

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS MINERAIS E TRAÇOS EM DIETAS PELA TÉCNICA DE ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA

Maria Izabel O. Eiras¹, Déborah I.T. Fávaro¹, Marisilda Ribeiro², Sílvia M.F. Cozzolino².

¹Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN-CRPQ)-

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP

Av. Lineu Prestes 2.242 - 05508-900, Butantã, São Paulo, SP, Brasil

²Laboratório de Minerais, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – FCF/USP, São Paulo.

RESUMO

No presente trabalho, 12 amostras representando cada uma um “pool” de dietas de sete dias, compostas de quatro refeições: desjejum, almoço, jantar e lanche, foram analisadas. Cada amostra correspondeu a duplicatas de dietas elaboradas a partir de planejamento teórico, para atender as necessidades energéticas de acordo com a RDA(1989), adequadas em energia e equilibradas quanto aos macronutrientes. Essas dietas foram oferecidas para um grupo de 12 indivíduos saudáveis, do sexo masculino, com idade entre 19 e 42 anos. Essas dietas foram obtidas por 2 processos de secagem diferentes: estufa ventilada a 60 °C e liofilização, totalizando dessa forma 24 amostras. A determinação da concentração de alguns elementos minerais e traços Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn foi feita utilizando-se a técnica de ativação neutrônica instrumental. A validação da metodologia foi feita por meio da análise dos materiais de referência Orchard Leaves (NIST SRM 1541), Typical Diet (NIST SRM 1548^a) e Peach Leaves (NIST SRM 1547). Verificou-se a concordância dos resultados de composição química das dietas obtidas pelos dois processos de secagem, quanto ao teor de elementos minerais e traços, por meio de teste estatístico. Pretendeu-se também, verificar a adequação dos níveis de ingestão diária dos elementos minerais nas dietas em estudo, de acordo com as novas recomendações estabelecidas pelo NRC.

Keywords: minerals, trace elements, diets, neutron activation analysis

I. INTRODUÇÃO

As necessidades nutricionais de um número cada vez maior de elementos inorgânicos têm sido objeto de muitos estudos nas últimas décadas. O corpo humano contém uma série de elementos necessários para a manutenção e equilíbrio de todas as suas funções vitais.

Do ponto de vista de saúde pública é importante assegurar à população que a ingestão de todos os nutrientes seja adequada numa dieta normal. Ao mesmo tempo, a dieta não deve conter níveis de elementos tóxicos maiores do que os níveis permissíveis. Com exceção da exposição ambiental, a maior entrada desses elementos, essenciais e tóxicos, no organismo humano, ocorre via cadeia alimentar.

Estudos de dieta são conduzidos por diversos centros de pesquisa, para diferentes grupos de população, com o objetivo de estimar a ingestão de elementos essenciais e tóxicos, verificar as interações entre os elementos e definir uma dieta que seja representativa para aquele determinado grupo. Vários métodos de avaliação dietética têm sido utilizados pelos pesquisadores, como o método da dieta total; estudos seletivos de alimentos individuais e estudos da porção em duplicata, onde a dieta é composta a partir da

duplicata de todos os alimentos e bebidas consumidos durante o período de estudo[1].

No Brasil, poucos são os dados disponíveis de dietas e alimentos em geral, em relação ao teor de elementos minerais e tóxicos. O Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN/CNEN-SP, em colaboração com o Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP, vem desenvolvendo, nos últimos anos, pesquisa nessa área utilizando a técnica de ativação neutrônica para a quantificação desses elementos[2-5].

A técnica de ativação neutrônica (AAN) tem sido largamente utilizada na análise de alimentos e dietas, devido às suas características de alta precisão, exatidão e sensibilidade, além de ser uma técnica multielementar[6].

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, oito elementos minerais e traços, necessários à nutrição humana, foram investigados em 12 amostras representando cada uma um “pool” de dietas de sete dias, planejadas teoricamente, para atender às necessidades energéticas e de macronutrientes, de um grupo de indivíduos, considerados saudáveis.

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: 1) identificar as concentrações dos elementos

citados, presentes nas dietas estudadas; 2) verificar se a ingestão desses elementos está de acordo com os novos padrões recomendados pelo NRC (National Research Council)[7] e 3) verificar a concordância dos resultados de concentração obtidos, para dois tipos de preparação das amostras de dietas, a liofilização e a secagem em estufa ventilada a 60°C.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e preparo das dietas - Cada amostra correspondeu a duplicatas de dietas planejadas, elaboradas e oferecidas a 12 indivíduos, do sexo masculino, com idade entre 19 e 42 anos, recrutados junto à Comunidade Universitária da Universidade de São Paulo. As dietas foram teoricamente planejadas e balanceadas em energia e macronutrientes, para atender as necessidades de cada indivíduo, segundo a RDA (Recommended Dietary Allowance)[8], contendo, cada uma, aproximadamente 3000 kcal/dia, distribuídas entre o jejum ($\pm 15\%$), almoço ($\pm 36\%$), lanche da tarde ($\pm 13\%$) e jantar (36%), levando em consideração o perfil alimentar do grupo.

Para a estimativa da composição química teórica das dietas planejadas foi utilizado o *software* “Virtual Nutri” do Departamento de Nutrição, da Faculdade de Saúde Pública, da USP[9]. Seguindo o que foi planejado, as dietas foram preparadas, conforme hábito da população e dos participantes. Estas foram então oferecidas a cada um dos voluntários, por um período de sete dias consecutivos. Igualmente àquelas oferecidas, duplicatas das refeições diárias de cada indivíduo, foram pesadas ou medidas com o auxílio de utensílios padronizados. As duplicatas foram acondicionadas, da mesma maneira como foram distribuídas, e em seguida congeladas em freezer, a fim de serem submetidas à análise química direta, em laboratório, para determinação da sua composição centesimal, além dos conteúdos de elementos minerais e traços. Considerando a grande quantidade de amostras a serem analisadas, optou-se pela composição de um “pool de dietas” para cada voluntário, para resultados correspondentes à média diária de sete dias. Na semana seguinte à distribuição das dietas, suas respectivas duplicatas foram, imediatamente descongeladas, trituradas e acondicionadas em recipiente de polipropileno, sendo várias vezes homogeneizada, com o auxílio de uma espátula. Alíquotas de 5g do homogeneizado foram, imediatamente, tomadas para determinação da umidade do material, em estufa a 105°C. Parte da mistura, ou seja, ± 1 kg, foi colocado em bandejas de aço inox para ser liofilizado. Igual quantidade foi preparada, em bandeja de aço inox, revestida com filme de teflon (previamente desmineralizado com solução de HNO₃ 20%), para secagem em estufa ventilada a 60°C, enquanto o restante do homogeneizado foi desprezado. Concluídos os processos de secagem, uma porção da matéria foi separada em frascos de polipropileno desmineralizados, para posterior análise. No presente trabalho, 24 amostras de dietas foram analisadas quanto ao teor de minerais e traços pela técnica de AAN no LAN.

O desenho experimental do trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas-FCF, da Universidade de São Paulo-USP, conforme Port. 111 de 11/12/97-F.C.F.

Análise por Ativação Neutrônica (AAN) - No presente trabalho, utilizou-se o método de AAN comparativo, segundo o qual amostras e padrões contendo quantidades conhecidas dos elementos de interesse são irradiados simultaneamente, sob um fluxo de nêutrons, ocorrendo a formação de isótopos radioativos, por meio de reações nucleares. Uma vez que cada isótopo produzido no processo de ativação possui características de emissão próprias (meia vida e energia das partículas ou radiação gama emitidas) é possível efetuar determinações quantitativas da concentração por comparação com padrões.

AAN Instrumental (AANI)

Preparação dos padrões sintéticos - Os padrões sintéticos dos elementos analisados foram preparados a partir de soluções padrão da marca SPEX CERTIPREP, diluídas às concentrações apropriadas.

Preparação de Amostras e Padrões para irradiação - Cerca de 200 mg das amostras, 150 mg dos materiais de referência Peach Leaves (NIST SRM 1547) e Orchard Leaves (NIST SRM 1541) e os padrões sintéticos dos elementos de interesse, foram irradiados conjuntamente. As amostras (duplicata) e os padrões foram submetidos a 2 tipos de irradiações no reator IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP: a) irradiações curtas com a determinação dos elementos: K, Mg, Mn e Na; b) irradiações longas (8 horas) com a determinação dos elementos Ca, Fe, Se e Zn.

Medidas da atividade gama induzida - A primeira medida foi realizada após um tempo de decaimento de 5 a 7 dias, por aproximadamente 90 min. para amostras e materiais de referência, e de 15 a 30 min. para os padrões sintéticos e a segunda medida, realizada após um tempo de decaimento de quinze a vinte dias, com um tempo de 15 horas para as amostras e materiais de referência e de cerca de 30 minutos para os padrões sintéticos.

As medidas da radiação gama emitida pelos radioisótopos produzidos na irradiação das amostras e padrões foram feitas num espectrômetro gama, constituído de detector de Ge hiper puro, modelo 20190 POP TOP da EG&G ORTEC, com resolução de 1,9 keV para o pico de 1332,49 keV do ⁶⁰Co, acoplado a uma placa ACE 8K da EG&G ORTEC e eletrônica associada e, a microcomputadores para aquisição e análise dos dados.

Para processamento dos espectros, utilizou-se o programa de computação VISPECT2, em linguagem TURBOBASIC, desenvolvido pelo Dr. D. Piccot, Saclay, França.

Validação da Metodologia - A precisão e a exatidão do método foram verificadas por meio da análise dos materiais de referência Orchard Leaves (NIST SRM 1541), Typical Diet (NIST SRM 1548a) e Peach Leaves (NIST SRM 1547).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para controle de qualidade dos resultados obtidos pela técnica de AANI, tem sido bastante utilizado o critério de Z-score[10]. As melhores estimativas do valor verdadeiro para cada elemento analisado, são obtidas a partir da informação disponível nos padrões primários (padrões pipetados) ou a partir das concentrações dos elementos certificados nos materiais de referência (MR). O cálculo da diferença padronizada ou valor de Z de um resultado analítico é dado por

$$Z_i = C_i - C_{ref,i} / (s_i^2 + s_{ref,i}^2)^{1/2}$$

Onde

C_i = concentração do elemento i na análise do MR,

$C_{ref,i}$ = valor certificado de concentração ou de consenso para o elemento i,

s_i = incerteza da concentração do elemento i na análise do MR,

$s_{ref,i}$ = incerteza do valor de consenso certificado para o elemento i

A definição da diferença padronizada está em conformidade com o uso do critério de Z em testes de proficiência. Esse critério é uma aproximação aceita para estabelecer se o resultado encontra os limites de controle previamente definidos pelo laboratório. No caso da técnica de AANI, o uso do valor de Z para aprovação dos resultados considera que se $|Z| < 3$ tem-se que o resultado individual da amostra controle, no nosso caso o material de referência que está sendo analisado, deve estar dentro de 99% do intervalo de confiança do valor esperado.

Observa-se pelas Figuras 1, 2 e 3, que os resultados obtidos nas análises dos materiais de referência, se encontram dentro do critério de $|Z| < 3$, indicando uma boa precisão e exatidão dos resultados analíticos obtidos.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os dados de concentração para alguns elementos minerais e traços, corrigidos para 100 g de dieta liofilizada e seca em estufa, respectivamente.

Para os valores das Tabelas 1 e 2, aplicou-se teste F de variância e o teste t de Student[11] para verificar se as médias obtidas para os elementos minerais Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn para as amostras obtidas pelos dois métodos de secagem, diferiam ou não significativamente.

Se o valor de $t_{calculado}$ for menor que o valor de $t_{tabelado}$ para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a um nível de significância de 0,05, pode-se concluir que as médias dos resultados obtidos pelos 2 métodos são iguais.

A Tabela 3 apresenta os resultados da aplicação dos testes F e t para a comparação das médias dos elementos minerais e traços obtidos pelos 2 métodos de preparação das dietas. Observa-se pelos valores de F e de t calculados, todos menores que os valores tabelados, que as médias obtidas pelos dois métodos de preparação empregados podem ser consideradas estatisticamente iguais,

a um nível de significância de 0,05.

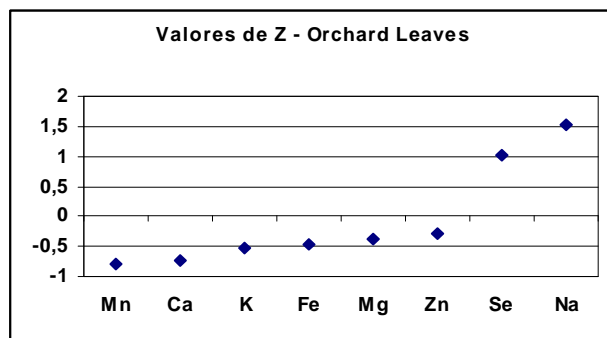


Figura 1 - Valores de Z encontrados na análise do material de referência Orchard Leaves

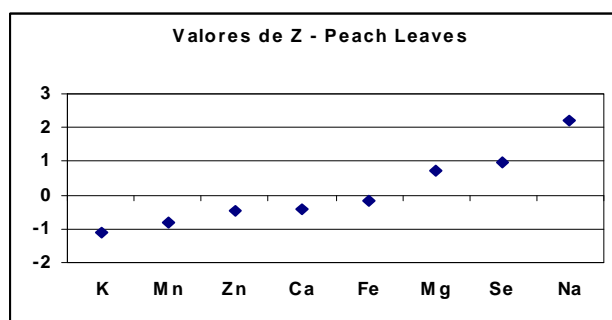


Figura 2 - Valores de Z encontrados na análise do material de referência Peach Leaves

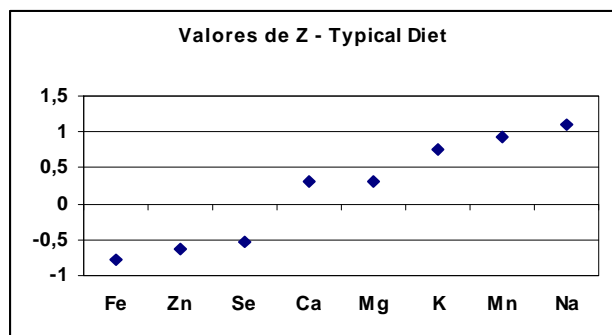


Figura 3 - Valores de Z encontrados na análise do material de referência Typical Diet

Para a verificação da adequação das dietas utilizou-se o critério das DRIs (dietary reference intakes), usado para planejar e avaliar dietas de populações saudáveis [7]. A Tabela 4 apresenta os dados de ingestão, para todos os indivíduos, obtidos no presente trabalho.

A Figura 4 apresenta a % de adequação para os valores de ingestão diários obtidos para os elementos Fe, Mg, Se e Zn, de acordo com os valores de EAR (estimated average requirement) e RDA (recommended dietary allowance), para homens na faixa etária estudada [7]. Pode-se concluir uma ótima adequação das dietas em relação aos elementos Fe e Zn (100% em relação a EAR). Já para os elementos Mg e Se, pode-se dizer que as dietas analisadas não estão adequadas (< 50% em relação a EAR). Com relação aos elementos Ca e Mn se encontram disponíveis somente os valores de AI (adequate intake) que são: 2,3 mg Mn/dia e 1000 mg Ca/dia. Os valores de ingestão

encontrados para as dietas analisadas em relação ao Mn, permitiram concluir que todos os indivíduos apresentaram valores acima de 2,3 mg/dia, indicando uma boa adequação em relação a esse elemento. Já para o Ca, todos os valores de ingestão diária estiveram abaixo do valor de 1000 mg/dia, indicando uma baixa adequação das dietas em relação a esse elemento.

Com relação aos elementos K e Na, não há novos valores de recomendação. Comparando-se os dados de ingestão com os valores recomendados para pessoas saudáveis [8], verificou-se altos valores de ingestão para ambos os elementos, fato esse já relatado na literatura para outras dietas brasileiras[2-5].

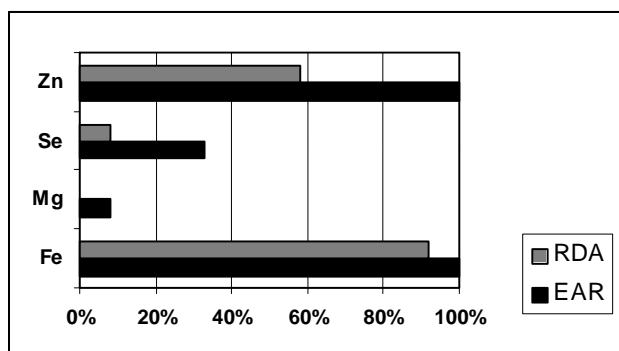


Figura 4 – Porcentagem de adequação dos valores de ingestão diários com as novas recomendações do NRC (EAR e RDA).

IV. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho, permitiram concluir que ambos os processos de secagem podem ser utilizados na preparação das dietas, não havendo diferenças estatisticamente significativas nas concentrações dos elementos analisados.

Comparando-se os valores de ingestão obtidos no presente trabalho com os novos valores recomendados pelo NRC, para homens na faixa etária do presente estudo, pode-se concluir uma boa adequação das dietas em relação aos elementos Fe, Mn e Zn e uma baixa adequação em relação a Mg e Se. Os valores de ingestão para Na e K, se encontraram bem acima das recomendações para indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

[1] World Health Organization. **Trace Elements in Human Nutrition and Health**. WHO, Library Cataloguing: Geneva, 1996.

[2] Fávoro, D.I.T., Afonso, C., Vasconcellos, M.B.A., Cozzolino, S.M.F. **Determinação de elementos minerais e traços por ativação neutrônica em refeições servidas no restaurante da Faculdade de Saúde Pública/USP**. Ciên. Tecnol. Aliment., Campinas, 20(2), 176-182, 2000.

[3] Fávoro, D.I.T., Chicourel, E.L.; Maihara, V.A., Zangrande, K.C.; Rodrigues, M.I.; Barra, L.G.; Vasconcellos, M.B.A., Cozzolino, S.M.F. **Evaluation of some essential and trace elements in diets from 3 nurseries from Juiz de Fora, M.G., Brazil, by neutron activation analysis**. J. Radioanal. Nucl. Chem., v.249(1), p.15-19, 2001.

[4] V.A. Maihara, D.T. Fávoro, V.N. Silva, I.B. Gonzaga, V.L. Silva, I.L.Cunha, M.B.A. Vasconcellos, S.M.F. Cozzolino. **“Analysis of mineral constituents in duplicate portion diets of two university student groups by instrumental neutron activation analysis”** J. Radioanal. Nucl. Chem., 249(1), p. 21-24, 2001.

[5] Maihara, V.A. **Avaliação do conteúdo de elementos essenciais e tóxicos em dietas de crianças e idosos pelo método de análise por ativação com nêutrons**. Tese de Doutorado, IPEN - Universidade de São Paulo, 1996.

[6] Parr, R.M. **Current role of NAA in biological and health-related environmental studies as exemplified by programs of the IAEA**. J. Radioanal. Nucl. Chem., v.244, n^o 1, p.17-21, 2000.

[7] Dietary Reference Intake for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. The National Academy Press, 2000. <http://www.nap.edu>.

[8] National Research Council. **Recommended Dietary Allowances** (10^a edição), National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1989.

[9] Philippi, S.T., Szarfarc, S.C., Latterza, A. R. **Virtual Nutri(software) versão 1.0 para windows**. Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública-USP, S. Paulo, 1996.

[10] Bode, P. **Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory**, Interfaculty Reactor Institut, Delft, Netherlands, p. 147, 1996.

[11] Miller, J.C. & Miller, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**, 2nd edition, Ellis Horwood Limited, p. 58, 1988.

ABSTRACT

In the present study 12 diets, adequate in energy and macronutrients according to the RDA recommendations, were elaborated and offered to a group of 12 men (19-42 years). The diets were collected by duplicate portion technique and dried by two different processes: freeze drying and 60 °C ventilated oven drying. The content of some minerals and trace elements (Ca, Fe, Mg, Mn, Na, Se and Zn) were determined by INAA. The results observed for the analyses of the diets were statistically compared. The calculated intake was compared to the daily recommended values set by RDA.

TABELA 1. Concentração dos elementos analisados em 100 g das dietas **liofilizadas**, obtidas pelo método químico direto (AAN)

Voluntários	Umidade Residual	Na	Ca	Mn	Zn	Mg	K	Fe	Se
	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
AA	9,35	548,3	145,1	0,40	1,72	44,4	565,8	2,1	6,4
AS	4,85	730,1	128,0	0,59	1,82	51,8	635,7	1,7	7,1
CC	12,98	667,6	94,8	0,50	2,05	40,7	574,1	1,7	
CF	12,75	455,2	123,8	0,58	1,92	57,5	545,4	1,6	
CV	11,03	585,8	100,0	0,45	1,99	41,8	551,1	1,3	5,9
GD	5,37	588,8	118,5	0,56	1,76	36,5	539,2	1,9	6,6
IM	9,11	631,9	121,9	0,55	1,88	43,7	545,0	1,9	
JJ	8,97	563,3	120,7	0,48	1,81	41,6	474,6	1,8	
LC	10,31	620,3	116,7	0,47	2,15	47,7	606,3	1,8	6,4
RG	11,06	611,5	129,1	0,53	1,81	55,7	690,7	1,9	9,2
RM	9,58	622,7	108,8	0,47	2,13	46,3	532,9	1,7	8,1
WS	10,38	691,9	124,7	0,51	2,22	44,0	537	1,8	7,6
Média		610	119	0,5	1,9	46,0	567	1,8	7,2
Desvio padrão		72	14	0,1	2	64	59	0,2	1,1
Mediana		620	135	0,5	2,0	44,2	551	2,0	7,0
Mínimo		455	95	0,4	1,7	36,5	475	1,3	5,9
Máximo		730	145	0,6	2,2	57,5	702	2,1	9,3

TABELA 2. Concentração dos elementos analisados em 100 g das dietas **secas em estufa**, obtidas pelo método químico direto (AAN)

Voluntários	Umidade Residual	Na	Ca	Mn	Zn	Mg	K	Fe	Se
	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
AA	9,59	557,3	130,0	0,4	1,9	29,1	524,3	1,84	5,5
AS	7,60	573,8	153,4	0,6	1,9	52,6	620,1	1,66	5,3
CC	7,43	668,7	111,6	0,5	2,0	44,6	635,0	1,49	5,0
CF	8,00	626,3	134,7	0,5	2,0	55,8	617,0	1,84	
CV	7,91	577,8	116,7	0,5	2,2	43,7	617,3	1,77	5,6
GD	8,94	627,4	119,3	0,6	1,9	41,8	670,3	1,77	5,2
IM	14,65	636,3	105,1	0,5	1,6	35,7	516,8	1,47	
JJ	7,66	654,6	132,4	0,5	1,9	44,3	596,5	1,75	
LC	6,56	633,0	126,4	0,6	2,2	54,9	649,7	1,64	7,6
RG	12,65	530,3	136,9	0,5	1,5	53,8	498,8	1,53	7,95
RM	8,94	710,1	132,2	0,5	2,2	43,6	597,6	1,69	6,9
WS	9,44	649,9	123,8	0,5	2,1	44,0	578,4	1,75	6,7
Média		624	124	0,52	1,9	45,4	592	1,7	6,7
Desvio Padrão		57	11	0,04	0,3	6,8	64	0,1	1,2
Mediana		633	126	0,51	1,9	43,7	598	1,7	6,9
Minimo		530	105	0,47	1,5	35,7	499	1,47	5,2
Máximo		633	1264	0,57	2,2	54,9	670	1,77	7,6

TABELA 3. Valores de **F** e **t** calculados para as médias dos elementos minerais, obtidos para as dietas preparadas por liofilização e secas em estufa.

	Na	Ca	Mn	Zn	Mg	K	Fe	Se
Média(liof)	610	119	0,5	1,9	46,0	567	1,8	7,2
Desv.padrão	71	14,0	0,1	0,2	6,4	59	0,2	1,1
S_x²	5041	196	0,0036	0,04	40,96	3481	0,04	1,21
Média(est)	620	127	0,5	1,9	45,3	594	1,7	6,2
Desv.padrão	51	12,8	0,0	0,2	8,0	54	0,1	1,1
S_y²	2636	164,7	0,002	0,047	63,9	2954	0,017	1,24
F_{calculado} (a)	1,91	1,19	1,48	1,17	1,56	1,18	2,42	0,98
F_{tabelado}	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85
T(22)_{tab} (b)	2,074	2,074	2,074	2,074	2,074	2,074	2,074	2,074
T(22)_{cal}	0,41	1,43	0,18	0,02	0,23	1,14	1,70	2,13

(a) – 11 graus de liberdade (b) – 22 graus de liberdade

TABELA 4. Resultados de ingestão diária para os elementos analisados

	Na	Ca	Mn	Zn	Mg	K	Fe	Se
Voluntários	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
AA	3090	818	2,3	9,7	250	3188	11,8	35,8
AS	4240	743	3,4	10,6	301	3692	9,9	41,4
CC	4099	582	3,0	12,6	250	3526	10,4	
CF	2543	692	3,3	10,7	321	3047	9,0	
CV	3287	561	2,5	11,2	235	3092	7,5	33,0
GD	3389	682	3,2	10,1	210	3104	11,1	38,1
IM	4366	842	3,8	13,0	302	3766	13,4	
JJ	3216	689	2,8	10,3	237	2710	10,5	
LC	4091	770	3,1	14,2	315	3999	11,7	42,0
RG	3948	834	3,4	11,7	360	4459	12,4	59,1
RM	3517	615	2,6	12,1	261	3011	9,6	46,0
WS	4079	735	3,0	13,1	259	3166	10,6	44,9