspensões de multivitamínicos para análise por ICP OES. Quando se utilizou o Triton X-100, verificou-se deposição de fase sólidos na superfície interna da câmara de pulverização e um depósito visível da amostra surgiu após, aproximadamente, 2h de aspiração contínua da suspensão. Assim, uma solução de HNO_3 6% (v v⁻¹) foi utilizado devido às suas propriedades oxidantes e facilitação da extração do elemento. Foi observado que para os multivitamínicos, muitas formas químicas dos elementos analisados são solúveis em água. Na maioria dos casos, eles são dissolvidos e não são ligados a partículas sólidas. A presença de ácido nítrico mostrou-se suficiente para o preparo das suspensões associado ao uso de sonicação e, portanto, nenhum surfactante adicional foi utilizado (KREJČOVÁ *et al.*, 2006).

É perceptível também que alguns estudos envolveram uma etapa a mais no procedimento para formação da suspensão. A utilização de agitação manual ou magnética, por sonicação ou *vortex* associadas ao preparo de suspensão garantem uma homogeneização ao sistema. Existem diversas alternativas relatadas para a homogeneização da suspensão, com vantagens e limitações. O procedimento mais simples e econômico é a agitação manual, que foi usado, por exemplo, na preparação de suspensões de adoçantes sólidos com solução de HNO_3 , que foram analisadas imediatamente após a agitação manual (SOUSA, BACCAN & CADORE, 2011). Contudo, esse método tem se mostrado eficiente apenas para materiais de baixa densidade e/ou na presença de um agente estabilizador (FERREIRA *et al.*, 2010).

Outra forma de agitação utilizada, encontrada na maioria dos estudos mostrados na Tabela 3, é a agitação mecânica, empregando agitação

magnética ou *vortex*. Essa forma de agitação é adequada para grandes volumes de suspensão e apresenta operação instrumental fácil (ZACHARIADIS & OLYMPIOU, 2008; MCKINSTRY, INDYK & KIM, 1999).

A aplicação da ultrassonicação também tem sido usado no preparo de emulsões para melhorar a homogeneização e extração do analito (Ferreira *et al.*, 2010). O ultrassom foi utilizado, por exemplo, no preparo de emulsão de amostras de fígado bovino para determinação de Cu, Fe, Mg, Mn, e Zn utilizando apenas como meio diluente HNO_3 2,0 mol L^{-1} (MOKGALAKA, WONDIMU & MCCRINDI, 2008). Sola-Larrañaga & Navarro-Blasco (2009) também utilizaram banho ultrassônico para garantir a ausência de aglomerados e para acelerar o processo de solubilização no preparo de emulsões e reduzir o tempo necessário para a solubilização alcalina. Cernohorsky e colaboradores (2008) desenvolveram um método para determinação de Na, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, e Zn em amostras de farinha de trigo utilizando também o banho ultrassônico para homogeneização da suspensão (CERNOHORSKY *et al.*, 2008).

Outro fator bastante discutido nos trabalhos citados está relacionado a concentração da suspensão, que é um fator a ser considerado para obter uma boa dispersão e está relacionado a massa da amostra sólida e o volume de diluente empregado, que devem ser selecionados levando em consideração a homogeneidade da amostra e o nível de concentração do analito na amostra. Para amostras que contêm altas concentrações de elementos, essa relação pode ser ajustada para suspensões mais diluídas, observando as perdas que podem ocorrer nas propriedades analíticas (precisão e sensibilidade, por exemplo), já que suspensões muito diluídas ocasionam menor número de partículas presentes na suspensão (FERREIRA *et al.*, 2010; BRANDÃO, 2011).

Zachariadis e colaboradores (2008) observaram uma influência da concentração da suspensão na intensidade do sinal. Foram testadas diferentes concentrações: 1, 5, 10 e 20% (m v^{-1}). Durante o estudo, a potência de RF e o fluxo de amostra foram ajustadas para 1500 W e 3 mL min^{-1} , respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, as intensidades de emissão para elementos como Mg, Mn, Zn, Ca e Cu, que estão, normalmente, presentes no

tipo de amostra estudado (multivitamínicos), foram maiores, quando se aumentou a concentração da suspensão. Por outro lado, para vários elementos adicionados que, normalmente, não preexistiam nas amostras (por exemplo, Bi, Pb, Ag), as intensidades foram diminuídas com o aumento da concentração da suspensão. Assim, concluíram que para grandes quantidades de massa orgânica, a capacidade de atomização do plasma é deteriorada, e uma concentração de suspensão de 5% (m v^{-1}) foi escolhida para todos os analitos estudados (ZACHARIADIS & OLYMPIOU, 2008).

Através de levantamento bibliográfico não foram encontrados estudos envolvendo o uso de solução nutricional enteral associado ao preparo de suspensões e posterior análise por ICP OES para extração dos metais avaliados neste trabalho. Diante da necessidade de dispor de métodos alternativos que possibilitem a determinação de elementos traço em amostras de solução nutricional enteral, este trabalho propõe a utilização da amostragem em suspensão, como procedimento simples e rápido, como alternativa para determinação multielementar por ICP OES.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS, REAGENTES, SOLUÇÕES

Para o preparo das soluções, foi utilizada água ultrapura, com resistividade específica menor que 18,2 M Ω cm, obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct- Q3 UV, Millipore SAS, Molsheim, França).

Os seguintes reagentes foram testados para o preparo das suspensões:

- Ácido nítrico 65% (m m⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Triton X-100 100% (v v⁻¹) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Álcool etílico absoluto 99,8% (v v⁻¹) (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil);

As soluções de trabalho dos analitos foram preparadas por diluição de soluções de referência 1000 mg L⁻¹ de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P e Zn (SpecSol, São Paulo, Brasil).

A solução estoque multielementar de Cr, Cu, Fe e Zn 10 mg L⁻¹ e solução estoque multielementar de Ca, K, Mg, Na e P 100 mg L⁻¹ foram preparadas a partir de soluções de referência de 1000 mg L⁻¹ (SpecSol, São Paulo, Brasil) por diluição com ácido nítrico 10% (v v⁻¹).

HNO₃ destilado (65% v v⁻¹ – Merck, Darmstadt, Alemanha) e H₂O₂ (30% v v⁻¹ - Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) foram utilizados na etapa de digestão das amostras por forno de micro-ondas fechado.

Todos os materiais utilizados no preparo das soluções foram previamente descontaminados em banho contendo solução de ácido HNO₃ 10 % (v v⁻¹), por no mínimo 24 h e, em seguida, lavadas com água desionizada e secos em temperatura ambiente antes de sua utilização.

Para o preparo das amostras foram utilizados tubos com tampa de rosca, 114x28 mm, de base cônica feito de material polipropileno, de 15 mL e 50 mL (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemanha). As amostras depois de preparadas foram mantidas na geladeira até o momento de análise.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as pesagens foram realizadas utilizando uma balança analítica (Modelo TE 214S, Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) com precisão de $\pm 0,1$ mg.

O equipamento utilizado para a determinação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P e Zn foi um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) simultâneo com visão axial (Vista Pro Varian, Mulgrave, Austrália), o qual possui um dispositivo de carga acoplado (CCD). O nebulizador utilizado foi do tipo nebulizador OneNeb (Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos) associado à câmara de nebulização ciclônica. Foi utilizado gás argônio com uma pureza de 99,998% (White Martins, São Paulo) e o instrumento foi operado de acordo com a Tabela 4.

O equipamento foi operado com a potência em valor igual a 1,3 W e vazão em 240 kPa (35 psi). Antes de cada análise das amostras no ICP OES, foram feitos ajustes de alinhamento horizontal e vertical da tocha com uma solução de manganês $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e calibrando o sistema óptico do ICP OES com solução de referência multielementar. Para aquisição dos dados foi utilizado o software operacional ICP EXPERT (Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos).

As três principais linhas espectrais de cada elemento foram selecionadas durante análise, e foi escolhida para tratamento dos dados aquela que apresentou maior intensidade dos sinais de emissão dos analitos, as quais estão definidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais do ICP OES empregados neste trabalho.

Parâmetros	Características	ICP OES Varian Vista PRO
Sistema óptico	Policromador	Grade de difração Echelle e prisma de dispersão de CaF ₂
	Densidade da grade de difração (linhas nm ⁻¹)	95
	Faixa de comprimento de onda, nm	167-785
	Distância focal, nm	400
	Fenda de entrada, nm	Altura = 0,029; Largura = 0,051
Sistema de Introdução de amostras	Câmara de nebulização	Ciclônica
	Nebulizador	OneNeb
	Potência de medida, W	1300
	Tempo de integração do sinal, s	2,0
	Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1,5
Operacionais	Vazão do gás do plasma, L min ⁻¹	15
	Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	0,80
	Vazão de bombeamento da amostra, L min ⁻¹	0,70
	Tempo de estabilização, s	15
	Tempo total da medida, min	1
	Linhas espectrais, nm	Na (588.995), Cr (267.716), Ca (393.366), Mg (279.553), K (769.897), Cu (324.754), Fe (238.204), P (177.434), Zn (213.857)

As amostras foram digeridas em um forno de micro-ondas (MW Reaction System, Multiwave 5000 PRO, Rotor 8 NXF/NXQ, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com 8 vasos feitos de politetrafluoretileno (PTFE) para comparação dos resultados obtidos com o procedimento de amostragem em suspensão proposto.

4.3 AMOSTRAS

As formulações nutricionais enterais foram adquiridas na cidade de Salvador - Bahia, no período de fevereiro de 2017 a dezembro de 2018, sendo uma por meio de doação, e as demais adquiridas em lojas especializadas dos respectivos fornecedores. As amostras depois de abertas foram armazenadas em geladeira, conforme orientação do fabricante, e se apresentavam em sistemas fechado ou sistema aberto com líquida semipronto para uso. Na Tabela 5, podem ser visualizadas as amostras classificadas em grupos de acordo com a marca, indicação nutricional de uso e tipo de embalagem.

Tabela 5 - Amostras de solução nutricional enteral utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho.

AMOSTRA	INDICAÇÃO	EMBALAGEM
FNE1	Geral	Sistema Fechado Easy Bag 1500 mL
FNE2	Distúrbios disabsortivos (Pancreatite, Síndrome de Intestino Curto, Doença de Crohn, Síndrome de Má Absorção e Fístulas)	Sistema Fechado Easy Bag 500mL
NNE3	Geral	Tetra Pak 1000 mL
DNE1	Geral	Tetra Pak 1000 mL

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Preparo das suspensões

Uma massa de aproximadamente 0,200 g da fórmula nutricional enteral foi diretamente pesada em tubos do tipo Falcon de 50 mL, seguido de posterior adição do agente estabilizante e diluição com água para um volume final de 20 mL. Em seguida, os frascos contendo as suspensões foram agitados manualmente por 1 min e, diretamente, aspiradas para determinação por ICP OES.

4.4.2 Planejamento experimental 2³

Os níveis selecionados para os fatores estão definidos na Tabela 6 e a matriz do planejamento fatorial (2³) é apresentada na Tabela 7. Na matriz do planejamento, as colunas indicam os fatores investigados e as linhas representam os níveis codificados nos valores mínimo, máximo e o ponto central. As réplicas no ponto central foram realizadas para validar o modelo por meio da estimativa da variância experimental. As variáveis independentes foram as concentrações dos agentes estabilizantes em estudo (HNO₃, etanol e Triton X-100) e a variável dependente estabelecida foi a intensidade dos sinais obtidos (intensidade, cps), utilizando resposta múltipla. Os dados experimentais foram tratados no programa Statistica 6.0, em um nível de confiança de 95 %.

Tabela 6 - Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial 2³.

Variável	Valor mínimo (-)	Valor máximo (+)	Ponto central
Concentração de etanol, % (v v ⁻¹)	0	6	3
Concentração de HNO ₃ , % (v v ⁻¹)	0	10	5
Concetração de Triton X-100, % (v v ⁻¹)	0	0,5	0,25

Tabela 7 - Matriz experimental do planejamento fatorial (2³).

Experimento	Concentração de HNO₃, %	Concentração de etanol, %	Concentração de Triton X-100, %
1	10 (+1)	6 (+1)	0,5 (+1)
2	10 (+1)	0 (-1)	0,5 (+1)
3	10 (+1)	6 (+1)	0 (-1)
4	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)
5	0 (-1)	6 (+1)	0,5 (+1)
6	0 (-1)	0 (-1)	0,5 (+1)
7	0 (-1)	6 (+1)	0 (-1)
8	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
9	5 (PC)	3 (PC)	0,25 (PC)
10	5 (PC)	3 (PC)	0,25 (PC)
11	5 (PC)	3 (PC)	0,25 (PC)

PC: ponto central.

Os experimentos foram realizados por delineamento aleatorizado, tanto na sua preparação quanto no momento da medição, uma vez que a metodologia estatística exige que os experimentos da matriz sejam realizados dessa forma a fim de se obter um caráter aleatório dos erros experimentais não controláveis nas respostas analisadas.

Como neste estudo um número grande de elementos foi avaliado através do planejamento, foram geradas respostas diferentes, o que dificulta a análise individual. Assim, para análise dos dados foi realizado uma resposta múltipla, obtida a partir da normalização das respostas individuais. Para a normalização, os valores das intensidades foram somados e, posteriormente, divididos pelo maior valor encontrado entre eles.

4.4.3 Curvas analíticas

Foram preparadas curvas analíticas utilizando soluções de referência aquosas para calibração externa. As soluções de referência foram preparadas a partir de diluições adequadas de uma solução estoque multielementar de Cr,

Cu, Fe e Zn 10 mg L^{-1} e solução estoque multielementar de Ca, K, Mg, Na e P 100 mg L^{-1} com uma solução de HNO_3 10% ($v v^{-1}$) para volume final de 10 mL, resultando em soluções com concentrações finais na faixa de 0 a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Cr, Cu, Fe e Zn, e em concentrações finais na faixa de 0 a $175,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Ca, K, Mg, Na e P. Curvas de calibração com adição do analito foram obtidas adicionando alíquotas das soluções de referência dos analitos nas amostras de formulações nutricionais enterais na mesma faixa de concentração.

4.4.4 Procedimento para digestão das amostras por forno de micro-ondas

Para a digestão das amostras de formulações nutricionais enterais, utilizou-se o método proposto por Macarovscha (2011), com modificações. Foram adicionados em tubo de teflon, 1,0 mL de cada amostra de formulação nutricional enteral, seguidos da adição de 6,0 mL de HNO_3 50% ($v v^{-1}$) e 2,0 mL de H_2O_2 30% ($v v^{-1}$). Os tubos foram devidamente fechados e submetidos ao aquecimento no forno de micro-ondas com cavidade seguindo o programa de aquecimento apresentado na Tabela 8. Ao final da digestão as amostras foram diluídas para 20,0 mL. As amostras foram analisadas em triplicata por ICP OES.

Tabela 8 - Rampa de aquecimento para digestão das amostras de formulação nutricional enteral no forno de micro-ondas.

ETAPA	Tempo, min	Potência, W	Temperatura, C°	Pressão, bar
1	5	até 800	-	-
2	10	800	-	-
3	5	até 1200	-	-
4	10	1200	280	80
Resfriamento	-	-	55	-

4.4.5 Otimização

Após otimização das condições experimentais para o preparo das suspensões, as mesmas foram preparadas utilizando um volume de amostra de 2,0 mL com uma solução de ácido nítrico com concentração final de 10% (v v⁻¹) para um volume final de 10 mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o preparo de suspensão visando uma amostragem direta é necessário avaliar qual o melhor meio a ser utilizado no seu preparo, e o melhor agente estabilizante.

A partir do levantamento feito na literatura e com base nos trabalhos apresentados na Tabela 3, foram selecionados três agentes para o preparo de suspensão de amostras de alimentos (HNO_3 , etanol e Triton X-100) e realizou-se um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com o objetivo de identificar os agentes que mais influenciam na resposta analítica e os efeitos de suas interações. Nos trabalhos anteriormente já citados, Krejčová e colaboradores (2006), McKinstry e colaboradores (1999) e Sola-Larrañaga & Navarro-Blasco (2009) utilizaram, respectivamente, 0,1-0,2 g de multivitamínicos, 0,25 g de fórmula infantil e leite em pó, e 0,4 g de fórmula infantil (SOLA-LARRAÑAGA & NAVARRO-BLASCO, 2009; KREJČOVÁ *et al.*, 2006; MCKINSTRY, INDYK & KIM, 1999). Uma vez que esses trabalhos apresentam similaridades com a amostra estudada no presente trabalho – formulação nutricional enteral – e um dos objetivos do trabalho foi minimizar os gastos com reagentes utilizados, estabeleceu-se, inicialmente, 0,2 g da fórmula nutricional enteral para o preparo das suspensões. Assim, para o planejamento fatorial, pesou-se, aproximadamente, 0,2 g da amostra em análise em tubos do tipo Falcon, seguido de posterior adição do(s) agente(s) estabilizante(s) com posterior diluição para um volume final de 20 mL com água. O volume final também foi selecionado com base nos trabalhos anteriormente já citados (KREJČOVÁ *et al.*, 2006; MCKINSTRY, INDYK & KIM, 1999). Os frascos foram agitados, manualmente, por 1 min, logo após a diluição e também instantes antes de cada análise no ICP OES.

Os níveis do planejamento foram selecionados a partir do levantamento da literatura, que demonstraram baixas concentrações quanto ao uso do Triton X-100 para o preparo de suspensões – 0,1% no trabalho desenvolvido por Cernohorsky e colaboradores (2008), 0,5% por Anthemidis e colaboradores (2005), e 1,0% por Baysal e colaboradores (2008).

Em relação à concentração do ácido nítrico, tomou-se como base a faixa típica de 10% (v v⁻¹), mesma faixa reportada na literatura, a exemplo dos trabalhos desenvolvidos por Cernohorsky e colaboradores (2008) e Krejčová e colaboradores (2006) (ANTHEMIDIS & PLIATSIKA, 2005; CERNOHORSKY *et al.*, 2008; KREJČOVÁ *et al.*, 2006).

Já para o etanol, definiu-se concentrações próxima de 6% (v v⁻¹), visando a manutenção e preservação da tocha do ICP OES e relatos prévios da literatura, a exemplo de Viñas e colaboradores (1994), que utilizaram um meio contendo 8% (v v⁻¹) e 20% (v v⁻¹) de etanol como agente estabilizador em trabalhos realizados com amostras de alimentos (VIÑAS *et al.*, 1994^a; VIÑAS *et al.*, 1994^b). Além disso, McCrindle e Rademeyer (1996) estudaram o efeito da concentração de etanol, quando adicionado a soluções aquosas ou orgânicas, na temperatura de excitação de um espectrômetro de plasma acoplado indutivamente determinado pela emissão do sinal de hidrogênio. O estudo desenvolvido permitiu concluir que o aumento da concentração de etanol resultou no aumento da concentração de hidrogênio no plasma, aumentando a densidade de elétrons. Esse aumento levou a uma sensibilidade aprimorada parcial da análise, até que a massa de material que entra no plasma (aerossol) tornou-se tão grande que uma diminuição da temperatura foi obtida (MCCRINDLE & RADEMEYER, 1996).

Em um trabalho publicado anteriormente McCrindle e Rademeyer (1995) já haviam estudado o efeito de uma solução de amostra carregada de etanol quando aspirado por um espectrômetro de plasma acoplado indutivamente. Verificaram que, se a concentração de etanol for aumentada, a temperatura de excitação também aumenta, atingindo um máximo em 15% (v v⁻¹) de etanol, quando o plasma é extinto. A sensibilidade na determinação de todos os elementos também aumentou com o aumento do etanol para um máximo de 15% (v v⁻¹). Além disso, para que seja possível analisar amostras contendo altos teores de etanol por ICP OES é necessário fazer alteração na vazão e taxas de fluxo do gás, o que seria uma etapa adicional ao desenvolvimento do método. Dessa forma, para este trabalho, optou-se por trabalhar com uma

concentração máxima de 6% (v v⁻¹) de etanol (MCCRINDLE & RADEMEYER, 1995).

Como neste estudo um número grande de elementos foi avaliado através do planejamento, foram geradas muitas respostas diferentes, dificultando uma análise individual. Assim, para análise dos dados foi realizado uma resposta múltipla (RM), obtida a partir da normalização das respostas individuais.

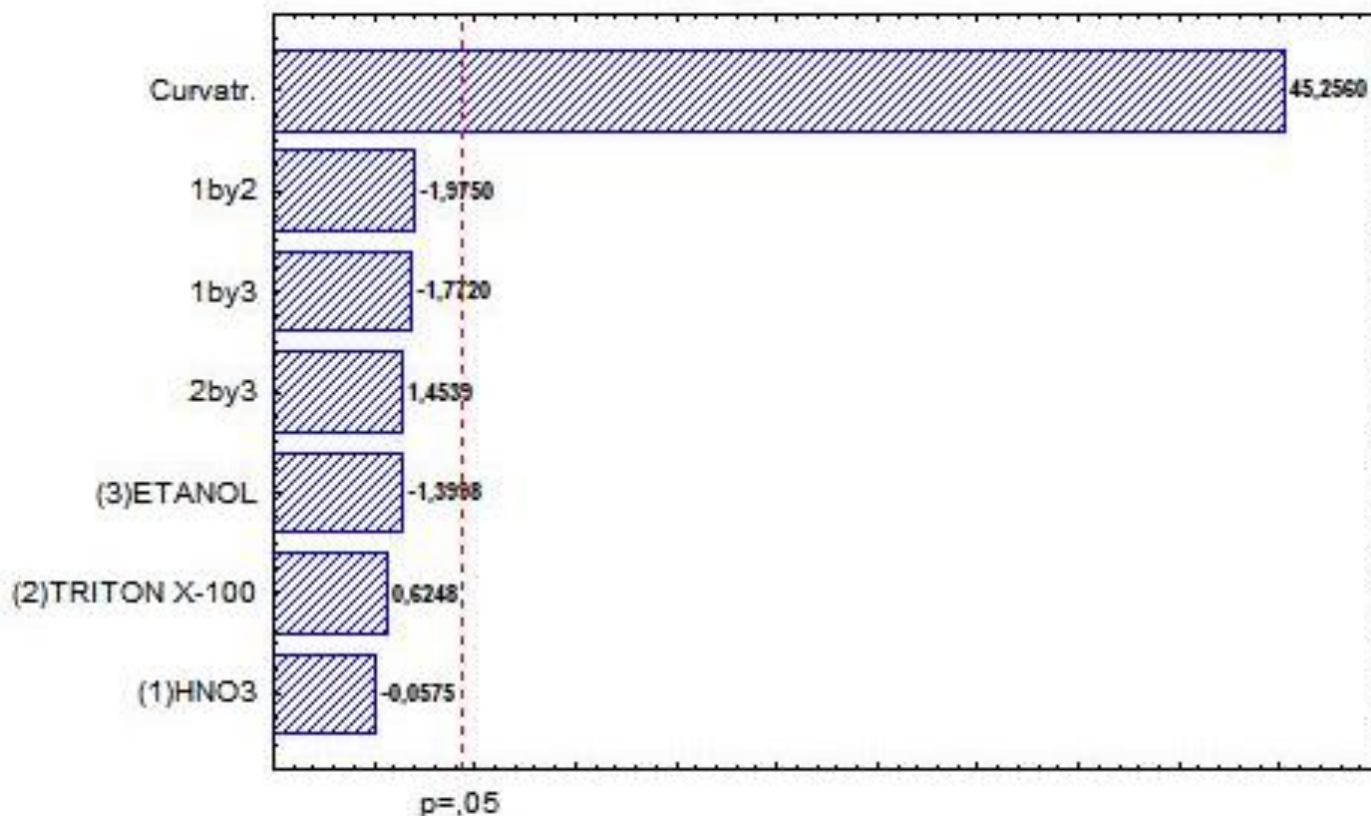
A equação para se obter a resposta múltipla é calculada com a seguinte fórmula:

$$RM = \frac{Rx1}{LSx1} + \frac{Rx2}{LSx2} + \dots + \frac{Rxn}{LSxn} \quad (\text{equação 1})$$

sendo Rx1 a resposta analítica de um elemento em um experimento específico e LSx1 a maior resposta em um conjunto de experimentos para esse elemento (PORTUGAL *et al.*, 2007). Dessa forma, com a normalização, foram obtidos valores compreendidos entre 0 e 1.

Os resultados obtidos foram tratados usando o software estatístico Statistica 6.0. Os resultados estão apresentados como gráfico de Pareto, mostrado na Figura 4. No domínio experimental estudado, as variáveis investigadas não foram significativas ($p > 0,05$) na determinação de nenhum dos analitos: Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas na etapa de definição do melhor agente estabilizante no preparo da suspensão.



Efeito estimado (valor absoluto)

Fonte: elaboração própria.

Os efeitos foram verificados utilizando-se os valores p para um nível de confiança de 95%. As variáveis observadas no planejamento fatorial que apresentam efeito significativo para o domínio experimental estudado apresentam ($p < 0,05$), que pode ser observado pela linha tracejada. No diagrama de Pareto, o valor positivo apresentado pelos efeitos indica que quando se passa do nível mínimo ao nível máximo da variável, o valor da resposta analítica aumenta. Quando se tem um efeito com valor negativo, esse indica que ao passar de um nível mínimo para um nível máximo da variável o valor da resposta diminui.

Analisando o gráfico de Pareto para a resposta múltipla, observou-se que para as variáveis analisadas nenhuma apresentou-se como o fator significativo no sistema para o nível de confiança utilizado. O etanol apresentou efeito negativo sobre o sistema, indicando que os valores codificados como negativos tendem a promover uma diminuição da intensidade do sinal dos analitos, porém não significativamente para o intervalo escolhido.

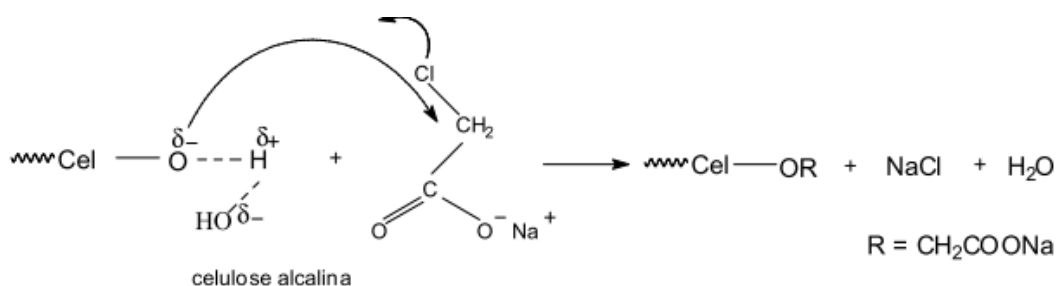
A curvatura foi o efeito estimado apresentado como significativo para o sistema em estudo. A curvatura no modelo estudado é testada com adição de pontos centrais, valores codificados como (PC) na Tabela 7. Uma curvatura significativa indica que os dados são melhor ajustados por um modelo não linear e o elevado valor apresentado do efeito comprova esse ajuste insuficiente. Por se apresentar como efeito positivo, existe uma condição de resposta mínima na região do ponto central (WORSFOLD *et al.*, 2019). Esses resultados indicaram que um modelo quadrático deveria ser proposto. Contudo, como nenhuma das variáveis estudadas foram significativas para o sistema, não foi necessário partir para um estudo considerando um modelo com efeitos quadráticos ou de segunda ordem.

Uma hipótese para o fato de que nenhum dos agentes se apresentou como fator significativo no sistema, nas concentrações estudadas e no nível de confiança utilizado, pode ser atribuído pela presença prévia de estabilizantes de emulsões alimentícias nas amostras de formulação nutricional enteral, como a carboximetilcelulose e a celulose microcristalina. Estes estabilizantes agem como suspensor de partículas, prevenindo e prolongando a decantação, e minimizando a percepção da arenosidade proporcionada pelas proteínas, bem como prevenindo a separação de fases e a sedimentação (FERREIRA *et al.*, 2017). Esses estabilizantes são necessários para o propósito nutricional da formulação, garantindo homogeneidade ao longo de todo processo de alimentação do paciente.

A carboximetilcelulose (CMC) e a celulose microcristalina (MCC) são derivados da celulose, como pode ser visto na figura 5, um polímero natural de origem vegetal abundante, apresentando como vantagens a solubilidade em água e solventes orgânicos. Por causa dessas características, são comumente

utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Além disso, possuem ausência de toxicidade, alta absorção, hidro retenção e excelente compressibilidade a baixas pressões. No caso da MCC, devido ao movimento de Brown que as partículas primárias apresentam, as cargas elétricas presentes causam o afastamento delas, formando uma estrutura de rede tridimensional que pode suspender as finas partículas sólidas, formando suspensões estáveis sem sinérese ou sedimentação (AHMADI, MADADLOU, & SABOURI, 2015; MONDAL *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017).

Figura 5 - Representação esquemática da reação que leva à CMC.



Fonte: CERRUTTI M. B.; FROLLINI E. Carboximetilcelulose Como Agente De Estabilização De Suspensões Cerâmicas. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polimeros, v.10, 2009.

Dessa forma, verificou-se que o uso de agentes como triton X-100 e etanol, estudados com a finalidade de dispersar aglomerados e/ou prevenir a sedimentação de partículas e formação de espumas, podem não ter se apresentado como variáveis significativas para o sistema devido à presença dos estabilizantes no tipo de amostra estudado.

Apesar do resultado demonstrado pelo planejamento fatorial 2^3 estudado, decidiu-se seguir o trabalho preparando as suspensões em meio ácido, uma vez que é demonstrado na literatura que o uso de ácidos diluídos é capaz de dissolver amostras inorgânicas sem maiores inconveniências, uma vez que apresenta forte tendência a oxidar a maioria dos metais e formar nitratos de metais solúveis em água, facilitando a disponibilização das espécies inorgânicas no meio (KRUG & ROCHA, 2016). Assim, para os testes seguintes

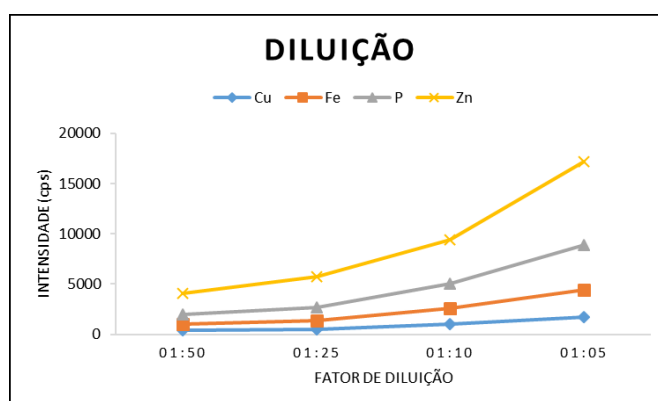
foi fixado o uso de HNO_3 10% ($v v^{-1}$) como meio líquido para o sistema, uma vez que este desempenha a função de garantir a disponibilização dos analitos da matriz, podendo contribuir numa maior precisão e exatidão.

5.1 AVALIAÇÃO DO FATOR DE DILUIÇÃO

Foi realizada uma avaliação do fator de diluição, acompanhando o sinal dos analitos sem que houvesse entupimento do sistema, nem a extinção do plasma. Foram estudados quatro fatores de diluição amostra:dilúente ($v v^{-1}$), sendo eles 1:50, 1:25, 1:10 e 1:5. A análise foi feita utilizando-se uma potência do ICP em 1.4 W e vazão de nebulização de 240 kPa. Os resultados foram analisados observando a intensidade dos sinais obtidos para cada analito estudado. A partir deles foi possível concluir que a melhor condição para o uso da suspensão, ou seja, aquela que apresentou maiores intensidades dos sinais analíticos obtidos, foi com o uso de diluição 1:5, como pode ser observado na Figura 6 para Cu, Fe, P e Zn. Não foi possível avaliar o uso de menores fatores de diluição, uma vez que observou a possibilidade de entupimento do sistema de nebulização do ICP OES associado a amostragem em suspensão.

O menor fator de diluição possível ficou atrelado a uma melhor sensibilidade. Assim, os testes seguintes foram realizados com volume de amostra de 2,0 mL e volume final de solução de 10,0 mL a fim de manter uma diluição de 1:5.

Figura 6 – Gráfico da intensidade (cps) x fator de diluição para Cu, Fe, P e Zn.



Fonte: elaboração própria.

5.2 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO

Definido o melhor fator de diluição para o preparo da suspensão, foi feito um estudo para verificar se o sinal analítico permanecia estável ao longo do tempo. Para isso, foram realizadas medições em um mesmo dia, de uma mesma amostra, em tempos diferentes, pelo mesmo analista, sob as mesmas condições e um mesmo equipamento. O resultado, analisando a intensidade dos sinais analíticos obtidos para cada elemento estudado, permitiu concluir uma boa estabilidade da emulsão, bem como dos sinais analíticos. Foram feitas medições em 5, 10, 20 e 30 min. Para o elemento Cu a variância do sinal foi de 1,12, enquanto para o P a variância foi ainda menor, de 1,03.

5.3 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ

O estudo do efeito de matriz foi necessário devido à complexidade da amostra. O objetivo desse estudo foi avaliar possíveis interferências causadas pelos componentes que compõem a matriz da amostra, gerando maiores sinais de fundo, diminuição ou ampliação do sinal analítico e comprometendo o resultado final (INMETRO, 2016).

Dessa forma, foram construídas curvas analíticas empregando a calibração externa em meio HNO_3 10% ($v v^{-1}$), e calibração por adição dos analitos na presença de amostra preparada na forma da suspensão proposta no presente trabalho.

As equações, referentes as curvas analíticas, obtidas através da técnica de adição de analito e da calibração externa são apresentadas na Tabela 9. Observou-se que razão entre os coeficientes angulares da curva preparada na presença da amostra e da curva preparada em meio aquoso variaram de 0,13 a 0,96 para o P e Cu, respectivamente. Com exceção do Cu, cujos experimentos se verificou que a razão entre os coeficientes ficou próxima a unidade, pode-se inferir a presença da interferência de matriz para a determinação dos elementos analisados em amostras alimentícias de nutrição enteral empregando amostragem em suspensão e posterior análise por ICP

OES. Dessa forma, a calibração empregando a calibração por adição de analito foi utilizado.

Tabela 9 - Equações das curvas de calibração obtidas para determinação de Cu, Fe, Zn, K e P por ICP OES.

Tipo de calibração	Analito				
	K	Zn	Cu	Fe	P
Externa	$I = 135712x + 37548$	$I = 82291x + 693,83$	$I = 239892x + 1848,4$	$I = 76166x + 1213,5$	$I = 190,08x + 317,29$
	$R^2 = 0,9993$	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9984$
Adição de analito	$I = 388811x + 15759016$	$I = 212628x + 45964$	$I = 251048x + 16875$	$I = 192530x + 49084$	$I = 1406,1x + 14626$
	$R^2 = 0,9988$	$R^2 = 0,9993$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9994$	$R^2 = 0,9991$

I: Intensidade, cps; C: concentração, mg L⁻¹; R²: coeficiente de determinação.

Sempre que o analito é parcial ou completamente extraído para fase líquida da suspensão, a calibração aquosa conduz a bons resultados, pois o analito tende a mostrar comportamentos semelhantes na amostra e no padrão, apresentando vantagens como simplicidade, baixo custo e redução do tempo de análise, já que é possível empregar uma única curva analítica para a análise de muitas amostras. Por outro lado, a calibração por adição de analito é considerada uma estratégia mais laboriosa e demorada dentre as técnicas de calibração, já que uma curva de calibração deve ser obtida para cada amostra analisada. Entretanto, o uso a calibração por adição de analito permite contornar problemas relacionados às interferências de matriz, sendo sua aplicação, muitas vezes, inevitável (CAL-PRIETO *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010).

Zachariadis e Olympiou (2008) usaram a técnica de amostragem em suspensão e notaram que, para vários analitos, as sensibilidades obtidas eram um pouco diferentes das usadas no procedimento de digestão das amostras evidenciando o efeito de matriz. Segundo os autores, a calibração seguindo o procedimento de adição de analito é fortemente recomendado para essas

matrizes para garantir resultados reproduzíveis e precisos (ZACHARIADIS & OLYMPIOU, 2008).

Matusiewicz e Golik (2004) desenvolveram um método utilizando a técnica de amostragem em suspensão e ICP OES para a determinação de macro e microelementos em materiais de referência, sendo eles TORT-1 (hepatopâncreas de lagosta); SRM 1577 (fígado bovino) e IAEA-153 (Leite em pó). As concentrações das suspensões eram preparadas em concentrações até 1% (m v⁻¹) (partículas <20 µm), preparadas em meio contendo 10% de HNO₃ e 0,01% de Triton X-100, usando calibração pelo método de adição de analito (MATUSIEWITZ & GOLIK, 2004).

Krejčová, Kahoun, Cernohorsky e Pouzar (2006) utilizaram uma técnica de amostragem em suspensão para análise elementar de preparações multivitamínicas usando ICP OES. Para comparação dos resultados, as amostras foram mineralizadas. Utilizou-se a concentração da suspensão de 0,1 - 0,2% (m v⁻¹) em 6% (v v⁻¹) de HNO₃. A calibração externa com solução aquosa, padrões de suspensão e adição de analito foram testadas. Embora o ácido nítrico usado na preparação da suspensão facilite a extração dos analitos e algumas formas químicas sejam facilmente solúveis, uma parte significativa dos elementos analisados é ligada a partículas sólidas e não é dissolvida. Como a simples calibração aquosa não oferecia garantia adequada para essa análise, foram utilizadas a calibração padrão da suspensão e a adição de analito para determinação de Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni e V (KREJČOVÁ *et al.*, 2006).

Através dos estudos do efeito de matriz e das equações da curva e R², foi possível observar que o sistema não respondeu de maneira linear para Ca, Cr, Mg e Na. Esse estudo foi feito através da medição da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários e a relação linear entre “x” e “y” pela equação da reta que relaciona as duas variáveis. Por sua vez, a correlação representada pelo modelo matemático pode ser interpretada pelo coeficiente de Pearson – ‘r’ ou pelo quadrado deste coeficiente, chamado de coeficiente de determinação ou R². Quanto mais próximo o valor de R² for de 1, mais explicativo e ajustado é o modelo linear. Portanto, para Ca, Cr, Mg e Na o

valor de R^2 não foi satisfatório, ou seja, na faixa de trabalho estudada o método não foi capaz de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito (INMETRO, 2007; CARDOSO *et al.*, 2010). Seria necessário avaliar condições como pH do meio, homogeneização da suspensão e volume da amostra de forma unielementar, ou mesmo alterar a faixa de trabalho para cada um dos analitos a fim de melhorar a linearidade da curva analítica. Optou-se então, por seguir a validação utilizando como apenas Cu, Fe, Zn, K e P, uma vez que esses apresentaram curvas analíticas com boa linearidade.

Baseado nos resultados obtidos, o procedimento recomendado para determinação dos analitos foi fixado em 2,0 mL de amostra de formulação nutricional enteral, 10% de HNO_3 (v v⁻¹) para um volume final de suspensão de 10 mL.

5.4 FIGURAS DE MÉRITO E APLICAÇÃO

O método proposto foi validado através da obtenção das características de desempenho típicas: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, precisão e exatidão.

Quando são realizadas medidas em amostras utilizando métodos para análise de traços é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. O LD representa a menor concentração que determinado analito proporciona sinal instrumental utilizando um determinado procedimento experimental, ou seja, menor concentração de analito detectável, mas não necessariamente quantificável, com determinada certeza estatística (INMETRO, 2016).

Frequentemente, métodos que envolvem a análise de traços definem o LD em termos do desvio-padrão de medidas do branco, sendo o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito. Contudo, essa técnica não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise, visto que há o sinal equivalente à intensidade de emissão do fundo na linha medida, para o cálculo de LD em sistemas de ICP OES. Desse modo, o LD pode ser medido a partir do BEC (do inglês

background equivalent concentration) parâmetro que possibilita visualizar, principalmente para meios complexos, qualquer mudança no espectro de fundo devido a alterações nas condições operacionais em comparação ao LD calculado a partir do desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Já o LQ é definido como a menor concentração do analito em exame que pode ser medida com certo grau de confiança, com exatidão e precisão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental. Na determinação do LQ deve haver um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2003).

Neste trabalho, o LD e o LQ foram calculados usando a concentração equivalente de fundo, que corresponde à quantificação, em unidades de concentração, do elemento da intensidade de emissão correspondente ao fundo naquela linha espectral que se deseja usar. As equações 2 e 3 abaixo, utilizando a razão sinal analítico/sinal de fundo (SBR, do inglês *signal-to-background ratio*) e a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) foram utilizadas para calcular o LD e o LQ de cada elemento (equações 4 e 5) (SANTANA *et al.*, 2020).

$$SBR = \frac{(I_{\text{analítico}} - I_{\text{branco}})}{I_{\text{branco}}} \quad (\text{equação 2})$$

$$BEC = \frac{C_{\text{analito}}}{SBR} \quad (\text{equação 3})$$

$$LD = 3 \times RSD \times BEC \quad (\text{equação 4})$$

$$LQ = 10 \times RSD \times BEC \quad (\text{equação 5})$$

onde:

I_{branco} – intensidade do branco;

$I_{\text{analítico}}$ – intensidade do analítico;

SBR – razão sinal analítico/sinal de fundo;

C_{analito} – concentração do analito;

RSD_{branco} – desvio padrão relativo da solução branco (n=10).

Os LD obtidos foram 24, 8, 0,005, 0,009 e 0,011 mg L⁻¹, enquanto o LQ foram 80, 26, 0,017, 0,031 e 0,035 mg L⁻¹ para K, P, Cu, Fe e Zn, respectivamente.

A faixa de trabalho é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento tem precisão, exatidão e linearidade adequadas. No limite inferior da faixa linear, o fator limitante é o valor do limite de quantificação (LQ) e no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2007). Para o método proposto nesse trabalho, a faixa linear foi de 0,02 mg L⁻¹ a 1,0 mg L⁻¹ para os microelementos (Cu, Fe e Zn) e de 25,0 mg L⁻¹ a 175 mg L⁻¹ para os macros elementos (K e P).

A precisão pode ser obtida analisando a dispersão de resultados em uma mesma amostra, ou seja, resultados próximos entre si de uma mesma amostra medida repetidas vezes. A precisão é estimada por medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2016). Nesse trabalho a precisão foi calculada a partir da equação:

$$CV \% = \frac{s}{M} \times 100 \text{ (equação 4)}$$

onde:

M: concentração média determinada

s: desvio padrão

A precisão foi determinada em termos de repetitividade avaliando as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, utilizando 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível. A amostra FNE1 foi empregada nestes ensaios por ser a amostra em estoque em maior quantidade adquirida. O CV para macroelementos variou entre 0,47 e 2,4 %, para os microelementos esta variação foi entre 0,16 a 0,75%.

Segundo a Associação de Analistas Químicos Oficiais (AOAC), o método será preciso em termos de repetitividade quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável para cada nível de concentração, sendo, nesse caso, para os macroelemento 3,7% e para os microelementos 7,3% (AOAC, 2012). Os resultados indicaram que, a precisão do procedimento aplicado à determinação de macro e microelementos em amostras de formulação nutricional enteral por ICP OES apresentam CV aceitáveis.

A exatidão é um parâmetro que pode ser definido como sendo o grau de concordância entre o valor real do analito na amostra, ou valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, e o estimado pelo método proposto. Para avaliar a exatidão do método podem ser realizadas análises baseadas no uso de material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de adição e recuperação na matriz e em estudos colaborativos com ensaios interlaboratoriais (INMETRO, 2016).

Uma vez que para a amostra em análise não se tinha disponível nenhum MRC, ensaios de adição e recuperação em amostras de fórmulas nutricionais enterais foram realizados. Para os ensaios de recuperação, a amostra FNE1 foi fortificada com o analito próximo ao limite de quantificação e em mais dois níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho. O fator de recuperação f_{rec} foi calculado através da equação:

$$f_{rec} = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \quad (\text{equação 5})$$

onde:

C_f = concentração medida após fortificação da matriz branca;

C_{nf} = concentração medida na matriz branca não fortificada, i.e., antes da fortificação;

C_{ad} = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

A Tabela 10 apresenta o resultado do ensaio de adição e recuperação. Foram obtidas recuperações entre 96% a 120% para Zn, Cu e Fe, e 96 a 105% para K e P. Segundo as diretrizes para requisitos de desempenho de métodos padrão da AOAC o intervalo da recuperação aceitável na região estudada do analito que compreende $100 \text{ mcg Kg}^{-1} \leq C < 10000 \text{ mcg Kg}^{-1}$ varia entre 80-110% para o Cu, Fe e Zn, e entre 90-107% para K e P na região de $10 \text{ mcg Kg}^{-1} \leq C < 100 \text{ mcg Kg}^{-1}$ (AOAC, 2012). Dessa forma, os resultados obtidos encontraram-se dentro da faixa de recuperação aceitável para o nível de concentração determinado para a maioria dos analitos estudados.

Tabela 10 - Resultados do ensaio de adição e recuperação aplicado em amostras de solução nutricional enteral por amostragem em suspensão e determinação por ICP OES.

Analito	Concentração adicionada, mg L⁻¹	Recuperação, %
Cu	0,42	79
	0,5	103
	1,0	100
Fe	0,42	110
	0,5	120
	1,0	107
Zn	0,42	96
	0,5	110
	1,0	103
K	100	94
	150	77
	175	76
P	30	91
	75	102
	100	100

Além disso, o método foi aplicado em amostras comerciais de formulações enterais e comparou-se os resultados com os obtidos após digestão das amostras por forno de microondas. Os resultados, expressos como intervalo de confiança a um nível de 95% estão mostrados na Tabela 11. Observou-se que não houve diferenças significativas entre os dois procedimentos, apesar de não estarem em concordância com os valores declarados nos rótulos das embalagens das formulações nutricionais enterais.

Assim, o sistema desenvolvido possibilitou a determinação de cobre, ferro, zinco, potássio e fósforo em amostras de nutrição enteral com bom desempenho analítico.

As amostras coletadas tiveram como objetivo testar a metodologia proposta no presente trabalho.

A legislação do Ministério da Saúde (MS) do Brasil, que regulamenta os índices de minerais permitidos para fórmula padrão para nutrição enteral através da RCD Nº 21, de 13 de maio de 2015, estabelece limite máximo aceitável (em mg L⁻¹) para: Fe (23,0), P (2000), K (3270), Cu (5,0) e Zn (20,0) do alimento tal como exposto à venda. Para as amostras analisadas, os resultados encontrados para cobre, ferro, potássio e zinco estavam abaixo do valor máximo estabelecido pela legislação.

Tabela 11 - Resultados da análise de amostras de formulações nutricionais enterais por ICP OES empregando amostragem em suspensão e após digestão por microondas.

Amostra		Método proposto, mg L ⁻¹	Método comparativo, mg L ⁻¹
FNE2	Cu	0,41 ± 0,1	0,43 ± 0,1
	Fe	2,0 ± 0,6	3,1 ± 1
	Zn	3,1 ± 0,6	4,7 ± 0,5
	K	1409 ± 27	1027 ± 67
	P	217 ± 12	227 ± 14
DNE1	Cu	0,41 ± 0,05	0,5 ± 0,2
	Fe	2,9 ± 0,06	2,5 ± 0,4
	Zn	2,9 ± 0,07	3,2 ± 0,7
	K	1010 ± 5	892 ± 60
	P	344 ± 6	291 ± 12
FNE1	Cu	0,43 ± 0,01	0,50 ± 0,06
	Fe	2,3 ± 0,05	2,3 ± 0,1
	Zn	1,7 ± 0,05	2,2 ± 1
	K	682 ± 6	701 ± 42
	P	219 ± 49	222 ± 10

*n/d: valores não declarados no rótulo.

O bom desempenho analítico do método foi comprovado quando comparado a outros descritos na literatura que envolvem amostragem em suspensão empregando determinações por ICP OES. Em estudos envolvendo alimentos para fins de nutrição enteral, Bunker & Clayton (1983) desenvolveram método multielementar envolvendo zinco, cobre, ferro e manganês. O LD obtido para o zinco foi de 128 mg L^{-1} , para o cobre de 184 mg L^{-1} e para o ferro de 256 mg L^{-1} . Além de envolver uma grande quantidade de amostra, 20,0 g, o método apresentou um elevado valor de LD (BUNKER & CLAYTON, 1983). Por sua vez, Macarovscha (2011) obteve LD de $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ para cobre, $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ para potássio, $0,011 \text{ mg L}^{-1}$ para fósforo e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ para zinco utilizando a digestão com auxílio de forno de micro-ondas para preparo das amostras. Apesar dos baixos limites de detecção, essa técnica apresenta a desvantagem de ser mais dispendiosa, utilizando-se de maiores quantidades de reagentes e, por sua vez, mais resíduos gerados, além de maior gasto de tempo (MACAROVSCHA, 2011).

Dessa forma, o método desenvolvido foi eficiente na determinação de cobre, ferro, zinco, potássio e fósforo em amostras de solução nutricional enteral, empregando as condições meio diluente e fator de diluição apropriadas, apresentando limite de quantificação, precisão e exatidão adequados, parâmetros analíticos adequados para o método desenvolvido, o que é imprescindível na análise de amostras alimentares, assegurando a confiabilidade dos resultados analíticos considerando a legislação pertinente.

Apesar do objetivo do presente trabalho englobar, inicialmente, a determinação de onze elementos, foi possível obter boas recuperações para cinco deles. O procedimento analítico foi aplicado com sucesso na determinação de Fe, Cu, Zn, K e P, sem a necessidade da utilização de etapas exaustivas de pré-tratamento da amostra, evitando a geração de resíduos adicionais, comum na maioria dos métodos de pré-concentração envolvendo técnicas espectroanalíticas.

Dos analitos estudados, todos (Fe, Cu, K, P e Zn) apresentaram concentrações inferiores aos níveis estabelecidos para os elementos, segundo MS, não oferecendo riscos potenciais à saúde. Por outro lado, apesar de

estarem em consonância com o método comparativo realizado, nenhum deles estão de acordo com o declarado pelo rótulo do fabricante, sendo necessário a realização de mais estudos para comprovação, contato com as empresas responsáveis, e posterior denúncia aos órgãos regulamentares e empresas dos produtos em questão caso seja confirmado a discrepância dos resultados obtidos.

Comparando os resultados obtidos pelo método proposto com outros trabalhos encontrados na literatura envolvendo determinação de elementos inorgânicos e amostragem em suspensão para posterior determinação por ICP OES, pôde-se observar que alguns estudos envolveram concentração final da suspensão de amostra bem inferiores, além de limites de detecção também muito baixos. Nesse caso, outros fatores devem estar associados a eficiência desses métodos tais como o uso do banho ultrassônico para melhor homogeneização da suspensão, ou seja, a adição de mais uma etapa ao processo de determinação de espécies inorgânicas (KREJCĀOVA´ *et al.*, 2006; CERNOHORSKY *et al.*, 2008).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi proposta uma estratégia analítica para determinação da concentração Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Se e Zn por ICP OES em amostras de soluções de nutrição enteral empregando amostragem em suspensão. O método proposto possibilitou a obtenção limites de detecção e quantificação aceitáveis para Fe, Cu, K, P e Zn dentre os analitos avaliados.

Apesar do método desenvolvido ter apresentado limites de detecção superiores para alguns elementos em comparação a outros estudos, os mesmos encontraram-se abaixo dos teores exigidos para esses elementos pela legislação pertinente. Além disso, os demais parâmetros de desempenho, como exatidão e precisão, foram adequados para análises com fins de monitoramento.

Uma característica atrativa do método proposto foi o menor tempo gasto na etapa do preparo da amostra, que aumentou a frequência analítica. Além disso, o procedimento proposto contribuiu para minimizar os riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes – apenas ácido nítrico diluído – e pouca manipulação ou baixa exposição ao ambiente, acrescido de menores riscos, de perdas do analito de interesse, menor periculosidade devido utilização de reagentes pouco tóxicos ou corrosivos em menores concentrações, e a possibilidade de análise em pequena quantidade de amostra. A associação da técnica de amostragem em suspensão com o equipamento de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente era inicialmente dificultada por se tratar de partículas em suspensão e, devido a pequena abertura anular, partículas presentes na solução poderiam causar o entupimento do sistema de nebulização, e um desgaste mais acentuado da tocha em um curto período. Para contornar essa questão, foi utilizado nesse trabalho um nebulizador OneNeb. Outra problemática foi a necessidade de calibração por adição do analito, que acabou impactando em um maior gasto de tempo na etapa de análise e maior consumo de amostra.

Esse trabalho mostrou-se como uma alternativa para determinação multielementar de Cu, Fe, Zn, K e P em amostras de solução nutricional enteral para fins de monitoramento utilizando um procedimento simples e rápido, quando comparado a outros procedimentos de preparo de amostra. Além disso, trata-se de um trabalho com valor acadêmico agregado por ser o primeiro trabalho empregando amostragem em suspensão para determinação multielementar em fórmulas nutricionais enterais por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

7. REFERÊNCIAS

AHMADI, M.; MADADLOU, A.; SABOURI, A. A. Isolation of micro- and nano-crystalline cellulose particles and fabrication of crystalline particles-loaded whey protein cold-set gel. **Food Chemistry**, v. 174, p. 97–103, 2015.

AMORIM, F. A. C.; COSTA, V. C.; SILVA, E. G. P. D.; LIMA, D. DE C.; JESUS, R. M. DE; BEZERRA, M. DE A. Multivariate optimization of simple procedure for determination of Fe and Mg in cassava starch employing slurry sampling and FAAS. **Food Chemistry**, v. 227, p. 41–47, 2017.

ANTHEMIDIS, A. N.; PLIATSIKA, V. G. On-line slurry formation and nebulization for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Multi-element analysis of cocoa and coffee powder samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 20, p. 1280–1286, 2005.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. **Guidelines for standard method performance requirements**, 2012.

ARAÚJO, I. S., SANTOS, H. V. G. **Guia multiprofissional de orientação para pacientes em uso de nutrição enteral domiciliar**. HEWAB/HU-UNIVASF, Petrolina, 2017.

BAYDER, T.; AYDIN, A.; DURU, S.; IŞİMER, A.; ŞAHİN, G. Aluminum in Enteral Nutrition Formulas and Parenteral Solutions. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 35, p. 277-281, 1997.

BAYSAL, A.; AKMAN, S.; CALISIR, F. A novel slurry sampling analysis of lead in different water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry after coprecipitated with cobalt/pyrrolidine dithiocarbamate complex. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 454–459, 2008.

BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por espectrometria de absorção atômica em chama**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 63, de 6 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Enteral. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 21, de 13 de maio de 2015. Aprova o Regulamento Técnico de fórmulas para nutrição enteral. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Manual de terapia nutricional na atenção especializada hospitalar no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. Ministério da Saúde**, 2016. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_terapia_nutricional_atencao_hospitalar.pdf. Acesso em: 16 nov. 2020

- BUNKER, V. W.; CLAYTON, E. B., Trace element content of commercial enteral feeds. **Lancet**, v. 20, p. 426 – 428, 1983.
- CAL-PRIETO, M.J.; SOTELO, M. F.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J. M.; MAHÍA, P. L.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, v. 56, p. 1–51, 2002.
- CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 63 – 72, 2010.
- CARTOLANO, F. D. C.; CARUSO, L.; SORIANO, F. G. Terapia nutricional enteral: aplicação de indicadores de qualidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, p. 376–383, 2009.
- CARVALHO, A. P. P. F.; MODESTO, A. C. F.; OLIVEIRA, C. P.; PENHAVEL, F. A. S.; VAZ, I. M. F.; VIEIRA, L. L.; ARAÚJO, L. I.; ARAÚJO, M. B.; CARVALHO, R. F.; FERREIRA, T. X. A. M.; MELO, V. V. **Protocolo de terapia nutricional enteral e parenteral da comissão de suporte nutricional**. Goiânia: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, 162 p., 2014.
- CERNOHORSKY, T.; KREJCOVA, A.; POUZAR, M.; VAVRUSOVA, L. Elemental analysis of flour-based ready-oven foods by slurry sampling inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1246–1252, 2008.
- CERRUTTI M. B.; FROLLINI E. **Carboximetilcelulose Como Agente De Estabilização De Suspensões Cerâmicas**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polimeros, v.10, 2009.
- CÔRTEZ, J.F.F; FERNANDES, S.L.; NOGUEIRA-MADURO, I.P.N.; BASILE-FILHO, A.; SUEN, V.M.M.; SANTOS, J.E.; VANNUCHI, H.; MARCHINI, J.S. Nutritional therapeutic for the critically ill patients. **Medicina**, v. 36, p. 394-398, 2003.
- COZZOLINO, S. M. F. BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES. **Manole**, 878 p., 2005.
- CUPPARI L. GUIA DE NUTRIÇÃO CLÍNICA NO ADULTO. UNIFESP/Escola Paulista de Medicina. **Manole**, 2013.
- CUPPARI, L.; BAZANELLI, A. P. Funções plenamente conhecidas de nutrientes - Potássio. **Série de publicações ILSI Brasil**, v. 11, 2010.
- DIETA Enteral - Danone - Nutrison Standard 1.0 - 1 Litro. **Vita e Saúde**. Disponível em <https://www.vitaesaude.com.br/dieta-enteral-danone-nutrison-standard-1-0-1-litro>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- DUARTE, A.; MARQUES, A. R.; SALLET, L.H.B.; COLPO, E. Risco nutricional em pacientes hospitalizados durante o período de internação. **Nutrição Clínica Dietética Hospitalar**, v. 36, p.146 – 52, 2016.

FERREIRA, B. C. S.; GIL, L. F.; GURGEL, L. V. A.; FREITAS, R. P. Obtenção de um Novo Derivado Carboxilado de Celulose Microcristalina: Uma Síntese Fácil e sem Solvente. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 431 – 451, 2017.

FERREIRA, SERGIO L. C.; MIRÓ, M.; DA SILVA, E. G. P.; MATOS, G. D.; DOS REIS, P. S.; BRANDAO, G. C.; ARAUJO, R. G. O. Slurry sampling-an analytical strategy for the determination of metals and metalloids by spectroanalytical techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, p. 44 – 62, 2010.

FERREIRA, SERGIO L.C.; LEMOS, V. A.; SILVA, L. O. B.; QUEIROZ, A. F. S.; SOUZA, A. S.; DA SILVA, E. G. P.; DAS VIRGENS, C. F. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices - A review. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 227 – 236, 2015.

GINÉ, M.F. **Espectrometria de Emissão Atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. 1ª ed. Série Didática III. Piracicaba: CPG-CENA-USP, v.3, 143 p., 1998.

GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, p. 262 – 266, 2005.

GOPALAN, S., KHANNA, S. Enteral nutrition delivery technique. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, p. 313-317, 2003.

HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis – facts and traps. **Talanta**, v. 54, p. 1021 – 1038, 2001.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 31 p., 2016.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2007.

JESUS, R. M. **Determinação de metais e análise de especiação de arsênio em amostras de fertilizantes fosfatados e fosfato de rocha empregando amostragem de suspensão por ICP OES e HG-AAS**. 128 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, BA, 2010.

KORN, M. G. A., BOA MORTE, E. S., SANTOS, D. C. M. B., CASTRO, J. T., BARBOSA, J.T. P., TEIXEIRA, A. P., FERNANDES, A. P., WELZ, B., SANTOS, W. P. C., SANTOS, E.B. G. N., KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.43, p. 67 – 92, 2008.

KREJCĀOVA, A.; KAHOUN, D.; CERNOHORSKY, T.; POUZAR, M. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food Chemistry**, v. 98, p. 171 – 176, 2006.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Workshop sobre Preparo de Amostras, 282 p., 2006.

- KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016.
- MACAROVSCHA, G.T. **Determinação de elementos metálicos em nutrição enteral**. 76 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2011.
- MACÊDO, E. M. C.; AMORIM, M. A. F.; SILVA, A. C. S.; CASTRO, C. M. M. B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, p. 329-36, 2010.
- MAGALHÃES, C.; ARRUDA, M. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, v. 21, p. 459-466, 1998.
- MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilisation. **Microchemical Journal**, v. 76, p. 23 – 29, 2004.
- MCCRINDLE, R. I.; RADEMEYER, C. J. Excitation temperature and analytical parameters for an ethanol-loaded inductively coupled plasma atomic emission spectrometer. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, p. 399 – 404, 1995.
- MCCRINDLE, R.I.; RADEMEYER, C.J. Ethanol loading in an inductively coupled plasma. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 355, p. 264–266, 1996.
- MCKINSTY, P.; INDYK, H.; KIM, N. The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, v. 65, p. 245 – 252, 1999.
- MOKGALAKA, N. S.; WONDIMU, T.; MCCRINDI, R. I. Slurry nebulization icp-oes for the determination of Cu, Fe, Mg, Mn and zn in bovine liver. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 22, p. 313 – 321, 2008.
- MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 565 p. 81 – 88, 2006.
- MONDAL, I. H.; YEASMIN, S.; RAHMAN, S. Preparation of food grade carboxymethyl cellulose from corn husk agrowaste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 144-150, 2015.
- MOZRZYMAS, R. Trace elements in human health. **Recent Advances in Trace Elements**, p. 373–402, 2018.
- OLIVEIRA, A. A.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA, E. R. F.; TREVIZAN, L. C. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. **Química Nova**, v. 35, p. 1299-1305, 2012
- PAIXÃO, L. B. **Estratégias para determinação de cádmio e chumbo em água e leite de coco por espectrometria de absorção atômica de alta**

resolução com fonte contínua em forno de grafite. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2016.

PORTUGAL, L. A.; FERREIRA, H. S.; Dos Santos, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 87, p. 77 – 80, 2007.

SAMPAIO, L.R. et al. **Avaliação nutricional.** EDUFBA, 158 p., 2012.

SANTANA, F. A. **Estratégias analíticas visando a determinação de metais e metaloides em amendoim (*Arachis hypogaea L.*)**. 94 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, BA, 2017.

SANTANA, F. B.; SOUZA, L. A.; CARVALHO, W. C.; KORN, M. G. A.; SANTOS, D. C. M. B. Determination and In Vitro Bioaccessibility Evaluation of Cu, Fe, Mn, and Zn in Chia (*Salvia hispanica L.*) Seeds by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 176–185, 2020.

SEVERO, J. S.; MORAIS, J. B. S.; FREITAS, T. E. C.; CRUZ, K. J. C.; OLIVEIRA, A. R. S.; POLTRONIERI, F.; MARREIRO, D. N. Aspectos Metabólicos e Nutricionais do Magnésio. **Nutrição clínica dietética hospitalar**, v. 35, p. 67 – 74, 2015.

SILVA, C. S.; BLANCO, T.; NÓBREGA, J. A. Analysis of cement slurries by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 29 – 33, 2002

SILVA, E. G. P. **Determinação de metais em amostras de chocolate em pó utilizando amostragem de suspensão e detecção por espectrometria de absorção atômica em chama multielementar sequencial.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6ª ed, Brooks Cole, Belmont, 2007.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I. Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1048 – 1055, 2009.

SONDA nasogástrica e sonda nasoenteral: as diferenças na nutrição enteral. **Enfermagem ilustrada**, 2018. Disponível em: <http://enfermagemilustrada.com/sonda-nasogastrica-x-sonda-nasoenteral-as-diferencas-na-nutricao-enteral/>. Acesso em: 16 nov. 2020.

SOUZA, R. A.; BACCAN, N.; CADORE, S. Determination of elemental content in solid sweeteners by slurry sampling and ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1264 – 1267, 2011.

SOUZA, A. L. **Estudo de métodos visando à análise direta de alumina, cimento e quartzo em ICP OES.** Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2011.

SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; BRUM, B. C. T.; SANTOS, S. H.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O. Determination of nutrients in sugarcane juice using

slurry sampling and detection by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 273, p. 57 – 63, 2019.

STIVANIN, S.C.B. **Desequilíbrio eletrolítico: sódio, potássio e cloro.** Seminário apresentado na disciplina Transtornos Metabólicos dos Animais Domésticos. 10p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

TOKMAN, N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 87 – 94, 2007.

VASSILEVA, E.; DOCEKALOVA, H.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, S.; HOENIG M. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determinations in environmental samples. **Talanta**, v. 54, p. 187 – 196, 2001.

VIÑAS, P., CAMPILLO, N., GARCÍA, I. L., & CÓRDOBA, M. H. Slurry–electrothermal atomic absorption spectrometric methods for the determination of copper, lead, zinc, iron and chromium in sweets and chewing gum after partial dry ashing. **The Analyst**, v. 119, p. 1119 – 1123, 1994^a.

VIÑAS, P., CAMPILLO, N., GARCÍA, I. L., & CÓRDOBA, M. H. Slurry atomization of vegetables for the electrothermal atomic absorption spectrometric analysis of lead and cadmium. **Food Chemistry**, v. 50, p. 317 – 321, 1994^b.

WAITZBERG, D.L.; CAIAFFA, W.T.; CORREIA, M.I.T.D. Hospital Malnutrition: The Brazilian National survey (IBRANUTRI): A study of 4000 Patients. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 17, p. 573 – 580, 2001.

WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; PAWEL POHL, P. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 65, p. 122 – 136, 2015.

WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. F.; MIRÓ, M. Encyclopedia of Analytical Science. **Elsevier**, 5109 p., 2019.

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