

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DA BATATA (*Solanum
tuberosum L.*) E DE SEU EFEITO NUTRICIONAL E/OU TÓXICO À SAÚDE
HUMANA

CURITIBA

2023

PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DA BATATA (*Solanum tuberosum* L.) E DE SEU EFEITO NUTRICIONAL E/OU TÓXICO À SAÚDE HUMANA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, no Setor de Ciências Exatas, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Andrea Pinto de Oliveira
Coorientadora: Prof. Dra. Rafaella Regina Alves Peixoto

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Nascimento, Patricia de Andrade

Avaliação da composição inorgânica da batata (*Solanum tuberosum* L.) e de seu efeito nutricional e/ou tóxico à saúde humana / Patricia de Andrade Nascimento. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Andrea Pinto de Oliveira

Coorientador: Rafaella Regina Alves Peixoto

1. Batata. 2. Minerais na nutrição. 3. Testes de toxicidade. 4. Biodisponibilidade. 5. Bioacessibilidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Oliveira, Andrea Pinto de. IV. Peixoto, Rafaella Regina Alves. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO** intitulada: **AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DA BATATA (*Solanum tuberosum* L.) E DE SEU EFEITO NUTRICIONAL E/OU TÓXICO À SAÚDE HUMANA**, sob orientação da Profa. Dra. ANDREA PINTO DE OLIVEIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica
28/08/2023 20:30:27.0
ANDREA PINTO DE OLIVEIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
30/08/2023 10:30:40.0
DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/08/2023 09:29:14.0
NOEMI NAGATA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
29/08/2023 15:46:02.0
ANA RITA DE ARAÚJO NOGUEIRA
Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA)

Assinatura Eletrônica
30/08/2023 20:00:50.0
SOLANGE CADORE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

A palavra que resume esse trabalho é dedicação, dedicação da minha família, dos meus amigos e da minha orientadora, para que esse trabalho acontecesse, e por isso dedico essa tese a vocês.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho é sobre a caracterização química da batata, mas poderia ser facilmente sobre graça, amor, gratidão e resiliência. De modo que essa página não é um elemento opcional e sim uma obrigação.

Agradeço primeiramente a Deus, o autor, Senhor e Salvador da minha vida. O qual me presenteou com cada pessoa/instituição que será citada nessa página.

Agradeço a UFPR, a CAPES, ao ITAL, a minha orientadora Andrea Oliveira, a minha coorientadora Rafaella Peixoto, a doutoranda Camila Confortin, ao professor Francisco Filipak, as técnicas Maria, Rúbia e Joicy pela oportunidade, condições, auxílio e orientações para que esse trabalho pudesse acontecer.

Agradeço aos professores Noemi, Patricio, Gilberto, Marco Tadeu, Mangrich, Glaucia, Gustavo, Camila, Denise, Lucia, Andrea Alves e Alceu por me inspirarem a seguir na carreira acadêmica e por todo apoio ao longo dessa trajetória.

Agradeço a todos amigos que tenho feito e que tem permanecido na minha vida ao longo desses 31 anos e a minha igreja amada IPBBN, por fazerem de cada etapa da minha vida mais fácil e gostosa de se viver.

Agradeço a Maria Eduarda, Bruna, Fernanda, Renata, Raiane, Cris, Carminha, Fábria, Tia Delvane, Julia, Mateus, Fran, Tio Sandro, Thiago, Thiaguinho, Ludmilla, Tereza, Juliana, Tassya, Mayara, Amanda, Rodrigo, Isadora, Raido, Marina, Vitor, Luciana, Henrique, Laís, Eros, Marina e Diana por não terem soltado a minha mão. Pelo contrário, vocês me abraçaram e me amaram quando eu mais precisei, muito obrigada.

Agradeço a Silvia, Camilla, Leandro, Milto e Pedro por me presentearem com uma família em Curitiba e também pelas viagens, jantãs, almoços, enfim, pela vida incrível que tivemos nos últimos 8 anos e pelo afilhado (João Pedro) mais lindo e amado do mundo.

Agradeço especialmente ao Vinícius Tamy, a Iohanna, ao Vitinho e a Giovanna por todo apoio, por todo amor e dedicação ofertados a mim. Vocês literalmente me salvaram. Vocês são respostas de oração, paz e calma em meio a tempestade, os amigos (e primo) que não angústia se fizeram irmãos e

nada que eu faça um dia seria capaz de retribuir a vocês por tanto. Infinitamente muito obrigada.

Para finalizar, eu agradeço a minha incrível família por absolutamente tudo. Eu já ganhei na loteria da vida tendo a Cristina Meire como mãe, o Paulo César como pai e o João Paulo como irmão e só por isso eu não poderia pedir mais nada. Essa vida, esse doutorado e qualquer coisa que eu faça sempre será para agradecer por ter vocês. Para vocês, todo amor e todo agradecimento que se pode ter nessa vida.

Obrigada a todos vocês por compartilharem essa vida comigo e me fazerem forte. Que Deus continue abençoando a vida de cada um de vocês.

*Porquanto é o SENHOR quem concede sabedoria,
E da sua boca procedem a inteligência e o discernimento.*

Provérbios: 2;6

*Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

Eclesiastes 3:1

Eu nunca perco, ou eu ganho, ou eu aprendo.

Nelson Mandela

RESUMO

A alimentação, apesar de ser a principal via de obtenção de nutrientes e energia para os seres humanos, também é considerada a principal via de exposição a elementos potencialmente tóxicos. Entretanto é necessário levar em consideração que nem todo nutriente/contaminante ingerido através da alimentação se torna disponível e pode de fato ser absorvido pelo organismo. De modo que, para avaliar a efetiva contribuição nutricional e/ou tóxica de um alimento, as frações bioacessíveis e biodisponíveis dos elementos inorgânicos devem ser analisadas. Dentre os alimentos com maior preferência alimentar, seja no Brasil ou a nível mundial, encontra-se a batata, a qual ocupa o 1º lugar como *commodity* não pertencente aos grãos. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo a avaliação dos teores totais e das frações bioacessíveis e biodisponíveis de elementos considerado essenciais à saúde humana como Ca, Mg, K, P, Cu, Mn, Fe e Zn, bem como de elementos potencialmente tóxicos como As, Cd, Cr e Pb. Para a determinação desses teores, a digestão ácida e técnicas espectrométricas como GFAAS, ICP OES e ICP-MS foram utilizadas, além de métodos *in vitro* de digestão gastrotintestinal (INFOGEST) e da mimetização da barreira intestinal a partir do uso de células Caco-2. Os resultados obtidos apresentaram maiores teores totais para os macroelementos (mg g^{-1}), enquanto os teores encontrados para as frações bioacessíveis ($\% \text{ m m}^{-1}$) variaram: K (10,27 – 31,98, 57 – 72%), P (1,18 – 2,61, 59 – 76%), Mg (0,42 – 1,38, 83 – 103%) e Ca (0,15 – 0,79, 30 – 123%) e os menores teores ($\mu\text{g g}^{-1}$) encontrados para Cu (5,16 – 10,35, 27 – 74%) e Mn (4,22 – 12,02, 60 – 119%). Dentre os elementos que tiveram sua biodisponibilidade ($\% \text{ m m}^{-1}$) avaliada, observou-se valores de aproximadamente 5,0% Fe, 12% Zn, 16% Mn e 22% para o P. Os elementos potencialmente tóxicos, Cd e Pb, foram encontrados em 75% das amostras analisadas, entretanto, os valores de concentração encontrados estavam todos abaixo do teor máximo permitido pela ANVISA ($0,10 \mu\text{g g}^{-1}$), enquanto que o Cr foi encontrado somente nas cascas de batatas, não havendo um teor máximo preconizado. Para esses elementos, as frações bioacessíveis não puderam ser quantificadas pelos métodos desenvolvidos no GFAAS (LOQ - $\mu\text{g L}^{-1}$: 0,063 Cd, 0,65 Cr e 0,44 Pb). Para o elemento As, devido aos elevados teores de K e P nas amostras de batata, não foi possível sua quantificação por GFAAS, com adequada exatidão e precisão. Uma vez que os elementos potencialmente tóxicos apresentaram valores para as frações bioacessíveis abaixo do LOQ obtido, e levando-se em consideração que os teores totais encontrados estão todos abaixo dos valores preconizados pela ANVISA, pode-se inferir que as amostras de batata estudadas não apresentam risco à saúde humana. Pelo contrário, as amostras de diferentes cultivares analisadas, fazem parte de uma categoria de alimentos, que além de saudáveis, colaboram com a ingestão de nutrientes essenciais, desmitificando que esse tipo de alimento contém apenas carboidratos, como pode ser constatado pela sua contribuição nutricional, em termos dos teores totais e suas frações bioacessíveis avaliadas nesse trabalho.

Palavras chaves: batata; minerais essenciais; toxicidade; bioacessibilidade; biodisponibilidade.

ABSTRACT

Food, despite being the main means of obtaining nutrients and energy for human beings, is also considered the main means of exposure to potentially toxic elements. However, it is necessary to take into account that not every nutrient/contaminant ingested through food becomes available and can actually be absorbed by the body. So, to evaluate the effective nutritional and/or toxic contribution of a food, the bioaccessible and bioavailable fractions of the inorganic elements must be analyzed. Among the foods with the highest food preference, whether in Brazil or worldwide, is the potato, which occupies the 1st place as a non-grain commodity. Thus, this work aimed to evaluate the total levels and bioaccessible and bioavailable fractions of elements considered essential to human health such as Ca, Mg, K, P, Cu, Mn, Fe and Zn, as well as potentially toxic elements such as As, Cd, Cr and Pb. For the determination of these levels, acid digestion and spectrometric techniques such as GFAAS, ICP OES and ICP-MS were used, in addition to in vitro methods of gastrointestinal digestion (INFOGEST) and intestinal barrier mimicking using Caco-2 cells. The results obtained showed higher total levels for the macroelements (mg g^{-1}), while the levels found for the bioaccessible fractions ($\% \text{ m m}^{-1}$) varied: K (10.27 – 31.98, 57 – 72%), P (1.18 – 2.61, 59 – 76%), Mg (0.42 – 1.38, 83 – 103%) and Ca (0.15 – 0.79, 30 – 123%) and the smallest contents ($\mu\text{g g}^{-1}$) found for Cu (5.16 – 10.35, 27 – 74%) and Mn (4.22 – 12.02, 60 – 119%). Among the elements that had their bioavailability ($\% \text{ m m}^{-1}$) evaluated, values of approximately 5.0% Fe, 12% Zn, 16% Mn and 22% for P were observed. The potentially toxic elements, Cd and Pb, were found in 75% of the analyzed samples, however, the concentration values found were all below the maximum content allowed by ANVISA ($0.10 \mu\text{g g}^{-1}$), while Cr was found only in potato skins, with no recommended maximum content. For these elements, the bioaccessible fractions could not be quantified by the methods developed in the GFAAS (LOQ - $\mu\text{g L}^{-1}$: 0.063 Cd, 0.65 Cr and 0.44 Pb). For the element As, due to the high levels of K and P in the potato samples, it was not possible to quantify it by GFAAS, with adequate accuracy and precision. Since the potentially toxic elements presented values for the bioaccessible fractions below the LOQ obtained, and taking into account that the total contents found are all below the values recommended by ANVISA, it can be inferred that the potato samples studied do not present a risk to human health. On the contrary, the samples of different cultivars analyzed, are part of a category of foods, which, in addition to being healthy, collaborate with the intake of essential nutrients, demystifying that this type of food only contains carbohydrates, as can be seen by its nutritional contribution, in terms of total contents and their bioaccessible fractions evaluated in this work.

Keywords: potato; essential minerals; toxicity; bioaccessibility; bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação da morfologia da Batata (<i>Solanum tuberosum</i>).....	21
FIGURA 2 - Batata Monalisa, cultivada de forma convencional - BMC e Batata Monalisa cultivada de forma orgânica – BMO.....	37
FIGURA 3 - Batata Asterix - BAC e Batata doce – BDC, ambas cultivadas de forma convencional.....	37
FIGURA 4 - Teor de umidade realizados para as amostras de batatas.....	38
FIGURA 5 - Fluxograma dos procedimentos de preparo de amostras aplicando-se a estratégia de decomposição ácida nas amostras de diferentes cultivares de batatas.....	39
FIGURA 6 - Representação esquemática dos ensaios de bioacessibilidade in vitro.....	48
FIGURA 7 - Representação esquemática do sistema experimental in vitro utilizado para os ensaios de biodisponibilidade.....	50
FIGURA 8 - Teores de K quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em forno de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).....	58
FIGURA 9 - Teores de Ca, Mg e P quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em forno de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).....	59
FIGURA 10 - Teores de Fe quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em forno de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).....	59
FIGURA 11 - Teores de Cu, Mn, Zn e Ba quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em forno de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).....	60
FIGURA 12 - Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para (a) Cd, (b) Pb e (c) Cr em meio ácido (HNO_3 1% v v ⁻¹). Análise de 20 μL de solução padrão ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada analito e emprego de 5 μL de modificador químico (Pd 1 μg) para a determinação de Cd e Pb por GFAAS.....	68
FIGURA 13 - Sinais transientes obtidos para Cd, Cr e Pb nas condições ótimas de T_p e T_a , com modificador químico de Pd 1 mg/5mL para Cd e Pd e a ausência de modificador para Cr. O sinal em vermelho corresponde ao sinal do analito,	

enquanto o sinal em azul corresponde ao do background (sinal de fundo).....	71
FIGURA 14 - Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central na otimização do programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de As em amostras de batatas. Variável resposta: Recuperação.....	74
FIGURA 15 - Sinais transientes (em vermelho) e sinais de fundo (em azul) obtidos para amostra de batata fortificada com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de As a partir do planejamento fatorial aplicado, 2^4 com ponto central.....	75
FIGURA 16 - Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central na otimização do programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de As em amostras de batatas. Variável resposta: SBR.....	76
FIGURA 17 - Valores de recuperação para os analitos Ca, Mg, P, Cu, Mn, Zn, Fe e K presentes na fração bioacessível para os dois protocolos (1IN e 2PE) de digestão in vitro aplicados em amostra de batata Monalisa convencional (BMC), em base seca.....	82
FIGURA 18 - Teores dos elementos Ca, Mg, P, Cu, Mn, Zn, Fe e K presentes nas frações bioacessíveis aplicando-se o protocolo 1IN de digestão in vitro para as diferentes amostras de batatas em base seca (Valor médio \pm desvio padrão, $n = 3$).....	82
FIGURA 19 - Gráfico de comparação entre a contribuição nutricional, das diferentes cultivares de batata, em relação ao teor total e as frações bioacessíveis de (a) K, (b) Ca, (c) Mg, P, Mn, Zn e Fe e (d) Cu para adultos...87	87
FIGURA 20 - Gráfico de comparação entre a contribuição nutricional, das diferentes cultivares de batata, em relação ao teor total e as frações bioacessíveis de (a) K, (b) Ca, (c) Mg, P, Mn, Zn e Fe e (d) Cu para crianças.....89	89
FIGURA 21 - Micrografia óptica de células Caco-2 em cultura. (aumento de 20 vezes).....	92
FIGURA 22 - Valores de recuperação para os analitos Fe, Mn, P e Zn presentes na fração biodisponível aplicando-se o protocolo de biodisponibilidade baseado em Peixoto (2015) in vitro (células Caco-2), utilizando-se das frações bioacessíveis do protocolo P 1IN (INFOGEST) para as amostras de batata Monalisa convencional (BMC) em base seca.....	93

FIGURA 23 - Teores dos elementos Fe, Mn, P e Zn presentes nas frações biodisponíveis aplicando-se o protocolo de biodisponibilidade baseado em Peixoto (2015) in vitro (células Caco-2) utilizando-se das frações bioacessíveis do protocolo P 1IN (INFOGEST) para as amostras de batata Monalisa convencional (BMC) em base seca (Valor médio \pm desvio padrão, n = 6)94

FIGURA 24 - Conformações do ácido fítico: (a) cinco posições equatoriais e uma axial; e (b) cinco posições axiais e uma equatorial.....96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição da Batata inglesa por 100 gramas de parte comestível (tubérculo).....	21
TABELA 2 - Quantidades de nutrientes extraídos do solo pela cultura da batata (considerando a produção de uma tonelada de tubérculos).....	22
TABELA 3 - Diferentes condições reacionais para a decomposição ácida de diferentes cultivares de batatas em banho de água empregando chapa de aquecimento e bloco digestor. Massa da amostra - 0,1000g e temperatura de 100 °C.....	40
TABELA 4 - Programa de aquecimento para a decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de diferentes cultivares de batatas. Massa da amostra - 0,3000g.....	40
TABELA 5 - Condições instrumentais do ICP OES para a determinação dos elementos químicos inorgânicos nas amostras de diferentes cultivares de batatas.....	41
TABELA 6 - Condições instrumentais para a determinação de Cd, Pb e Cr nas amostras de diferentes cultivares de batatas por GFAAS.....	42
TABELA 7 - Variáveis e níveis estudados pelo planejamento fatorial 2 ⁴ com ponto central, elaborado a partir do software Statistica® 7.0.....	43
TABELA 8 - Condições instrumentais do ICP-MS para a determinação de Cu, Mn, Zn e Fe nas amostras de diferentes cultivares de batatas.....	43
TABELA 9 - Teor de umidade obtido nas diferentes cultivares de batata (in natura) analisadas, comparadas aos valores da Tabela TACO.....	52
TABELA 10 - Teor de carbono total (TOC) e residual (RCC) das amostras de diferentes cultivares de batata. (Valor médio ± desvio padrão, n=3). Padrão de acetanilida, composta por 71,09 % de C.....	54
TABELA 11 - Parâmetros estatísticos das curvas de calibração analítica e os valores de LOQ obtidos nas análises por ICP OES das amostras de batata.....	54
TABELA 12 - Avaliação dos parâmetros de desempenho analítico, exatidão e precisão, para o método utilizado no ICP OES para a determinação dos teores de elementos inorgânicos em diferentes cultivares de batata, empregando materiais de referência certificados. (Valor médio ± desvio padrão, n= 3).....	56

TABELA 13 - Avaliação da exatidão e precisão, para o método utilizado no ICP OES para a determinação dos teores de elementos inorgânicos em diferentes cultivares de batata, empregando experimentos de adição e recuperação. (Valor médio \pm desvio padrão, n= 3).....	57
TABELA 14 - Comparação entre os teores encontrados para os constituintes inorgânicos nas cascas e nas polpas das batatas de diferentes cultivares a partir de estudos da literatura. Valores expressos em mg kg ⁻¹ em base seca.....	62
TABELA 15 - Comparação entre os teores dos constituintes químicos inorgânicos presentes nas amostras de batatas como um todo (sem levar em consideração os teores encontrados somente na casca ou somente nas polpas) em diferentes países. Valores expressos em mg kg ⁻¹ em base seca.....	63
TABELA 16 - Comparação entre os valores determinados nesse trabalho e os valores de referência estimados pela Tabela TACO 4 ^a Ed. 2011.....	65
TABELA 17 - Valores de ingestão diária a partir do consumo de batatas, levando-se em consideração o teor total dos nutrientes, em relação as quantidades estabelecidas pela RDC 269 da ANVISA e pela WHO (2012).....	66
TABELA 18 - Programa de aquecimento desenvolvido/otimizado no GFAAS para a determinação de Cd, Pb e Cr nas amostras de diferentes cultivares de batata decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas.....	71
TABELA 19 - Parâmetros estatísticos das curvas de calibração analítica e os valores de LOQ obtidos nas análises por ICP OES.....	72
TABELA 20 - Valores de recuperação obtidos para Cd, Pb e Cr em GFAAS para as amostras de batatas (BMC) decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n= 3).....	72
TABELA 21 - Teor de Cd, Cr e Pb quantificados por GFAAS nas diferentes amostras de batatas digeridas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).....	77
TABELA 22 - Teores de Cd, Cr e Pb encontrados em amostras de batatas e suas variedades na literatura científica. (Teor em base seca).....	79

TABELA 23 - Valores de ingestão diária a partir do consumo de batatas, levando-se em consideração os teores obtidos pelas frações bioacessíveis dos nutrientes, em relação as quantidades estabelecidas pela RDC 269 da ANVISA e pela WHO (2012).....86

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de Variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BAC – Batata Asterix convencional
- BDC – Batata Doce convencional
- BEC – *Background Equivalent Concentration*
- BMC – Batata Monalisa convencional
- BMO – Batata Monalisa orgânica
- BMSCC – Batata Monalisa sem casca convencional
- BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica
- CBMC – Casca de batata Monalisa convencional
- CBMO – Casca de batata Monalisa orgânica
- CONSEA – Conselho Nacional de Segurança Alimentar
- CRM – Material de referência certificado (*Certified Reference Material*)
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMT-1 – *Divalent Metal Transporter 1*
- D-PBS – *Dulbecco Phosphate buffered Saline*
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GFAAS – Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)
- HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
- ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)
- ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)
- LOQ – Limite de quantificação (*Limit of quantitation*)
- NOAEL – *No-observed-adverse-effect level*
- RCC – Teor de carbono residual (*Residual Carbon Content*)
- RGE – Extrato gástrico de coelho (*Rabbit Gastric Extract*)
- RSD – Desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*)

SBR – razão sinal do analito/sinal de fundo (*signal-background ratio*)

SGF – Fluido gástrico simulado (*simulated gastric fluid*)

SIF – Fluido intestinal simulado (*simulated intestinal fluid*)

SSF – Fluido salivar simulado (*simulated salivar fluid*)

T_a – Temperatura de Atomização

TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos

TDS – Sólidos totais dissolvidos (*total dissolved solids*)

TOC – Teor de carbono total (*Total Organic Carbon*)

T_p – Temperatura de Pirólise

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 IMPORTÂNCIA DA QUANTIFICAÇÃO DE NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS.....	26
1.2 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS DE ANÁLISE PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA INORGÂNICA DAS AMOSTRAS DE BATATAS.....	32
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 TEOR DE UMIDADE.....	38
3.2 PREPARO DE AMOSTRAS.....	39
3.3 TEOR DE CARBONO TOTAL E RESIDUAL.....	40
3.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO - ICP OES.....	41
3.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE – GFAAS.....	41
3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE - ICP-MS.....	43
3.7 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO.....	43
3.8 ENSAIOS DE BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE.....	45
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 TEOR DE UMIDADE.....	52
4.2 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRAS E TEOR DE CARBONO RESIDUAL (RCC).....	52
4.3 PERFIL INORGÂNICO DAS DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA POR ICP OES.....	54
4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR GFAAS PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cr E Pb NAS AMOSTRAS DE BATATA.....	67
4.4.1 ANÁLISE DO PERFIL TÓXICO DAS DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA POR GFAAS.....	77

4.5 ESTUDOS DAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS DOS NUTRIENTES/CONTAMINANTES INORGÂNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE BATATA.....	80
4.6 ESTUDOS DAS FRAÇÕES BIODISPONÍVEIS DOS NUTRIENTES INORGÂNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE BATATA.....	91
CONCLUSÃO.....	98
ETAPAS FUTURAS.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO 1 - TABELAS E GRÁFICOS REFERENTES AO TEXTO.....	115

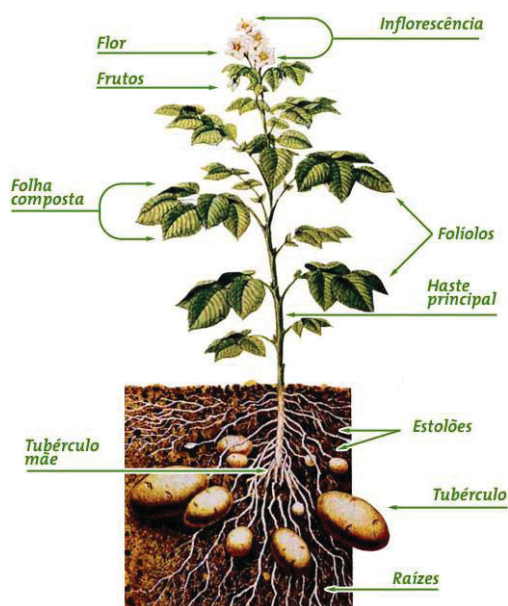
1 INTRODUÇÃO

A *Solanum tuberosum* L., também conhecida como batata inglesa, é uma planta herbácea com sistema radicular relativamente superficial, com a quase totalidade das raízes permanecendo a uma profundidade de 40-50 cm (EMBRAPA, 2016). À medida que a planta de batata cresce, ela produz um aumento das hastes no subsolo (Figura 1), conhecida como tubérculos, parte comestível da planta e a única considerada comercialmente importante. Em solos argilosos férteis e sem camadas de obstrução pode crescer até cerca de 60 cm de altura (EMBRAPA, 2016). Os tubérculos armazenam e reservam nutrientes que permitem que a planta sobreviva as diferenças climáticas, estando envolvidos também na propagação de plantas vegetativas (PADMANABHAN *et al.*, 2016). Devido a diversidade genética apresentada pela batateira, seu cultivo é possível em uma ampla variedade de tipos de solos e climas, de maneira que este tubérculo se difundiu pelo mundo a partir da colonização por parte dos países europeus em 1620 e tornou-se fundamental para a alimentação humana.

Atualmente a batata ocupa a terceira posição em termos de consumo alimentício no mundo, sendo a primeira colocada como *commodity* não pertencente aos grãos (EMBRAPA, 2022). A produção mundial relativa ao ano de 2020 foi de aproximadamente 360 milhões de toneladas, produzida em uma área de 16,4 milhões de hectares, constituindo-se numa das principais fontes de alimento para a humanidade. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas consumam batata diariamente no mundo (FAOSTAT, 2022).

No Brasil, o cultivo mais intenso da batata, juntamente com outras hortaliças, iniciou-se na década de 20, no cinturão verde de São Paulo (EMBRAPA, 1999). A produção aumentou significativamente desde o seu início, de forma que no presente momento, a batata é considerada a principal hortaliça do país, tanto em área cultivada como em preferência alimentar, com uma produção anual de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas, em uma área de cerca de 118 mil hectares (IBGE, 2020; FAOSTAT, 2022).

Figura 1 Representação da morfologia da Batata (*Solanum tuberosum*).



Fonte: ABBA, 2018.

Apesar da crença popular de que a batata só contém carboidratos, seus tubérculos (parte comestível da planta) contêm proteínas de alta qualidade, além de considerável quantidade de vitaminas e sais minerais. Dentre os nutrientes, encontram-se os macronutrientes, como potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e os micronutrientes, como ferro (Fe), zinco (Zn), entre outros (Tabela 1). Entre esses, o K é considerado o mais abundante, enquanto a concentração de Fe e Zn é baixa comparada aos cereais e às leguminosas (EMBRAPA, 1999; PADMANABHAN *et al.*, 2016). Aproximadamente 78% do P, 68% do K, 65% do N e do S, 33% do Mg, 9% do Ca, 49% do Cu, 41% do Zn, 20% Mn e 11% do Fe absorvidos pela planta são acumulados nos tubérculos. (FERNANDES; SORATTO, 2012).

Tabela 1 Composição da Batata inglesa por 100 gramas de parte comestível (tubérculo).

	Batata inglesa cozida	Batata inglesa crua	Batata inglesa frita
Energia (kcal)	52	64	267
Proteína (g)	1,2	1,8	5
vitamina C (mg)	3,8	31,1	16,3
K (mg)	161	302	489
P (mg)	24	39	70
Ca (mg)	4	4	6
Mg (mg)	5	15	14
Fe (mg)	0,2	0,4	0,4
Zn (mg)	0,2	0,2	0,4

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 2011.

Além disso, a batata possui um balanço adequado de proteína e energia, de maneira que, o consumo de porções desejáveis desse alimento (aproximadamente 0,345 kg para adultos e 0,232 kg para crianças por dia) seja suficiente para o suprimento de energia ao organismo humano. Com isso, a alimentação à base de batata necessita de menor complementação proteica do que a dieta à base de outras raízes, tubérculos e de cereais. Além do mais, a batata é também uma boa fonte de algumas vitaminas do complexo B, especialmente niacina, tiamina, vitamina B6 e, como reportado na Tabela 1, de vitamina C (EMBRAPA, 1999).

Em consequência da sua composição, a batateira é uma planta com grande exigência de nutrientes em um curto período do ciclo vegetativo, de forma que, é considerada uma cultura, altamente esgotante para o solo. Além do que, a planta inteira é colhida, deixando poucos restos da cultura na terra, tornando necessária a aplicação de fertilizantes. Os fertilizantes fornecem nutrientes como P, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, entre outros ao solo entre uma safra e outra, aumentando a produtividade agrícola (MESQUITA *et al.*, 2012; FIOROTO *et al.*, 2018). As quantidades aproximadas de nutrientes necessárias para a cultura da batata no Brasil encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Quantidades de nutrientes extraídos do solo pela cultura da batata (considerando a produção de uma tonelada de tubérculos).

Macronutrientes (kg)		Micronutrientes (g)	
Nitrogênio	2,4 – 8,2	Boro	1,4 – 9,0
Fósforo	0,3 – 1,2	Cobre	0,6 – 3,9
Potássio	3,7 – 13,3	Ferro	32,9 – 136,6
Cálcio	0,4 – 3,0	Manganês	5,4 – 24,1
Magnésio	0,2 – 0,9	Zinco	3,4 – 12,0
Enxofre	0,2 – 1,5	-	-

Fonte: FERNANDES E SORATTO, 2012.

Além dos fertilizantes, os agroquímicos também são utilizados para o cultivo da batata para evitar doenças e pragas. Segundo o sistema de agrotóxicos fitossanitários, Agrofit (2020), os dez ingredientes ativos liberados para utilização como agroquímicos para a cultura da batata pertencem ao grupo químico dos organofosforados, organoestênicos, acetados insaturados, avermectina e benzotiadiazol.

Estudos na literatura científica relatam a presença de contaminantes inorgânicos em ambos os produtos (agroquímicos e fertilizantes), sendo que os teores desses elementos dependem de alguns fatores como a produção e a origem da matéria-prima para a fabricação desses insumos. Os fertilizantes fosfatados, por exemplo, podem conter naturalmente teores elevados de contaminantes inorgânicos (Cd, Pb, As, Cr, F, Sr, Th, U, entre outros) devido a rocha matriz utilizada como matéria-prima na fabricação desses fertilizantes. A literatura indica quantidades elevadas de As (7,1 mg kg⁻¹), Cd (19,1 mg kg⁻¹)

¹) e Pb (13,2 mg kg⁻¹), sendo o Cd o contaminante majoritário, encontrado nas rochas fosfáticas (HAMAMO *et al.*, 1995, RAVEN; LOEPPERT, 1997). Além disso, quando as composições de alguns micronutrientes, como Cu, Fe, Zn e Mn estão abaixo das concentrações exigidas, os produtores de fertilizantes adicionam matérias-primas de misturas de minérios e subprodutos industriais para atingir os teores desejados desses elementos. O fato é que, a depender da matéria-prima utilizada, esse processo também pode ser uma fonte adicional de elementos potencialmente tóxicos (RODELLA, 2005; HUSGAFVEL *et al.*, 2016)

Assim como no caso da adição de micronutrientes aos fertilizantes fosfatados, os fertilizantes orgânicos também podem conter elevados teores de contaminantes inorgânicos em suas composições, visto que são compostos produzidos a partir de resíduos (lodo de esgoto, esterco e estrume proveniente de diferentes animais como bovinos, suíno e aves) ou subprodutos das indústrias (por exemplo, a alimentícia). Um exemplo de contaminação de fertilizantes orgânicos diz respeito a utilização de adubos animais, que são reconhecidamente uma fonte de enriquecimento de metais no solo, devido à presença desses elementos tóxicos nos suplementos utilizados para a alimentação dos animais (KHAN *et al.*, 2018). Em efeito, Santos *et al.* (2010) inferiram, em seus estudos sobre a utilização de fertilizantes inorgânicos e orgânicos na cafeicultura, que a presença de Cd, Cu e Zn em ambos os produtos podem elevar os níveis desses elementos químicos no solo e conseqüentemente nos diferentes cultivares plantados nesses sítios. Já Milinović *et al.* (2008) relataram que o conteúdo de contaminantes inorgânicos variou significativamente em diferentes fertilizantes a depender da relação N:P:K e de sua origem. No Brasil, o estudo conduzido por Andrade *et al.* (2017) reportou teores de As (0,1 – 10 mg L⁻¹), Cd (0,096 – 4,0 mg L⁻¹), Cr (0,1 – 8,0 mg L⁻¹) e Pb (1,0 – 20 mg L⁻¹) em diferentes amostras de fertilizantes. E diferentemente da literatura anteriormente mencionada, na qual o Cd é considerado contaminante majoritário dos fertilizantes, os elementos com maior predominância nos estudos de Andrade *et al.* (2017) foram o chumbo e o cromo.

Bem como os fertilizantes, os agroquímicos utilizados também podem sofrer contaminações de elementos químicos como As, Cd, Pb, Ni, Cr, entre outros. Estes elementos podem estar presentes na matéria-prima de fabricação, como no petróleo e resíduos industriais, assim como, podem ser adicionados intencionalmente a partir da utilização de nanopartículas modificadas que atuam como nanopesticidas (DEFARGE; VENDÔMOIS; SÉRALINI, 2018; KOOKANA *et al.*, 2014). Em um estudo sobre a toxicidade de herbicidas e pesticidas, Defarge *et al.* (2018), identificou elementos como As, Cr, Co, Pb e Ni em 22 pesticidas estudados, dos quais 11 eram a base de glifosato, pertencente a

classe dos organofosforados, os quais são utilizados no cultivo da batata (AGROFIT, 2020).

No Brasil, desde 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) tem avaliado continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal que chegam ao consumidor final. Nos anos de 2013 a 2015 o PARA analisou 742 amostras de batatas, das quais 709 apresentaram níveis de agrotóxicos dentro do limite máximo de resíduos (LMR). Porém, em 2 amostras foram detectados resíduos dos agrotóxicos acefato e forato em concentração acima do LMR e 31 amostras apresentaram agrotóxicos não autorizados para uso na cultura de batata. Já nos anos de 2017 a 2020 o PARA analisou 315 amostras de batata-doce, que apresentaram 28 agrotóxicos não autorizados para o seu cultivo, como a criomazina. Entretanto, embora se saiba dos riscos de contaminação dos agroquímicos por elementos inorgânicos potencialmente tóxicos, poucos estudos na literatura são reportados.

O problema relacionado à utilização de agroquímicos e fertilizantes consiste no fato de que elementos de conhecida toxicidade, tais como, As, Cd, Pb entre outros podem ser absorvidos pelas plantas, que posteriormente serão utilizadas na alimentação humana (XIAOBING *et al.*, 2017). Como a batata e seus derivados constituem um dos principais alimentos de consumo, o risco de contaminação gera um impacto significativo na saúde humana. De maneira que o consumo desse alimento pode estar associado a altos níveis de ingestão de contaminantes inorgânicos, visto que a ingestão alimentar é uma das principais rotas de contaminação pelo ser humano (CORGUINHA *et al.*, 2015).

Peng *et al.* (2018) avaliaram a presença de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se e Zn) em amostras de batatas cultivadas na China em solos com e sem escória (subprodutos gerados a partir da fundição de minério na purificação de metais). Todas as amostras apresentaram teores acima do valor preconizado, por agências chinesas (NY 861–2004), para Cd e algumas amostras para Pb e Se. Khan *et al.* (2017) observaram elevadas concentrações de metais no solo irrigado com águas residuais de Khushab, cidade do Paquistão, e estudaram a taxa de transferência desses elementos para as batatas. Nesse estudo, foi possível verificar que o solo estava contaminado com Zn, As, Pb, Fe, Ni, Mo, Cu e Se em diferentes níveis de concentração e que havia uma taxa de transferência significativa desses elementos para a batata, com exceção do Mo. O fator de bioconcentração ficou entre 0,06 e 20,15 mg kg⁻¹, variando do As (menor fator, 0,06 mg Kg⁻¹) ao Zn (maior fator, 20,15 mg Kg⁻¹). Hariri *et al.* (2015), avaliaram a presença de elementos inorgânicos (K, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cr, Pb e Cd) em chips de batata, no Líbano, e concluíram que várias amostras apresentaram níveis superiores ao estabelecido pela organização mundial da saúde (WHO – do inglês *World Health Organization*) para Cu,

Zn, Cd, Cr e Pb. No Brasil, poucos são os estudos realizados em relação a composição inorgânica da batata, sendo que dentre os 152 artigos reportados a partir de uma busca com as palavras “*potato*” and “*trace elements*” na base de dados *Web of Science*, somente dois eram relativos a estudos brasileiros. Corguinha et al. (2012) avaliou a presença de Cd em diferentes cultivares de batatas plantadas em solos da região do Mato Grosso e Minas Gerais devido à grande utilização dos fertilizantes fosfatados utilizados. Em seus estudos, observou-se que a maior parte do Cd encontrado permaneceu nas cascas das batatas, com exceção da batata Monalisa, em que o teor de Cd variou não somente entre os diferentes cultivares, bem como dentro da mesma área de plantação. Nos tubérculos, os teores encontrados variaram entre, não detectado (limite de detecção = $7 \mu\text{g Kg}^{-1}$) a $43 \mu\text{g Kg}^{-1}$, enquanto na casca da batata o valor chegou a $781 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de Cd em base seca de amostra. Já Bochnia (2010) avaliou os teores de Cd, Cu e Pb em amostras de batata produzidas na região de Guarapuava no Paraná. Neste estudo, observou-se que as amostras de batata que apresentaram maiores teores de Pb e Cu foram as que receberam uma maior concentração de adubo durante o ciclo vegetativo da planta. Diferentemente dos estudos de Corguinha et al. (2012), não foram detectados teores de Cd nas amostras de batatas analisadas (limite de quantificação $114,8 \text{ ng L}^{-1}$).

Visando a obtenção de batatas com menores teores de contaminantes inorgânicos, estudos que propõem o cultivo da forma orgânica vêm tomando espaço na área da agronomia e de nutrição alimentar. Dentro desse conceito de cultivo orgânico, a nutrição do solo, após a colheita da batata, é feita a partir de adubações com plantas e esterco (de animais sem suplementação alimentar), além da rotação de cultura nas áreas produtivas (como por exemplo: batata – grãos – forrageiras). Já para o controle de pragas, são utilizados produtos alternativos, como os homeopáticos e/ou cultivares de batatas mais resistentes (ROSSI *et al.*, 2011). Ainda assim, alguns trabalhos como o de Mansour et al. (2009) tem demonstrado que apesar das amostras de batata convencionais conterem maiores teores de contaminantes orgânicos e inorgânicos, as amostras orgânicas também apresentam teores consideráveis. Isso porque, a contaminação por elementos potencialmente tóxicos pode se dar através da utilização de água para irrigação contaminada, emissões industriais próxima as lavouras e até mesmo no processo de colheita entre outros fatores (SHARMA et al. 2008)

Conclui-se assim, que um monitoramento contínuo deve ser conduzido nas amostras de batata e demais alimentos, levando-se em consideração a pertinente questão de contaminação evidenciada nesses estudos.

1.1 Importância da quantificação de nutrientes e contaminantes inorgânicos em alimentos

A contaminação de alimentos gera um impacto bastante prejudicial na área de saúde, pois é considerada uma das principais fontes de exposição do ser humano frente aos elementos potencialmente tóxicos (CORGUINHA *et al.*, 2015). O conselho nacional de segurança alimentar (Consea) afirma que ao consumir um alimento contaminado, a população aumenta o risco de desenvolvimento de diversas doenças (tais como cânceres, problemas endócrinos, neurológicos e mentais, etc). De modo que a análise inorgânica de produtos alimentícios deve ser considerada de suma importância para a caracterização química dos alimentos, intencionando a segurança alimentar da população.

Como anteriormente mencionado, o processo de desenvolvimento da batateira é dependente de uma quantidade significativa de nutrientes, dentre os quais, elementos traços como: Fe, Zn, Cu, Mn, entre outros são importantes para o desenvolvimento e manutenção da batateira. Entretanto, alguns desses elementos, quando em teores superiores aos necessários para as plantas, são considerados potencialmente tóxicos. Ademais, os contaminantes inorgânicos, em geral, não são biodegradáveis e apresentam um potencial de acumulação em diversos órgãos do corpo humano, podendo ocasionar distúrbios no organismo do indivíduo, em particular para os elementos As, Cd e Pb, considerados carcinogênicos (IARC, 1987, 1993, 2004).

Dentre os elementos a serem considerados no contexto de segurança alimentar destacam-se: As, Cd, Pb, Hg, Sn, Se, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Na, Ba e Zn, conforme estabelecido pela Resolução Mercosul (RDC 42/2013; CF/12 INF/1, 2018). Dentre esses, os elementos As, Cd, Pb, Hg, Sn, Cr, Cu e Ba são aqueles que devem ser monitorados na maior parte dos alimentos, devido ao seu potencial tóxico, mesmo quando em baixas concentrações. Já os elementos Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn são aqueles que devem ser monitorados nos alimentos devido à sua essencialidade ao organismo humano. Sendo assim possível traçar/estabelecer o perfil inorgânico de uma matriz alimentícia.

Em efeito, as agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil e a *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, regulamentam os teores máximos permitidos dos contaminantes inorgânicos, bem como os teores de ingestão diária recomendados para os nutrientes presentes nos alimentos. Contudo, é importante ressaltar que nem toda substância ingerida é absorvida e utilizada pelo organismo humano (PEIXOTO, 2015). Uma vez que, durante o trânsito do alimento pelo trato gastrointestinal os nutrientes/contaminantes sofrem diversos processos de biotransformação, incluindo a ação de enzimas e processos de oxidação, complexação,

metilação, entre outros, possibilitando ou não a liberação desses nutrientes/contaminantes para a sua absorção pelo organismo humano. (VÁZQUEZ *et al.*, 2015). Isso quer dizer que, na prática, os elementos somente exercerão seus efeitos, sejam estes benéficos (nutricional) ou prejudiciais (tóxicos) para a saúde, quando estiverem efetivamente disponíveis ao organismo.

Desse modo, observa-se a necessidade de estudos relacionados à quantificação dos teores dos elementos que após o processo de digestão humana, podem se tornar disponíveis (fração bioacessível) para a absorção pelo organismo humano, como também quantificar a fração dos nutrientes que são efetivamente absorvidos pelo organismo e consequentemente empregados em diversas funções biológicas, seja para promover o crescimento do indivíduo, como também para a manutenção do organismo (fração biodisponível) (COZZOLINO, 2016; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2011).

Na área de nutrição, o termo *bioacessibilidade* é definido como a fração de um nutriente liberado da matriz (alimento) durante o processo de digestão gástrica e que se torna disponível para ser absorvido pelo epitélio intestinal.

De acordo com Potter e Hotchkiss (1998), fatores intrínsecos e extrínsecos, influenciam na disponibilidade e absorção dos nutrientes/contaminantes pelo organismo humano. Dentre os quais destacam-se a espécie química do nutriente, bem como o tipo de ligação química entre o nutriente e o alimento para os fatores intrínsecos e o estado nutricional do indivíduo e fatores genéticos, tais como idade, peso, entre outros para os fatores extrínsecos. O que significa que a determinação do teor total do nutriente ingerido pelo ser humano, não fornece informações acerca da efetiva contribuição nutricional do alimento ao nosso organismo (NAIR; AUGUSTINE, 2018).

Os estudos referentes à bioacessibilidade e a biodisponibilidade, são mais complexos quando comparados aos estudos relacionados ao teor total dos nutrientes/contaminantes nos alimentos. Em geral, a literatura está bem consolidada quanto aos procedimentos e discussões científicas relacionadas a determinação do teor total em diversos tipos de matrizes, empregando diferentes estratégias de preparo de amostras, bem como métodos de determinação, tanto para compostos orgânicos quanto inorgânicos. Entretanto, quando o assunto diz respeito à bioacessibilidade e a biodisponibilidade, esses estudos se mostram desafiadores, seja em termos do procedimento/protocolo aplicado para a obtenção das frações bioacessíveis e biodisponíveis, como também ao elevado custo e ao entendimento multidisciplinar requerido nesses estudos. Ademais, um bom conhecimento/habilidade do analista é fundamental para se garantir a qualidade analítica dessas análises, em termos de exatidão e precisão. Outrossim, esses estudos podem ser realizados tanto por ensaios *in vivo* como

por experimentos *in vitro*, sendo esse último, por simulação em laboratório das condições fisiológicas do trato gastrointestinal (HE; ZHENG, 2010; KULKARNI *et al.*, 2007). O grande desafio relacionado aos experimentos *in vitro* diz respeito à mimetização das condições *in vivo*. Os estudos *in vitro* são, em sua maioria, estáticos, não sendo capazes de simular a cinética das reações que ocorrem no processo digestivo. Além do mais esses estudos não mimetizam a complexa dinâmica e interações fisiológicas dos alimentos com os seres humanos. Por exemplo, nas três fases da digestão gastrointestinal o pH é mantido constante, bem como a atividade enzimática. Não há também a adição gradual do fluido gástrico, seguido pelo esvaziamento. Porém, somado ao custo elevado, à heterogeneidade entre os indivíduos e as questões éticas, os ensaios *in vitro* são mais comumente realizados. Ademais, o método *in vitro* apresenta algumas vantagens como boa reprodutibilidade, robustez, simplicidade e menor custo (quando comparado ao método *in vivo*), afora da maior facilidade para avaliação de cada fase do processo digestivo (BRODKORB *et al.*, 2019).

Para mimetização das etapas de digestão, o método gastrointestinal deve considerar as três áreas associadas à digestão (boca, estômago e intestino), bem como as condições físico-químicas relacionadas ao processo de digestão, tais como pH, tempo de residência do alimento no meio reacional, temperatura, ação enzimática entre outras, que ocorrem em cada etapa digestiva. (HUR; LIM; DECKER, 2011; KULKARNI *et al.*, 2007; PEIXOTO *et al.*, 2013). Assim sendo, muitos estudos de bioacessibilidade são iniciados com a simulação/mimetização do processo digestivo do alimento na fase oral, o qual leva aproximadamente 2 minutos, em seguida enzimas (como a pepsina) que atuam na etapa gástrica são adicionadas, sendo o pH ajustado para valores entre 2,5 e 3,0 e então o alimento nesse meio reacional é incubado por cerca de 2 horas em temperatura constante de 36 – 37 °C. Na etapa final do processo de digestão ocorre a mimetização da fase intestinal de modo que novas enzimas (pancreatina e bile) são adicionadas ao meio reacional e o pH é ajustado para 6,5 – 7,0, sendo a solução novamente incubada a temperatura constante de 36 – 37 °C por cerca de 2 horas. Após a simulação do processo digestivo, a fração solúvel, denominada de quimo, e a fração insolúvel são separadas por centrifugação e tratadas para posterior análise química dos elementos inorgânicos presentes no quimo.

Para os estudos de biodisponibilidade *in vitro* o sobrenadante do digerido, obtido após as sucessivas etapas de digestão (fração bioacessível), é inserido em uma cultura celular, que tem por função a mimetização da mucosa do intestino delgado, onde ocorre 90% da absorção de nutrientes do sistema digestivo. Nesses estudos são normalmente considerados o transporte e a retenção dos elementos, como também compostos presentes nesse meio pela barreira intestinal. Nessa conjunção, o conteúdo da fração

bioacessível que consegue passar pela barreira intestinal formada pelas células corresponde a fração biodisponível, a qual é analisada posteriormente, afim de se avaliar a efetiva contribuição nutricional e/ou tóxica do alimento ao organismo humano.

Entre as linhagens celulares empregadas para mimetização da mucosa intestinal humana, as células Caco-2 são as mais empregadas, pois apresentam, após diferenciação (processo de transformação e especialização das células para serem capazes de realizar uma função específica), propriedades morfológicas e funcionais semelhantes às células absorptivas do intestino delgado. (CARRIÈRE *et al.*, 2011; PEIXOTO, 2015). As células Caco-2 foram isoladas a partir do adenocarcinoma do cólon humano na década de 70. E em um estudo conduzido por Chantret, *et al.* (1988) no final década de 80, elucidou a capacidade dessas células de sofrerem diferenciação espontânea desenvolvendo uma série de características comumente associadas aos enterócitos do intestino delgado. O desenvolvimento do fenótipo similar ao enterócito é evidente quando as células atingem confluência (cobertura da área de cultura, como frascos ou poços). Em efeito após a formação da monocamada celular os pesquisadores observaram microvilosidades de borda em escova, bem como o aumento de várias enzimas digestivas, incluindo a sacarose isomaltase e lactase (CHANTRET *et al.*, 1994). O fato é que a partir dos estudos de Chantret *et al.* numerosas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de se explorar os mecanismos envolvidos em uma diversificada gama de nutrientes, incluindo glicose, aminoácidos, minerais entre outros (SHARP, 2005), fato esse que pode ser observado pelo crescente número de publicações anuais. Em uma busca na base de dados *Web of Science* com os termos “*bioavailability*” AND “*Caco-2*”, observa-se uma média de aproximadamente 270 artigos por ano, nos últimos 5 anos. Segundo Sharp (2005) a grande vantagem associada a utilização das células Caco-2 está relacionada ao fato de serem derivadas do organismo humano e manterem suas características semelhantes as células da barreira epitelial durante os experimentos. Isso porque quando se utilizava outros modelos como por exemplo de roedores para os estudos sobre transporte intestinal, alguns problemas como a geração de ácido ascórbico por parte dos roedores influenciavam nos estudos de absorção de alguns elementos como o Fe. Já a utilização de enterócito isolados apresentavam como desvantagem a alteração da morfologia durante os ensaios.

Dentro desse contexto, alguns estudos têm investigado a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos elementos químicos em diversos alimentos. Tognon (2012) avaliou a bioacessibilidade de Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu e Zn em frutas, hortaliças e cereais. Os macroelementos (Ca, Mg, Na e K) apresentaram, maior bioacessibilidade que os microelementos (Cu, Fe e Zn). Bertin *et al.* (2016) estudou a potencialidade da *Sarcocornia ambigua* (sal verde ou sal de planta) como fonte nutricional e, assim como no estudo de Tognon, os macroelementos apresentaram maior bioacessibilidade (de 65 à 80%), com

exceção do Ca que apresentou 3% de fração bioacessível. Neste estudo, os microelementos como V, Cr, Co, Cu e Li apresentaram uma fração bioacessível maior que 50%. É válido ressaltar que a fração bioacessível é a razão entre o teor bioacessível e o teor total de cada elemento na amostra. (TOGNON, 2012; BERTIN *et al.*, 2016).

Szymczycha-Madeja, Welna e Pohl (2015) observaram teores bioacessíveis, em termos de fração mássica (m/m) para Ba (32,2%), Ca (44,5%), Cr, (44,8%), Cu (24,1%), Fe (6,6%), Mg (69,6%), Mn (28,4%), P (84,6%), Sr (46,8%) e Zn (59,5%) em infusões de café. Já nos estudos realizados por Peixoto *et al.* (2016) os teores bioacessíveis de Al (5–12%), Ba (74–120%), Cd (3–11%), Cr (5–19%), Cu (22–74%), Fe (1–30%), Mg (47–98%), Mn (19–59%), P (19–115%) e Zn (15–31%) variaram de acordo com o tipo de chocolate em pó analisado. Esses estudos demonstraram que as frações bioacessíveis variam significativamente de um alimento para outro, como, por exemplo, o Ca nos estudos de Tognon e Bertin, bem como para matrizes semelhantes como no estudo de Peixoto *et al.* (2016). Tal fato está relacionado a presença de diferentes substâncias químicas nos alimentos, as quais podem ajudar na quebra de ligações, solubilização, formação de compostos insolúveis, ou seja, fazendo com que o elemento químico fique mais ou menos bioacessível. É importante mencionar que diferenças entre os protocolos aplicados para os estudos *in vitro* de bioacessibilidade também podem influenciar nos dados de bioacessibilidade dos elementos. Isso porque, além dos estudos supracitados tratarem de diferentes matrizes, as quais influenciam nos tipos de ligações dos elementos, diferentes métodos de digestão *in vitro* foram utilizados pelos autores para os ensaios de bioacessibilidade. No método utilizado por Tognon (2012) utilizou somente as enzimas em solução aquosa (pepsina, pancreatina e bile), enquanto nos outros dois estudos, além das enzimas, soluções que mimetizam os fluidos gástricos e intestinais foram utilizadas. Os valores pH (1,75 – 7,0; 1,2 – 6,8 e 2,0 – 7,0), velocidade de agitação (90 rpm, não reportado e 250 rpm) e tempo de digestão (7 hrs, 4 hrs e 4 hrs) para Tognon, Bertin *et al.* e Szymczycha-Madeja *et al.*, respectivamente, também variaram entre os estudos. Fatos esses que podem gerar resultados distintos, dificultando a comparação significativa entre as frações bioacessíveis. Visto que do ponto de vista químico, deve-se levar em consideração as constantes de solubilidade de cada analito, bem como alguns parâmetros como a força iônica das soluções utilizadas e a ocorrência de hidrólise (BRODKORB *et al.*, 2019; PEIXOTO, 2015).

Assim sendo, com o intuito de propor um método padrão a ser utilizado por pesquisadores de toda a parte, um grupo de cientistas elaboraram um protocolo intitulado: INFOGEST *Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion*, o qual encontra-se publicado na revista Nature Protocols (BRODKORB *et al.*, 2019).

Quanto aos estudos referentes à fração biodisponível, Milani et al. (2020) observou que embora todos os analitos estudados (Al, Cu, Sr, Mn e Zn) apresentassem uma significativa fração bioacessível, de aproximadamente 50% para os elementos com exceção do Cu, a fração biodisponível foi consideravelmente menor. Ainda que todos os analitos tenham apresentado pequenas variações entre o compartimento apical (parte de retenção) e o compartimento basolateral (relativo ao transporte, ou seja, o que passou pela barreira intestinal), apenas os elementos Sr e Mn foram quantificáveis no compartimento basolateral, variando entre não detectado a 6% (Sr) e 2% a 4% (Mn), respectivamente. Aguilera-Velázquez et al. (2023) verificou que o As inorgânico, um conhecido contaminante do arroz, apresentou 79% de biodisponibilidade quando se avaliou diretamente no arroz cozido. Entretanto, quando o arroz cozido passou pelo processo digestivo, a fração biodisponível foi reduzida pela metade, (\approx 39%) fato este que deve ser considerado para a avaliação da estimativa do risco dos elementos na saúde humana.

O entendimento da necessidade dos estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade ao longo dos anos é refletido, não só na criação do protocolo harmonizado da INFOGEST, como também no significativo aumento do número de trabalhos publicados nessa área. Ao realizar uma busca na base de dados *Web of Science* com os termos “*bioaccessibility*” and “*inorganic elements*” or “*trace elements*”, observou-se 506 artigos publicados até o presente momento, entretanto, apenas 21% (aproximadamente 105 artigos) correspondem a bioacessibilidade em alimentos. Para o termo biodisponibilidade, a base de dados é grande pois muitos são os artigos referentes aos estudos de biodisponibilidade de fármacos. Porém ao realizar uma busca sobre a biodisponibilidade de nutrientes e/ou contaminantes inorgânicos em alimentos nos últimos 5 anos, apenas 20 artigos foram encontrados. De fato, para ambos os estudos aqui mencionados, um aumento significativo foi observado nesses últimos 5 anos, representando 67% dos artigos científicos publicados.

Dentre os trabalhos encontrados, incluindo estudos sobre as frações bioacessíveis e/ou biodisponíveis, somente 45 trabalhos foram desenvolvidos em nível nacional, dos quais nenhum dos trabalhos reportados realizou estudos com amostras de batatas, objeto de investigação do presente estudo. Desta forma, percebe-se que apesar da literatura apresentar uma quantidade considerável de estudos relacionados frente à caracterização do perfil inorgânico de diferentes tipos de cultivares de batata ao redor do mundo, há escassez de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade, em relação aos diferentes cultivares de batatas no Brasil. Como anteriormente mencionado, é de significativa importância a realização de estudos relacionados a bioacessibilidade e a efetiva absorção (biodisponibilidade) dos elementos no organismo, uma vez que a partir desses estudos será possível conhecer/entender a efetiva contribuição nutricional da

batata na dieta humana, como também possíveis efeitos tóxicos advindos da presença de contaminantes inorgânicos. Sendo possível avaliar de forma mais profunda o impacto desse alimento na saúde humana.

1.2 Técnicas espectrométricas de análise para caracterização química inorgânica das amostras de batatas

Para atender as exigências de qualidade e confiabilidade nas análises de elementos inorgânicos presentes em diferentes concentrações, nas diversas matrizes alimentares, técnicas espectrométricas como: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, (GFAAS – do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*); Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, (ICP OES – do inglês - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) e Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS – do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) são comumente utilizadas.

A técnica GFAAS envolve a quantificação da energia absorvida de uma fonte de radiação eletromagnética incidente para a promoção de elétrons da camada de valência dos elementos químicos no estado fundamental – absorção por átomos livres no estado gasoso. Os átomos de cada elemento absorvem radiação em comprimentos de onda específicos, e esta absorção é dependente de suas concentrações. Para gerar átomos livres (atomização) no estado gasoso, esse método emprega um forno de grafite, o qual consiste em um tubo de grafite pirolítico aquecido eletricamente. O sistema é parcialmente fechado, contribuindo para o aumento do tempo de residência dos átomos no caminho óptico, o que torna a análise química muito sensível, podendo detectar os analitos em nível de concentração na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ à ng L^{-1} . Uma característica marcante da técnica, diz respeito ao fato de ser, em geral, monoelementar (SKOOG, HOLLER, CROUCH, 2009).

Ao contrário do GFAAS, as técnicas de ICP OES e ICP-MS são multielementares e baseiam-se na excitação dos elétrons quando estes são expostos a uma elevada energia térmica (6000 a 1000 K). A técnica de ICP OES é fundamentada na detecção da radiação eletromagnética emitida por átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta. O princípio fundamental da espectrometria de emissão óptica consiste na propriedade dos átomos emitirem radiação eletromagnética quando submetidos a determinadas condições de variações de energia térmica. Nesse caso, a atomização e a ionização dos elementos químicos ocorrem dentro de um plasma de argônio. Essa técnica permite realizar a quantificação dos elementos químicos de forma simultânea, como também obter curvas analíticas de calibração lineares considerando extensos intervalos de concentração. É uma técnica que apresenta detectabilidade na

ordem de mg L^{-1} à $\mu\text{g L}^{-1}$. O ICP-MS apesar de utilizar o mesmo sistema de atomização/ionização da técnica anterior, baseia-se na detecção das diferentes razões massa/carga dos elementos. Nesta técnica após a etapa de atomização/ionização, os íons gasosos são introduzidos no espectrômetro de massas, onde são separados em função de sua razão massa/carga. A seleção dos íons pode ocorrer em diferentes analisadores de massas, sendo o mais comum os quadrupolos, mas há ainda os analisadores de setor magnético, analisadores de duplo foco e analisadores de tempo de voo, os quais variam em resolução, tempo de varredura e rendimento. Nos quadrupolos os íons são separados de acordo com sua razão massa carga através da aplicação de campos elétricos. Ajustando-se as voltagens de forma apropriada, cria-se uma trajetória estável para que íons de uma determinada razão massa/carga passem pelo analisador e cheguem ao detector. Assim como o ICP OES, essa técnica permite a quantificação simultânea de praticamente 70 elementos e também a obtenção de curvas analíticas em até quatro ordens de grandeza. Quanto ao nível de detectabilidade é o mais sensível entre as técnicas citadas, de modo que a maioria dos elementos podem ser detectados em níveis menores do que partes por bilhão (SKOOG, HOLLER, CROUCH, 2009).

Além dos fundamentos citados de cada técnica, cada uma delas apresenta suas características intrínsecas, de modo que essas técnicas se complementam na promoção da caracterização do perfil químico das matrizes estudadas. Como por exemplo no caso do GFAAS que apesar de ser monoelementar, o que pode ser considerado uma desvantagem, apresenta um menor consumo de gás argônio para a realização das análises, tornando os estudos menos custosos. Já a técnica de ICP-MS une a análise multielementar a limites de detecção e quantificação menores que o GFAAS, apresentando a melhor detectabilidade. Porém, como desvantagem, os efeitos de matriz tornam-se detectáveis para concentrações de concomitantes maiores que cerca de 500 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo necessário a diluição da amostra, a alteração do procedimento de introdução de amostras, ou então a utilização de outra técnica como ICP OES para maiores teores dos analitos. Assim sendo, para a escolha da técnica analítica a ser utilizada, fatores como os princípios intrínsecos de cada técnica, os teores dos analitos totais e suas frações bioacessíveis e biodisponíveis devem ser avaliados.

Observa-se na literatura que trabalhos com poucos elementos a serem analisados tendem a utilizar a técnica de GFAAS, visto a característica de ser (em geral) monoelementar, o baixo custo associado às análises e ao nível de detectabilidade da técnica. De fato, Menezes et al. (2020) quantificou os teores totais As, Cd e Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostra alimentícias, Cámara-Martos et al. (2019) avaliou a presença de Se e Cd ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) nas frações bioacessíveis de alimentos orgânicos utilizados na etapa de introdução alimentar de bebês, e Chiocchetti et al. (2020) investigaram a presença de Cd e Pb (mg

Kg^{-1}) em amostras de cogumelos secos após o cozimento desse alimento bem como após a digestão gastrointestinal, empregando a técnica de GFAAS. Em contrapartida, ao ser analisar maiores quantidades de amostra e de elementos químicos, técnicas analíticas empregando plasma como fonte de íons, ICP OES e ICP-MS são mais empregadas, sendo escolhidas de acordo com o nível de detectabilidade de cada técnica e/ou ainda de acordo com os fatores intrínsecos de cada uma delas, levando-se em consideração a capacidade de teor de sólidos dissolvidos (TDS), o sistema de introdução de amostra, entre outros. Nos estudos de Oliveira et al. (2019), o qual analisou As, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn tanto para o teor total como para as frações bioacessíveis em amostras de mel, a técnica de ICP OES apresentou limites de quantificação satisfatórios para os microelementos como $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd, $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para Mn, $1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para e $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu, enquanto que no estudo conduzido por Erdemir, Sahan e Gucer (2019) maior detectabilidade foi necessária para a quantificação de Cd, Mn, Zn, Cu e Pb em alimentos para bebês a base de arroz e vegetais. Outro fator a ser levado em consideração diz respeito ao equipamento disponível para realização das análises, uma vez que diferentes tipos de preparo de amostras podem ser utilizados para adequação/compatibilização da amostra a técnica analítica disponível.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar as diferentes cultivares de batata, em termos de sua composição inorgânica, avaliando os elementos químicos presentes nessas amostras em relação à sua essencialidade e/ou toxicidade para a saúde humana. Avaliar a efetiva contribuição nutricional da batata por meio de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade.

Objetivos específicos

- Investigar estratégias de preparo de amostras para a matriz, batata, visando à determinação do teor total dos elementos inorgânicos;
- Desenvolver métodos analíticos validados para a determinação dos teores dos elementos inorgânicos, empregando-se técnicas analíticas como GFAAS, ICP OES e/ou ICP-MS;
- Simular o processo gastrointestinal *in vitro* para os estudos de bioacessibilidade;
- Executar procedimentos de cultivo celular com a linhagem celular Caco-2, visando a aplicabilidade dessas células nos estudos de biodisponibilidade;
- Quantificar as frações bioacessível e biodisponível dos elementos químicos em estudo no organismo humano (simulação *in vitro*) a partir do consumo de batata;
- Avaliação do real efeito nutricional e/ou tóxico do consumo da batata, a partir dos teores observados nas frações bioacessíveis e biodisponíveis presentes nas diferentes cultivares de batata.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados (balões volumétricos, béqueres, pipetas, frascos de plástico etc.) foram descontaminados antes de sua utilização. Para isso, foram deixados em banho de HNO_3 10% v v⁻¹ por 24 horas, no mínimo, e, em seguida, enxaguados com água ultrapura, pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA), ao menos 3 vezes.

Soluções Padrão Analítica de 1000 mg L⁻¹ em HNO_3 1% v v⁻¹, (Carlo Erba Analyticals) de cada analito (Sb, As, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mn, Mo, Ni, P, Se, Sr, Tl, Sn, V, Zn, Si, Ba, Ag, Ca, Mg, Na e K) foram empregadas no preparo das soluções padrão multielementar para construção das curvas analíticas de calibração, e mantidas em refrigeração durante todo o período de execução do trabalho. Os modificadores químicos foram preparados a partir da solução padrão contendo 10 µg L⁻¹ $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Palladium Matrix Modifier, Sigma Aldrich). Todas as soluções foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas, marca LABMATE Pro LMP volumes de 100, 1000 e 10000 µL.

Para as decomposições ácidas e preparo das soluções intermediárias utilizou-se HNO_3 65% m m⁻¹ (Carlo Erba Analyticals, grau P.A) e H_2O_2 30% m v⁻¹ (Vetec de grau P. A). O ácido utilizado neste estudo foi previamente ultra purificado por um processo de destilação, por meio de um destilador de ácido Distillacid (Berghof Products®), operando em temperaturas de 10°C - 20°C abaixo do ponto de ebulição do ácido (sistema *subboiling*).

As amostras de batatas estudadas nesse trabalho foram adquiridas em comércio local da cidade de Curitiba/PR. Todas as amostras foram previamente congeladas, liofilizadas e armazenadas em dessecador para posterior preparo de amostras e análise química. As amostras foram pesadas utilizando-se a balança analítica marca Bel, modelo M124Ai. As Figuras 2 e 3 indicam as diferentes espécies de batata, empregadas nesse estudo. As batatas cultivadas a partir da utilização de fertilizantes e agroquímicos foram consideradas neste trabalho como amostras cultivadas de forma convencional e se referem a batata Monalisa (BMC), batata Asterix (BAC) e batata doce (BDC), enquanto a batata Monalisa (BMO) corresponde a batata cultivada de forma orgânica. As amostras BMC e BMO correspondem a batata em sua totalidade, ou seja, contendo polpa e casca. Um subgrupo de amostras que também foi analisado corresponde a casca da batata Monalisa convencional (CBMC), casca da batata Monalisa orgânica (CBMO) e as batatas Monalisa convencional e orgânica sem casca, BMSCC e BMSCO, respectivamente.

Figura 2 Batata Monalisa, cultivada de forma convencional - BMC e Batata Monalisa cultivada de forma orgânica - BMO



Figura 3 Batata Asterix - BAC e Batata doce – BDC, ambas cultivadas de forma convencional.



Os reagentes utilizados para os ensaios de ¹bioacessibilidade foram adquiridos de acordo com o protocolo da Nature (2019) intitulado INFOGEST com exceção do extrato gástrico de coelho (RGE), enquanto que para os ensaios de ²biodisponibilidade os reagentes foram adquiridos de acordo com o protocolo realizado por Peixoto (2015). Ambos os reagentes se encontram listados abaixo:

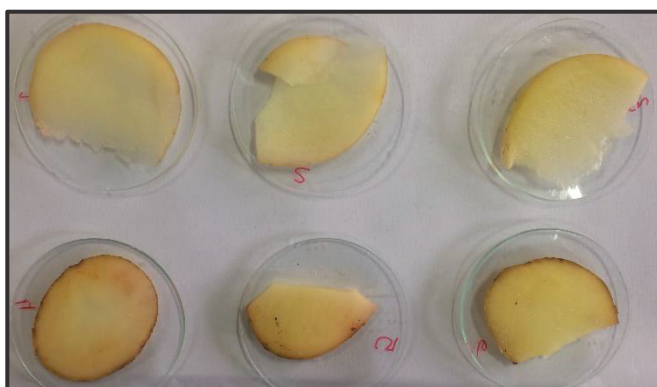
- ¹α-amilase salivar humana (Sigma-Aldrich)
- ¹Pepsina suína (Sigma-Aldrich)
- ¹Bile bovina (Sigma-Aldrich)
- ¹Pancreatina suína (Sigma-Aldrich)
- ¹CaCl₂ (H₂O)₂ (Merck)
- ¹NaOH (Merck)
- ¹HCl (Sigma-Aldrich)
- ¹KCl (Merck)
- ¹KH₂PO₄ (Merck)
- ¹NaHCO₃ (Merck,)
- ¹NaCl (Merck)
- ¹MgCl₂ (H₂O)₆ (Merck)
- ¹ (NH₄)₂CO₃ (Sigma-Aldrich)
- ¹CaCl₂ (H₂O)₂ (Sigma-Aldrich)
- ¹Amiloglucosidase (Sigma-Aldrich)
- ²Células Caco-2, adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro;

- ²Meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com alta concentração de glicose, 4,5 g L⁻¹ (Cultilab);
- ²Soro fetal bovino inativado (Cultilab);
- ²Solução de Aminoácidos não essenciais 100x – NEAA (do inglês *Non-Essential Amino Acids*) (Merck);
- ²de L-glutamina 200 mM (Merck);
- ²Piruvato de sódio 100 mM (Merck);
- ²HEPES 1M (do inglês *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) (Merck);
- ²Solução de antibióticos – 100 IU mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Merck)
- ²Soluções de sais balanceados D-PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (do inglês *Dulbecco Phosphate Buffered Saline*) (Merck);
- ²Solução 2,5 g L⁻¹ tripsina/ 0,2 g L⁻¹ EDTA (Merck);

3.1 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito nos métodos físico-químicos para análise de alimentos, do instituto Adolfo Lutz, 4ª edição, com algumas adaptações. A massa de aproximadamente 2,000 g foi pesada em balança analítica, sobre um vidro relógio de peso conhecido, as amostras foram pesadas em triplicata, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 Teor de umidade realizados para as amostras de batatas.



Posteriormente a pesagem, as amostras foram colocadas em estufa à T \cong 105 °C durante 4 horas. Nesse intervalo de tempo, as amostras foram pesadas, após retorno a temperatura ambiente (mantidas em dessecador), em sucessivos intervalos de tempo de uma hora para o acompanhamento da perda de massa. Após atingir valor de massa

constante, o monitoramento da perda de massa foi encerrado, e o valor de massa obtido foi empregado no cálculo do teor de umidade.

O teor de umidade foi obtido conforme equação 1:

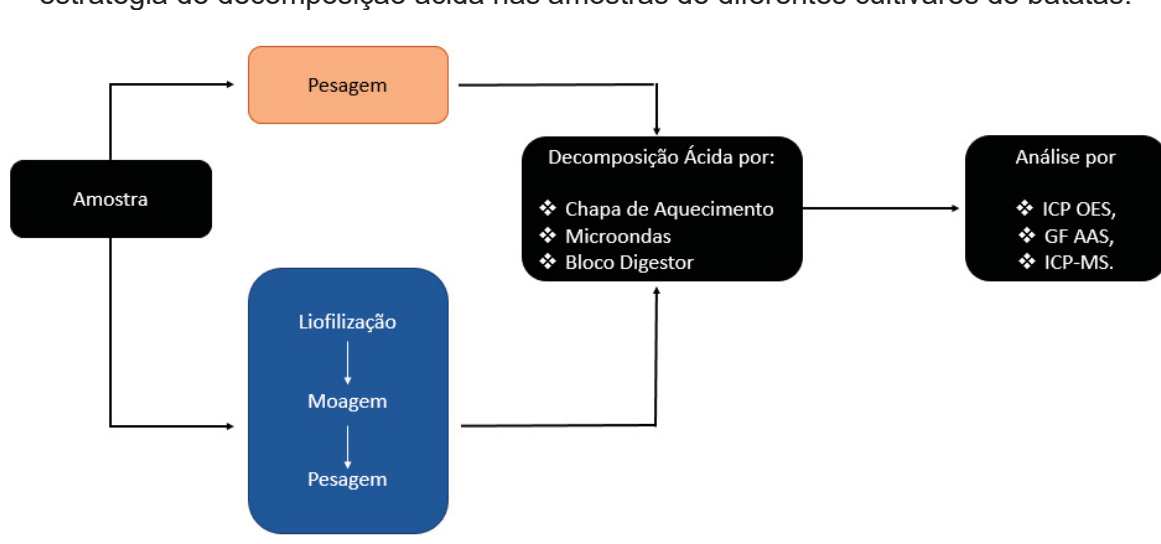
$$\text{Teor de Umidade (\%)} = \frac{M_{ai} - M_{af}}{M_{ai}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: M_{ai} = massa da amostra antes da secagem e M_{af} = massa da amostra após secagem.

3.2 Preparo de Amostras

Diferentes procedimentos de preparo de amostras aplicando-se a decomposição das amostras em meio ácido foram avaliados, conforme esquema proposto na Figura 5.

Figura 5 Fluxograma dos procedimentos de preparo de amostras aplicando-se a estratégia de decomposição ácida nas amostras de diferentes cultivares de batatas.



Inicialmente, foram avaliadas três estratégias de preparo de amostras por decomposição ácida: decomposição ácida (banho de água) em chapa de aquecimento (Modelo 114, Ethiktechnology), decomposição ácida em bloco digestor (Thermoreaktor TR 300, Merck) e decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (modelo Multiwave Go, Anton Paar).

Para a decomposição em chapa de aquecimento e em bloco digestor, diferentes níveis de concentração (2 a 13% $m\ v^{-1}$) de ácido nítrico (HNO_3) juntamente com 1,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% $m\ v^{-1}$ foram estudados (Tabela 3). Diferentes tempos de decomposição da amostra também foram avaliados nessa etapa. Para esses experimentos a massa de amostra utilizada foi de aproximadamente 0,1000 g (massa em base úmida para chapa de aquecimento e em base seca para a chapa de aquecimento e

bloco digestor). Nestas digestões, a temperatura foi mantida relativamente constante à 100 °C, sendo monitorada com auxílio de um termômetro. As amostras foram pesadas diretamente no tubo de ensaio. Ao final do procedimento, todas as soluções e/ou suspensões resultantes foram avolumadas para 15,0 mL com água ultrapura. (KRUG; ROCHA, 2016; VIRGILIO *et al.*, 2016).

Tabela 3 Diferentes condições reacionais estudadas para a decomposição em meio ácido de amostras de diferentes cultivares de batatas em banho de água empregando chapa de aquecimento e aquecimento em bloco digestor. Massa da amostra - 0,1000g e temperatura constante de 100 °C.

Condição de preparo de amostras	Tempo de contato com ácido (min)	H ₂ O ₂ 30% m v ⁻¹ (mL)	[HNO ₃] _{final} (% v v ⁻¹)	Tempo de Aquecimento (min)
1	30	1	13	30
2	0	1	13	30
3	0	1	6	30
4	0	1	2	30

O preparo de amostras em forno micro-ondas também foi avaliado para a matriz de estudo e empregou-se 2,5 mL HNO₃ 65% m m⁻¹, 1,0 mL de H₂O₂ 30% m v⁻¹ e 4,5 mL de água ultrapura. A massa utilizada foi de 0,3000 g de amostras de batatas em base seca e úmida. O programa de aquecimento empregado no forno de micro-ondas está apresentado na Tabela 4. (ARCEUSZ; RADECKA; WESOLOWSKI, 2010; ARPADJAN *et al.*, 2008; HAJAR; SULAIMAN; SAKINAH, 2014; KRUG; ROCHA, 2016).

Tabela 4 Programa de aquecimento para a decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de diferentes cultivares de batatas. Massa da amostra - 0,3000g.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Permanência (min)
1	125	5	10
2	180	8	10
Refrigeração	50	-	20

3.3 Teor de Carbono Total e Residual

As determinações do teor de carbono total (TOC – do inglês *total organic carbon*) nas amostras foram realizadas a partir do equipamento de análise elementar: Vario EL III Element Analyzer, locado no departamento de solos da UFPR – Agrárias. O reagente acetanilida, contendo teor exatamente conhecido, 71,09 % de C foi utilizado como padrão.

As determinações do teor de carbono residual (RCC - do inglês *residual carbon content*), foram realizadas por ICP OES, conforme condições instrumentais descritas na Tabela 5. A análise foi realizada no comprimento de onda (λ) de 193,03 nm (linha de emissão atômica do C) no modo de vista radial. As amostras analisadas foram previamente

decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas, conforme as condições reportadas na Tabela 4. A curva de calibração analítica do carbono foi preparada a partir de uma solução padrão de concentração 4,00 g L⁻¹ de carbono (20 g L⁻¹ de ureia - CH₄N₂O) em HNO₃ 9% v v⁻¹, conforme sugerido por Gouveia et al. (2001). O intervalo da curva analítica foi de 1,0 – 2000 mg L⁻¹ de carbono (C).

3.4 Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP OES

A fim de se quantificar os elementos químicos inorgânicos presentes nas amostras de batatas utilizou-se o ICP OES dual view, modelo, OPTIMA 8300; marca, Perkin Elmer, locado no Departamento de Química da UTFPR Ecoville. Utilizou-se o equipamento em configuração modo axial para os microelementos (Sb, As, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Tl, Sn, V, Zn, Si, Ba, Ag) e em modo radial para os macroatômicos (Ca, Mg, P, Na e K). As condições instrumentais utilizadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 Condições instrumentais do ICP OES para a determinação dos elementos químicos inorgânicos nas amostras de diferentes cultivares de batatas.

Potência de Radiofrequência	1300 W
Vazão do gás do Plasma	8,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,2 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	0,55 L min ⁻¹
Sistema de Nebulização	<i>Meinhard / Câmara ciclônica</i>
Replicatas	3
Vazão da bomba peristáltica	1,5 mL min ⁻¹
Elementos (λ nm)	Ag 328,068 – As 193,759 – Cu 327,393 –
Linhas de emissão atômicas (I)	K 766,490 – Li 670,784 – Mg 285,213 – P 177,495 – Sb 206,833 – Se 196,026 – Si 251,611
Elementos (λ nm)	Ba 233,527 – Be 313,042 – Ca 393,366 –
Linhas de emissão iônicas (II)	Co 228,616 – Cr 267,716 – Fe 238,204 – K 769,896 – Mn 257,610 Mo 202,031 – Ni 231,604 – Sn 189,927 – Sr 407,771 – V 309,311 – Zn 213,856

3.5 Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite - GFAAS

O equipamento GFAAS marca Shimadzu de caráter multiusuário, modelo AA 6800F/6800G, equipado com corretor de fundo lâmpada de deutério e aquecimento longitudinal, locado no laboratório do Grupo de Química Analítica Ambiental, no centro politécnico da UFPR, foi utilizado para o desenvolvimento do método de quantificação de As, Cd, Pb e Cr. As condições instrumentais obtidas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 Condições instrumentais para a determinação de Cd, Pb e Cr nas amostras de diferentes cultivares de batatas por GFAAS.

Condições do equipamento	As	Cd	Pb	Cr
Comprimento de onda / nm	193,7	228,8	283,3	357,9
Corrente da lâmpada / mA	12	8	20	10
Largura de fenda / nm	1,0	1,0	1,0	1,0
Corretor de Fundo	ON	ON	ON	ON
Lâmpada de Deutério				
Modo de aquisição de Sinal	Altura do pico	Absorbância Integrada	Absorbância Integrada	Absorbância Integrada
Modo de Calibração	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$
Replicatas	3	3	3	3
Tubo de Grafite	Tubo de grafite pirolítico	Tubo de grafite pirolítico	Tubo de grafite pirolítico	Tubo de grafite pirolítico
Modo de Aquecimento	Aquecimento Longitudinal	Aquecimento Longitudinal	Aquecimento Longitudinal	Aquecimento Longitudinal

Para otimização dos métodos de análise, utilizou-se HNO_3 1% v v⁻¹ (ultrapuro) fortificado com concentrações conhecidas de cada um dos elementos químicos (2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, Cr e Pb) e comparou-se o resultado com as amostras de BMC fortificadas nas mesmas concentrações. Nessas análises foram avaliados os valores do sinal de absorbância, a forma do sinal transiente (por meio do parâmetro *signal-background ratio*, SBR) bem como os valores de recuperação. Em todas as análises no GFAAS injetou-se um volume de 20 μL de ácido fortificado e quando necessário, 5 μL de modificador químico de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ de concentração também otimizada para esse volume. Visando a avaliação do comportamento térmico do Cd, Pb e Cr nas amostras de batatas, foram construídas curvas de temperaturas de pirólise (T_p) e atomização (T_a). As faixas de temperatura foram avaliadas de forma crescente em incrementos de 50 ou 100 °C, a depender do analito em questão. Desta forma, fixou-se a temperatura de pirólise ótima encontrada e então se avaliou a temperatura de atomização em intervalos crescentes de temperatura, com incrementos de 50 ou 100 °C. Para o elemento As um planejamento fatorial 2⁴ com ponto central foi realizado (Tabela 7). As variáveis analisadas foram: temperatura de pirólise, temperatura de atomização, tempo de pirólise, e concentração do modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Anexo 1 – Tabela A2 Matriz do planejamento). Duas variáveis respostas foram analisadas, recuperação e o parâmetro SBR. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e em duplicata no ponto central.

Tabela 7 Variáveis e níveis estudados pelo planejamento fatorial 2^4 com ponto central, elaborado a partir do software Statistica® 7.0.

Variável	(-)	Ponto Central	(+)
Tp (°C)	500	850	1200
Ta (°C)	2000	2200	2400
Tempo de pirólise (s)	2	3	4
[Pd(NO ₃) ₂]	2,5	5,0	7,0

3.6 Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-MS

A fim de se quantificar os elementos químicos inorgânicos presentes nas frações bioacessíveis e biodisponíveis das amostras de batatas utilizou-se o ICP-MS com detector do tipo quadrupolo simples, modelo, RQ, marca, Thermo Scientific®, locado no Laboratório de Análises de Minerais e Rochas (LAMIR), no centro politécnico da UFPR. Utilizou-se o equipamento para análise dos microelementos (Cu, Mn, Zn, Fe). As condições instrumentais utilizadas estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 Condições instrumentais do ICP-MS para a determinação de Cu, Mn, Zn e Fe nas amostras de diferentes cultivares de batatas.

Potência de Radiofrequência	1548,6 W
Vazão do gás do Plasma	14,02 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,79 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	1,06 L min ⁻¹
Sistema de Nebulização	<i>Micromist 50μL min⁻¹ / Câmara ciclônica</i>
Vácuo	1,445 mbar
Replicatas	3
Velocidade da bomba	40,0 rpm
Voltagem das Lentes iônicas	
CCT	- 46 V
Angular	- 280 V
Deflecção	- 35 V
Razões isotópicas	Cu ⁶³ , Fe ⁵⁶ , Mn ⁵⁵ , Zn ⁶⁶

3.7 Parâmetros de Desempenho Analítico

Para as análises no ICP OES e ICP-MS as curvas analíticas de calibração em diferentes intervalos de concentração foram preparadas em meio de HNO₃ 1% v v⁻¹ (Anexo 1).

Para os analitos Cd, Pb e Cr quantificados por GFAAS empregou-se curvas de calibração analíticas em intervalos de 0,05 – 1,0 μ g L⁻¹ (Cd), 0,2 – 5,0 μ g L⁻¹ (Pb) e 0,5 – 6,0 μ g L⁻¹ (Cr), respectivamente, em meio de HNO₃ 1% v v⁻¹.

O intervalo de linearidade para as curvas analíticas de calibração obtidas, foi considerado aceitável quando valores do coeficiente de determinação (R^2) foi maior que 0,99 de acordo com o INMETRO (2020).

Em relação aos ensaios de exatidão, para os elementos Ca, Mg, P, K, Cu, Mn, Zn, Ba e Fe empregou-se materiais de referência certificados (CRM) de matrizes vegetais tais como: folhas de espinafre, folhas de tomate e folhas de chá verde (SRM 1570a e SRM 1573a e GBW 10052 respectivamente). No entanto, como não possuíamos um material de referência certificado para todos os elementos analisados, testes de adição e recuperação também foram realizados com o objetivo de se avaliar a exatidão dos métodos de determinação utilizados. Desta forma, a recuperação do analito foi avaliada adicionando-se concentrações conhecidas de cada analito em

estudo, na amostra, previamente a sua análise. Após aproximadamente um mês de contato entre o analito e a amostra, a amostra fortificada com o analito foi submetida ao preparo de amostras empregado nesse trabalho e analisada. O critério de aceitação para a recuperação entre 80 e 120 % foi selecionado de acordo com os valores preconizados pela Comunidade Europeia diretiva 96/23/EC de 2002 e INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2020. A recuperação foi calculada a partir da equação 2.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{amostra fortificada}] - [\text{amostra}]}{[\text{solução padrão}]} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

A precisão foi avaliada através da repetitividade dos experimentos de recuperação, de acordo com a equação 3 abaixo. A precisão é medida sob condições de repetitividade ou sob condições de reprodutibilidade e expressa na forma de coeficiente de variação – (CV (%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo – RSD (%) (INMETRO, 2020).

$$\% \text{ RSD} = \frac{s}{\bar{m}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, s corresponde ao desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado e \bar{m} à média dos resultados obtidos através das replicatas ($n=3$).

Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) foram determinados de acordo com o DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020) a partir das equações 4 e 5 a seguir:

$$LOD = \frac{3,3 s}{b} \quad (\text{Eq. 4}) \quad e \quad LOQ = \frac{10 s}{b} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, s corresponde ao desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado e b ao coeficiente angular (inclinação da curva analítica).

Para técnica de ICP OES, os valores de LOD e LOQ também foram determinados, conforme sugerido por Thomsen, Schatzlein e Mercurio (2003), de acordo com as equações 6 e 7:

$$LOD = \frac{3 * RSD * BEC}{100} \quad (Eq. 6) \qquad LOQ = \frac{10 * RSD * BEC}{100} \quad (Eq. 7)$$

$$BEC = \frac{C_{padr\tilde{a}o}}{SBR} \qquad SBR = \frac{I_{padr\tilde{a}o} - I_{fundo}}{I_{fundo}}$$

Onde: RSD é o desvio padrão relativo para 10 medidas do branco analítico; BEC (*Background Equivalent Concentration*) concentração equivalente de fundo; SBR (*Signal-to-Background ratio*) é a razão entre sinal analítico e sinal de fundo; $C_{padr\tilde{a}o}$ corresponde a concentração da solução de referência; $I_{padr\tilde{a}o}$ e I_{fundo} correspondem as intensidades de emissão do analito e do branco (fundo).

Para a técnica GFAAS, os limites de detecção e quantificação também foram calculados de acordo com o proposto por Welz e Sperling especificamente para a técnica de absorção atômica por forno de grafite. (WELZ; SPERLING, 1999). Para esses cálculos utilizou-se as equações 8 e 9 abaixo:

$$LOD = \frac{S_{blank}}{b} t_{(f,\alpha)} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \quad (Eq. 8) \qquad e \qquad LOQ = \frac{9 S_{blank}}{b} \quad (Eq. 9)$$

Sendo: S_{blank} : o desvio padrão de 10 análises do branco analítico; b: a inclinação da reta (Slope ou coeficiente angular); m: o número de medida da amostra (igual a 1); n: o número de medidas da solução do branco analítico (10 análises) e; t: (*t student* para 95% do intervalo de confiança).

3.8 Ensaios de Bioacessibilidade e Biodisponibilidade

Dois protocolos para a digestão *in vitro* foram empregados, o protocolo da INFOGEST (2019) e o protocolo sugerido por Peixoto (2015), o qual é uma adaptação do protocolo sugerido por Laparra *et al.*, (2003). Os métodos foram denominados por protocolo 1IN e protocolo 2PE, respectivamente. Para os estudos de biodisponibilidade o protocolo sugerido por Peixoto (2015) foi empregado com algumas modificações. Ambos os estudos foram conduzidos no Laboratório de projetos e processos ambientais e Laboratório de cultivo do grupo de toxicologia celular na UFPR devido a impossibilidade de realização desses estudos no Instituto Tecnológico de Alimentos (ITAL), em razão da pandemia

causada pela COVID-19, como previamente sugerido quando no início desse trabalho. Para a medir o pH das diferentes etapas do processo digestivo utilizou-se fitas de pH, bem como um pHmetro (modelo SP1800, marca Sensoglass). Para a etapa de separação entre as frações bioacessíveis e insolúveis utilizou-se papel filtro qualitativo de 80 g m⁻² inseridos em funis de vidro previamente descontaminados.

- Protocolo de bioacessibilidade P 1IN (adaptado do INFOGEST, 2019)

O método consiste na simulação, *in vitro*, das etapas de digestão que ocorrem na boca (fase oral), no estômago e no intestino. Para tal, fluidos digestivos sintéticos foram preparados conforme a Tabela A1 (Anexo 1). Os fluidos preparados foram estocados a – 20 °C, conforme preconizado pelo INFOGEST 2019.

O processo simulado de digestão foi realizado empregando-se 2,500 g de batata liofilizada (Batata Monalisa Convencional (BT)). Todas as soluções utilizadas foram previamente aquecidas a temperatura de 37 °C. A massa de amostra foi adicionada a tubos falcon de 50 mL, ao qual 2,0 mL do fluido oral (SSF – do inglês *simulated salivar fluid*); 12,5 µL da solução de CaCl₂ 0,3 mol L⁻¹ e 0,488 mL de água ultrapura foram acrescentados, para um volume final de 5,0 mL. A mistura permaneceu em incubação por 2 minutos em um banho termostático (banho Dubnoff Q226M, Quimis), a 37 °C, sob agitação orbital constante de 120 rpm.

Em seguida, 4,0 mL do fluido gástrico (SGF – do inglês *simulated gastric fluid*), 0,334 mL de pepsina 10 mg mL⁻¹; 10,0 µL de CaCl₂ 0,075 mol L⁻¹ e 0,446 mL de água ultrapura foram acrescentados à mistura resultante da etapa de digestão da fase oral, perfazendo um volume de 10,0 mL. O pH da mistura foi corrigido para pH = 3,0 adicionando-se um volume suficiente de solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ e foi novamente incubada a 37 °C e agitação de 120 rpm durante 2 horas. Após a etapa de simulação da digestão gástrica, foram adicionados à mistura, cerca de 4,0 mL do fluido intestinal (SIF- do inglês *simulated intestinal fluid*), 2,5 mL de pancreatina; (133 mg mL⁻¹); 1,5 mL de bile (200 mg mL⁻¹); 20 µL de CaCl₂ (0,3 mol L⁻¹) e 1,720 mL de água ultrapura, totalizando um volume de 20,0 mL. Nesta etapa o pH foi corrigido para pH = 7,0 adicionando-se volume suficiente de solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Após a correção do pH, a mistura resultante foi levada ao banho termostático por 2 horas, a temperatura de 37 °C e agitação de 120 rpm.

Ao final do período de incubação, a amostra na solução simuladora da digestão gastrointestinal foi colocada em um banho de água à 100 °C por 5 minutos e posteriormente em um banho de gelo por 5 minutos de maneira a inativar as atividades enzimáticas. Então as amostras foram centrifugadas (centrífuga CT 6000 e Laboratech) durante 30 minutos a

3000 rpm visando a separação da fração solúvel (fração bioacessível) da fração insolúvel (amostra não digerida), sendo posteriormente filtradas, digeridas e analisadas.

- Protocolo de Bioacessibilidade P 2PE (PEIXOTO, 2015)

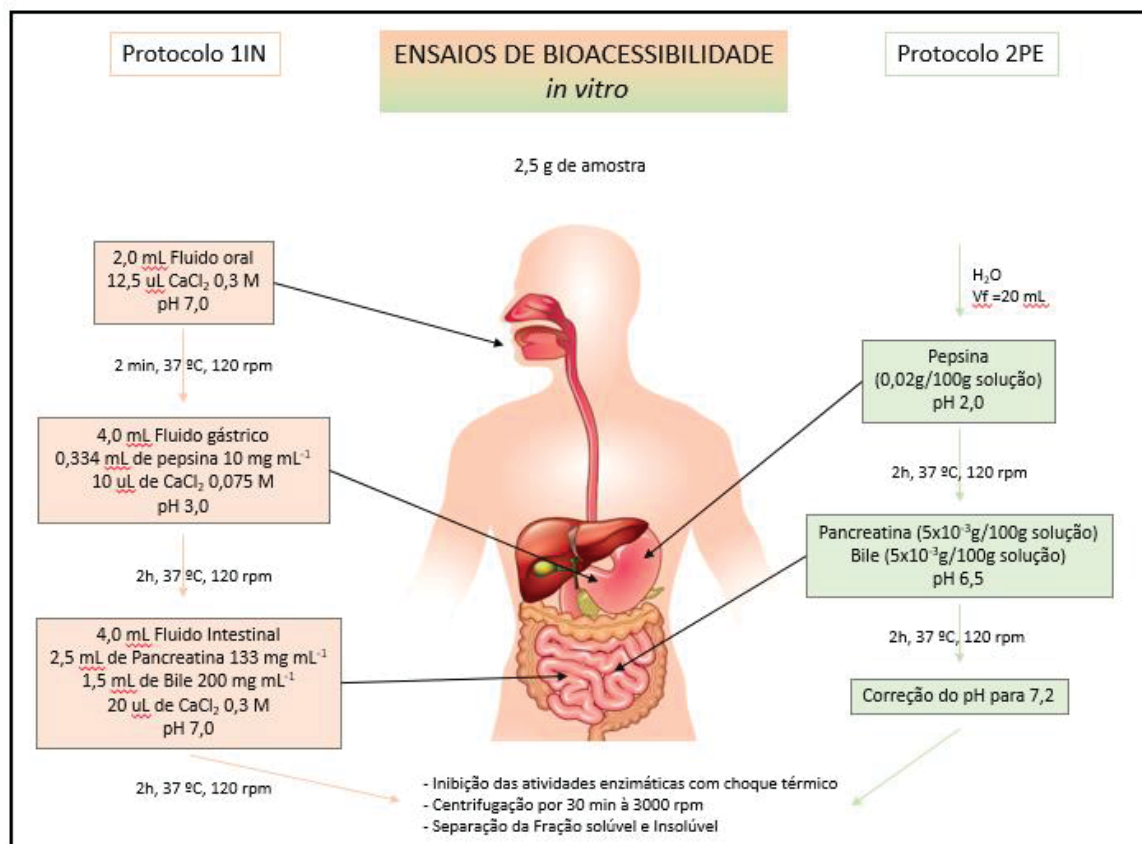
Nesse protocolo a etapa de digestão oral é desconsiderada, sendo assim o processo de digestão *in vitro* se inicia na etapa de digestão gástrica. Para esse método, massas de amostra em torno de 2,500 g de batata: batata liofilizada, batata cozida e batata *in natura* foram pesadas. Para inicializar a etapa de digestão gástrica as amostras (2,5000 g) foram inseridas em um tubo falcon de 50 mL, acrescentando-se água ultrapura até atingir uma massa de 20 mg, sendo em seguida o pH corrigido para pH = 2,0 com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. Uma quantidade suficiente de solução de pepsina 10% m v⁻¹ foi adicionada à mistura de forma a se obter uma proporção de 0,02 g pepsina/100 g de solução a ser digerida. Após a adição de pepsina, a mistura resultante foi avolumada com água ultrapura, até atingir um valor de massa final de 30 g. Em seguida, essa mistura foi incubada em um banho termostático, por 2 horas, à T \cong 37 °C e agitação orbital constante de 120 rpm.

Para a etapa de simulação da digestão intestinal, o pH do digerido gástrico foi ajustado para pH = 6,5 adicionando-se um volume suficiente de solução de NH₄OH 25% m v⁻¹. Em seguida, adicionou-se 0,4% m v⁻¹ de pancreatina e 2,5% m v⁻¹ de bile, de modo a obter uma mistura de 5 x 10³ g de pancreatina/100g de solução e 3 x 10² g de bile/100 g de solução. Novamente a mistura resultante foi incubada em banho termostático por 2 horas, a T \cong 37 °C e 120 rpm.

Ao final do período de incubação o pH foi ajustado para pH = 7,2 com solução de NH₄OH 25% v v⁻¹ e assim como no protocolo 1IN, as misturas foram colocadas em um banho de água à 100 °C por 5 minutos e posteriormente em um banho de gelo por 5 min. Então as amostras foram centrifugadas (centrífuga CT6000, Laboratech) durante 30 minutos a 3000 rpm visando a separação da fração solúvel (fração bioacessível) da fração insolúvel (amostra não digerida) sendo posteriormente filtradas, digeridas e analisadas.

A representação esquemática de ambos os protocolos de digestão *in vitro* para os estudos de bioacessibilidade está apresentada na Figura 6.

Figura 6 Representação esquemática dos ensaios de bioacessibilidade *in vitro*. *Figura central obtida em <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/orgaos-do-corpo-humano.htm> acessado em 08 de julho de 2021.



As frações solúveis (bioacessíveis) e insolúveis foram decompostas utilizando-se a radiação assistida por micro-ondas conforme programa de aquecimento detalhado na Tabela 4 (seção 3.2).

O cálculo das frações bioacessíveis foram realizados a partir do teor dos elementos (em fração mássica) na fração bioacessível em relação ao teor total dos elementos (em fração mássica) presentes na amostra, conforme Equação 10:

$$\text{Fração bioacessível (\%)} = \frac{\text{analito na fração bioacessível}}{\text{analito na amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

Um balanço de massa foi aplicado para se avaliar a exatidão das análises químicas referentes aos teores dos analitos encontrados na fração bioacessível e na fração da amostra não digerida, pelo teor total desses analitos presentes nas amostras de batatas, conforme equação 11:

$$\text{Recuperação bioacessibilidade} = \frac{\text{teor do analito na fração bioacessível} + \text{teor do analito na fração insolúvel}}{\text{teor total do analito na amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

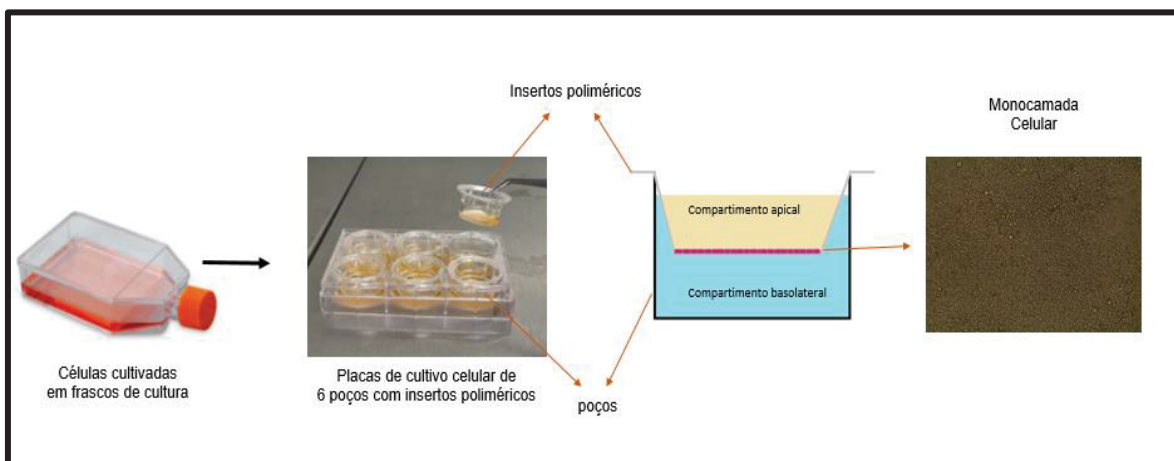
Os ensaios de biodisponibilidade foram realizados a partir das células Caco-2, adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro, as quais apresentaram passagens (número de subculturas que as células passaram) entre 34 e 40. As células foram mantidas e cultivadas em frascos com área de cultivo de 25 cm² e 75 cm² a depender da quantidade de células. Nos frascos de cultivo foram adicionados 5 mL (garrafas de 25 cm²) e 10 mL (garrafas de 75 cm²), do meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g L⁻¹) suplementado com 20% v v⁻¹ de soro fetal bovino inativado, 1% v v⁻¹ de piruvato de sódio 100 mM, 1% v v⁻¹ de HEPES 1M e 1% v v⁻¹ de solução de antibióticos.

Os frascos de cultivo celular, com as células e o meio de cultura, foram mantidos em uma incubadora (NuAire NU-5100, Purecell) a 37 °C e atmosfera controlada com 5% de CO₂ e 95% de ar, para a expansão das células. A depender do crescimento das células o meio de cultura antigo foi retirado e um novo meio foi acrescentado a cada 48 – 72 horas. Quando as células atingiram no mínimo 70% de confluência (cobertura da área de cultivo dos frascos) os subcultivos foram realizados. Para tal, os meios presentes nas garrafas foram aspirados e as células foram lavadas com 2,0 mL de D-PBS. Em seguida adicionou-se 3,0 mL de solução tripsina/EDTA aos frascos de cultivo e incubou-se de 5 a 10 min, para que houvesse a dissociação das células. Após esse tempo, 6,0 mL de meio, de DMEM suplementado, foram adicionados as garrafas de forma a cessar a ação da tripsina/EDTA, sendo o conteúdo transferido para tubos falcons de 15 mL e centrifugados (DT 4500, Daiki) por 5 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado enquanto o pellet (formado pelas células) foi ressuspensionado em 6,0 mL do meio de cultura (DMEM suplementado) e transferido para novos frascos de cultura ou para os insertos poliméricos (*Transwell*[®]). A cultura das células nos insertos poliméricos foi feita a partir da adição de 5 x 10⁴ células cm⁻² (aproximadamente 240000 células por poço) no compartimento apical juntamente com 1,5 mL do meio de cultura, ao tempo em que no compartimento basolateral 2,0 mL de meio de cultura foram adicionados. Para a contagem das células utilizou-se uma câmara de Neubauer. Assim como na fase de expansão das células nos frascos de cultivo, as placas com os insertos poliméricos foram incubadas a 37 °C e atmosfera controlada com 5% de CO₂ e 95% de ar e os meios dos compartimentos apicais e basolaterais foram trocados a cada 48 – 72 horas até a formação e diferenciação das monocamadas celulares. Para verificação da formação e diferenciação da monocamada celular um microscópio de laboratório invertido (DM IL LED, Leica) e um sistema de medida de resistência elétrica transepitelial ((TER, do inglês *Transepithelial Electrical Resistance*) (ERS-2, Millicell[®]) equipado com eletrodo MERSSTX01 foi utilizado.

Após a formação e diferenciação da monocamada celular nos insertos poliméricos, os ensaios de biodisponibilidade foram realizados aspirando-se os meios de

cultura presente em ambos os compartimentos e adicionando-se 1,5 mL da fração bioacessível ao compartimento apical e 2,0 mL de uma solução salina composta por 0,4 g L⁻¹ de KCl, 0,35 g L⁻¹ de NaHCO₃, 8,0 g L⁻¹ de NaCl e 1,0 g L⁻¹ de C₆H₁₂O₆ ao compartimento basolateral. Posteriormente, as placas de cultura celular foram incubadas a 37 °C a atmosfera controlada com 5% de CO₂ e 95% de ar por 2 horas. Na Figura 7 é apresentada uma ilustração sobre os ensaios de biodisponibilidade.

Figura 7 Representação esquemática do sistema experimental *in vitro* utilizado para os ensaios de biodisponibilidade.



Durante a simulação da fração biodisponível a TER foi medida a cada 30 min de forma a verificar a integridade das monocamadas celulares. Ao fim do período de 2 horas as soluções presentes em ambos os compartimentos foram recuperadas por aspiração e armazenadas em tubos falcons de 15 mL para posterior mineralização ácida utilizando-se a radiação assistida por micro-ondas conforme programa de aquecimento detalhado na Tabela 4 (seção 3.2), e análise dos teores metálicos pelas técnicas espectrométricas. Nesse caso, devido aos baixos teores dos elementos a serem quantificados, utilizou-se 1,5 mL dos compartimentos apicais e 2,0 mL dos compartimentos basolaterais para a etapa de mineralização.

O cálculo das frações biodisponíveis foram realizados a partir do teor dos elementos (em fração mássica) na fração biodisponível em relação a fração bioacessível dos elementos (em fração mássica) presentes na amostra, conforme Equação 12:

$$\text{Fração biodisponível (\%)} = \frac{\text{analito na fração biodisponível}}{\text{analito na fração bioacessível}} \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

Assim como na fração bioacessível, um balanço de massa foi aplicado para se avaliar a exatidão das análises químicas referentes aos teores dos analitos encontrados na fração biodisponível.

3.9 Análise Estatística

Os ensaios/medidas analíticas foram realizados em no mínimo 3 replicatas e os resultados foram apresentados em termos de média \pm desvio padrão. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de fator único (ANOVA), teste Tukey e teste t_{student} , com auxílio dos softwares Statistica[®] 7 e Excel (Microsoft 365). Para essas análises as diferenças foram consideradas significativas para um $p(\text{value}) < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Teor de umidade

Os teores de umidade das amostras de batata, Monalisa convencional (BMC) e orgânica (BMO), batata asterix (BAC) e batata doce (BDC), são apresentados na Tabela 9. Esses resultados foram comparados com os valores listados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (TACO, 2011).

A Tabela TACO apresenta um único valor para a batata inglesa crua, não sendo feita uma discriminação em relação a variedade referente a cultura da batata. Ao aplicar um teste t_{student} bicaudal com 95% de confiança observou-se que todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao valor expresso na Tabela TACO. Entretanto, é necessário ressaltar que a Tabela TACO é um instrumento informativo, não possuindo caráter normativo.

Tabela 9 Teor de umidade obtido nas diferentes cultivares de batata (*in natura*) analisadas, comparadas aos valores da Tabela TACO.

Amostras	Teor de Umidade Encontrado (%)	Teor de umidade Tabelado (TACO) (%)
BMC	87 ± 0,002	83
BMO	81 ± 0,01	
BAC	80 ± 0,01	
BDC	73 ± 0,02	

BMC – batata Monalisa convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; BAC – batata Asterix convencional e BDC – batata doce convencional.

O teor de água (% umidade) presente no alimento é um dos parâmetros mais comumente determinados em análises de rotina. Isso ocorre, pois, o teor de umidade tem influência direta no armazenamento e na qualidade dos produtos alimentícios. A presença de água em determinadas temperaturas está relacionada ao favorecimento da propagação de fungos e a produção de micotoxinas, ambos prejudiciais à saúde humana (RASCHEN *et al.*, 2014).

4.2 Estratégias de Preparo de Amostras e Teor de Carbono Residual (RCC)

Dentre as diferentes formas de preparo de amostras estudadas, a decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas foi a que melhor apresentou eficiência de decomposição da amostra (em relação à decomposição em chapa de aquecimento e em bloco digestor), obtendo valores satisfatórios em termos de exatidão e precisão. Tal fato ocorre devido à associação de temperaturas e pressões elevadas com reagentes oxidantes, como HNO_3 e H_2O_2 . Sob essas condições, há uma diminuição na viscosidade e

tensão superficial dos reagentes, o que favorece o umedecimento e a penetração do solvente extrator na matriz. Além disso, a digestão em frascos fechados permite que o HNO_3 se regenere após a oxidação dos compostos orgânicos devido à presença de O_2 na fase gasosa (refluxo). O uso de H_2O_2 auxilia e melhora o processo de digestão, pois fornece maior quantidade de O_2 ao meio reacional, auxiliando na regeneração do HNO_3 . Assim, como bem relatado e consolidado na literatura, ocorre uma decomposição eficaz da matéria orgânica com conseqüente liberação dos analitos para a fase aquosa. Além disso, esse método de decomposição promove baixo teor de sólidos dissolvidos, sendo adequado para análise por ICP OES e ICP-MS (BARELA *et al.*, 2017; BIZZI *et al.*, 2017; SAVIO *et al.*, 2014).

O refluxo gerado no interior dos tubos de teflon também favorece na obtenção de baixos teores de carbono residual (RCC - do inglês *residual carbon content*) o que também é desejável, em particular para as técnicas de ICP OES e ICP-MS. Isso ocorre, visto que pequenas quantidades de compostos orgânicos no plasma favorecem um aumento na eficiência de nebulização e transporte dos aerossóis para o atomizador, elevando o sinal analítico quando comparado as soluções isentas de qualquer teor de carbono. Além do que, a presença de baixas concentrações de carbono está associada a uma melhora na eficiência de ionização de alguns elementos químicos (os que apresentam elevada energia de ionização) por meio de reações de transferência de carga com o carbono (BARELA *et al.*, 2017; BIZZI *et al.*, 2017; SAVIO *et al.*, 2014). Entretanto, teores elevados de RCC são prejudiciais para as técnicas de plasma, pois podem levar a instabilidade do plasma, com conseqüente perda do nível de detectabilidade dessas técnicas (elevados valores para o LOD/LOQ). O carbono em excesso pode ser depositado na superfície da tocha causando a obstrução do sistema de nebulização, os quais geralmente possuem baixa capacidade para o TDS (do inglês *total dissolved solids*) (BARELA *et al.*, 2017). Dessa forma, anteriormente a determinação dos nutrientes e dos elementos potencialmente tóxicos presentes nas amostras de batata, avaliou-se a eficiência do preparo de amostra em meio ácido assistido por radiação micro-ondas. Essa etapa foi realizada a fim de se avaliar qual das amostras estudadas poderia apresentar uma maior complexidade de matriz de forma a dificultar a mineralização da amostra. Os teores de carbono total (TOC) e residual nas amostras antes e após a etapa de preparo de amostras, podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 Teor de carbono total (TOC) e residual (RCC) das amostras de diferentes cultivares de batata. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3). Padrão de acetanilida, composta por 71,09 % de C apresentou recuperação de 98%.

Amostras	BMC	BMO	BAC	BDC
TOC (% m m ⁻¹)	38 \pm 0,07	39 \pm 0,09	40 \pm 2	38 \pm 0,6
RCC (% m m ⁻¹)	4,5 \pm 0,3	4,7 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3	4,5 \pm 0,4

BMC – batata Monalisa convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; BAC – batata Asterix convencional e BDC – batata doce convencional.

A literatura indica que valores de RCC de até 13 % (m m⁻¹) são aceitáveis para as técnicas de ICP OES e ICP-MS, pois não causam interferência no sinal dos analitos (ARAUJO *et al.*, 2002; BIZZI *et al.*, 2011). Assim sendo, pode-se concluir a eficiência da decomposição assistida por radiação micro-ondas nas amostras de batata, visto que os valores de RCC encontram-se abaixo de 5%. Segundo os preceitos de validação de métodos analíticos, a amostra com maior complexidade, geralmente, é empregada para o desenvolvimento do método. Pois entende-se que, se o método é seletivo para uma matriz mais complexa também o será para as matrizes mais simples e semelhantes. No presente estudo, as variedades de batata apresentaram valores de RCC próximos, de maneira que todas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento dos estudos em relação ao preparo de amostra e ao método de determinação. A amostra de batata Monalisa convencional foi a escolhida para tais procedimentos.

4.3 Perfil inorgânico das diferentes cultivares de batata por ICP OES

Após o estudo do RCC, as amostras previamente digeridas foram analisadas por ICP OES. As curvas analíticas de calibração dos elementos determinados apresentaram coeficientes de determinação (R^2) acima dos limites estabelecidos pelas agências reguladoras ($R^2 > 0,99$), INMETRO (2020) e Comunidade Europeia (2002). Os parâmetros estatísticos das curvas de calibração analítica, bem como o LOQ podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 Parâmetros estatísticos das curvas de calibração analítica e os valores de LOQ obtidos nas análises por ICP OES das amostras de batata.

Analito	Curva Analítica de Calibração	R^2	Intervalo	LOQ ^o	LOQ*
Macro			mg L⁻¹	mg L⁻¹	mg L⁻¹
Ca	$y = 7930x + 3901,1$	0,99	0,5 – 50	0,08	0,02
Mg	$y = 26352x + 12908$	0,99	0,5 – 75	0,05	5×10^{-4}
P	$y = 234,1x + 143,93$	0,99	5 – 125	3,89	0,15
K	$y = 69,553x + 146,02$	0,99	50 – 300	4,98	0,36

Continua na próxima página

Analito	Curva Analítica de Calibração	R ²	Intervalo	LOQ ^o	LOQ [*]
Micro			µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Cu	$y = 106,85 + 4233,9x$	0,99	40 – 500	3,36	0,45
Mn	$y = 439,92x - 534,7$	0,99	20 – 500	0,02	0,03
Zn	$y = 13,101x - 474,54$	0,99	80 – 500	0,19	2,04
Ba	$y = 58,338x - 66,704$	0,99	5 – 250	0,02	0,07
Fe	$y = 2,2602x - 8,8810$	0,99	20 – 1000	0,22	0,37

^o LOQ calculado segundo Thomsen, Schatzlein e Mercurio, 2003.

^{*} LOQ calculado segundo INMETRO, 2020 e Comunidade Europeia, 2002.

Como pode ser observado, os valores de LOQ calculados a partir do BEC (concentração equivalente do sinal de fundo, do inglês *background equivalent concentration*), são geralmente menores para os microelementos. Isso ocorre, pois, o BEC é considerado como a razão entre os sinais das espécies interferentes e das espécies de interesse. De modo que é possível, a partir desse parâmetro, subtrair o sinal de fundo intrínseco a técnica de emissão. Uma explicação para que o efeito de correção do BEC seja pronunciado para os microelementos são as baixas concentrações desses analitos na matriz, de maneira que estes elementos são mais susceptíveis as interferências espectrais (causadas pela grande quantidade de linhas espectrais emitidas pelos elementos químicos). Assim sendo, o cálculo do LOQ a partir do BEC, gera valores mais próximos ao real para os microelementos (THOMSEN, SCHATZLEIN E MERCURIO, 2003).

Para verificação da exatidão e precisão do método foram utilizados tanto a análise dos CRM, como o método de adição e recuperação (Tabelas 12 e 13). Na tabela 13, o valor esperado corresponde as concentrações adicionadas, levando-se em consideração a diluição do teor do analito na amostra para os cálculos na etapa de adição dos padrões. Em ambos os métodos utilizados foram obtidos valores de recuperação (80 – 120%) e RSD (< 10%) dentro dos limites preconizados para todos os analitos, corroborando a eficiência do método de quantificação.

Tabela 12 Avaliação dos parâmetros de desempenho analítico, exatidão e precisão, para o método utilizado no ICP OES para a determinação dos teores de elementos inorgânicos em diferentes cultivares de batata, empregando materiais de referência certificados. (Valor médio \pm desvio padrão, n= 3)

Folhas de espinafre (SRM 1570a)				
Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	15260 \pm 660	15337 \pm 536	101	3,5
K	29000 \pm 260	32187 \pm 770	111	2,4
Mg	-	-	-	-
P	5187 \pm 67	6006 \pm 161	116	2,7
Ba	-	-	-	-
Cu	12,22 \pm 0,86	14,15 \pm 0,51	116	1,3
Fe	-	-	-	-
Mn	76,0 \pm 1,2	83,6 \pm 3,6	110	5,3
Zn	82,3 \pm 3,9	91,8 \pm 5,4	112	5,9
Folhas de tomate (SRM 1573a)				
Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	50450 \pm 550	53912 \pm 1005	107	1,9
K	26760 \pm 480	30451 \pm 1068	110	3,5
Mg	-	-	-	-
P	2161 \pm 28	2569 \pm 87	119	3,4
Ba	-	-	-	-
Cu	4,7 \pm 0,14	3,8 \pm 0,05	81	1,8
Fe	367,5 \pm 4,3	366,1 \pm 11,4	100	0,5
Mn	246,3 \pm 7,1	249,4 \pm 5,5	101	2,7
Zn	30,94 \pm 0,55	31,96 \pm 1,28	103	4,0
Folhas de chá verde (GBW 10052)				
Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	12100 \pm 300	11753 \pm 378	97	3,2
K	15500 \pm 700	16895 \pm 189	109	1,1
Mg	2200 \pm 80	2197 \pm 85	100	3,9
P	2800 \pm 100	3006 \pm 66	107	2,2
Ba	41 \pm 4	43 \pm 1	105	3,5
Cu	24 \pm 1	26 \pm 0,6	108	3,1
Fe	322 \pm 23	328 \pm 21	102	8,9
Zn	35 \pm 2	36 \pm 0,6	104	1,7

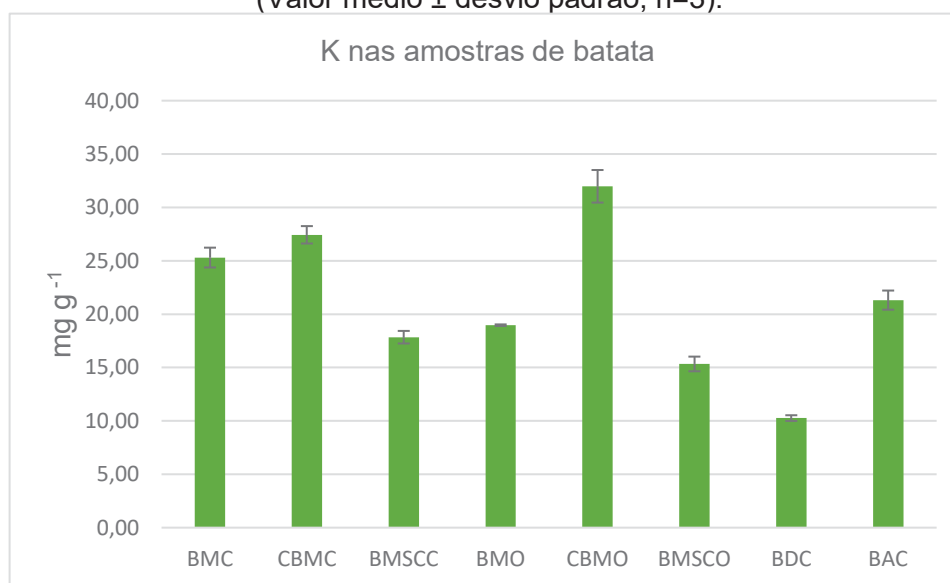
Tabela 13 Avaliação da exatidão e precisão, para o método utilizado no ICP OES para a determinação dos teores de elementos inorgânicos em diferentes cultivares de batata, empregando experimentos de adição e recuperação. (Valor médio \pm desvio padrão, n= 3).

	Teor do Analito na Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teor do Analito Esperado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teor do Analito encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec (%)
Ca	6827 \pm 646	680	699 \pm 30	102
	6827 \pm 646	11700	11890 \pm 161	98
	6827 \pm 646	21700	21252 \pm 622	102
Mg	31078 \pm 2294	3100	3273 \pm 19	105
	31078 \pm 2294	17770	18903 \pm 33	106
	31078 \pm 2294	27770	28135 \pm 778	101
Mn	< 500*	< 500	< 500	-
	< 500	10000	10125 \pm 71	101
	< 500	20000	19991 \pm 638	100
P	50708 \pm 2373	5070	5586 \pm 127	110
	50708 \pm 2373	22675	23628 \pm 355	104
	50708 \pm 2373	32675	32612 \pm 743	100
Fe	134 \pm 32	< 500	< 500	-
	134 \pm 32	10030	10537 \pm 143	105
	134 \pm 32	20030	19605 \pm 605	98
Zn	< 500	< 500	< 500	-
	< 500	10000	10284 \pm 145	103
	< 500	20000	20160 \pm 521	100
Ba	0,87 \pm 0,12	40	39 \pm 0,2	97
	0,87 \pm 0,12	60	57 \pm 1,4	95
	0,87 \pm 0,12	80	75 \pm 1,1	95
Be	< 5**	40	38 \pm 0,6	94
	< 5	60	55 \pm 0,2	92
	< 5	80	74 \pm 1,4	93
Cd	< 5	40	38 \pm 0,2	94
	< 5	60	54 \pm 0,4	90
	< 5	80	72 \pm 1,6	90
Cr	< 5	40	37 \pm 0,5	92
	< 5	60	59 \pm 0,7	98
	< 5	80	73 \pm 1,8	91
Co	< 5	40	39 \pm 0,08	98
	< 5	60	56 \pm 0,4	94
	< 5	80	74 \pm 1,5	93
Mo	< 5	40	41 \pm 0,3	102
	< 5	60	57 \pm 1,2	96
	< 5	80	78 \pm 1,2	97
Ni	< 5	40	34 \pm 0,8	84
	< 5	60	50 \pm 0,8	83
	< 5	80	67 \pm 1,3	84
V	< 5	40	44 \pm 0,7	111
	< 5	60	66 \pm 0,8	110
	< 5	80	84 \pm 1,9	105

*1º ponto da curva para macroelementos / ** 2º ponto da curva para microelementos

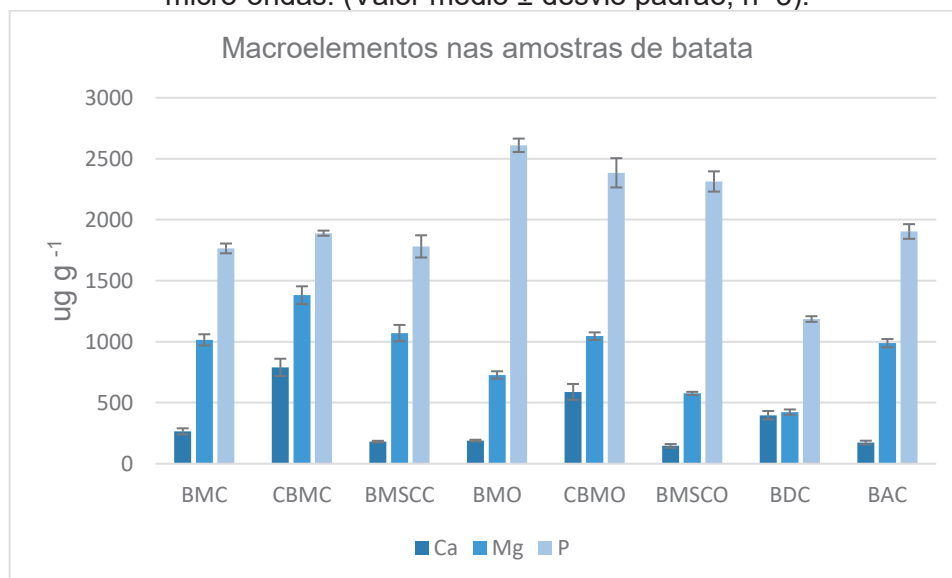
Após a etapa de avaliação dos parâmetros de desempenho analítico, as amostras de batatas previamente mineralizadas em meio ácido, foram analisadas por ICP OES visando a avaliação de seu perfil químico inorgânico. Verificou-se que quando se empregou as amostras em base úmida, independente da forma de preparo, os valores para os teores dos analitos quantificados apresentaram RSD elevados, provavelmente devido aos baixos valores de concentração dos analitos e a heterogeneidade das amostras. Sendo assim, as amostras de batatas foram previamente liofilizadas e posteriormente mineralizadas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas obtendo-se resultados satisfatórios, consequência da melhor representatividade da amostra, garantida pela sua homogeneidade. Os resultados dos teores encontrados para os elementos químicos podem ser observados nas Figuras 8 a 11. Foi necessário separar os elementos nos gráficos de acordo com o nível de concentração similar entre eles presente nas amostras de batatas, para melhor visualização dos macros e micros constituintes.

Figura 8 Teores de K quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em meio ácido assistida por radiação de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).



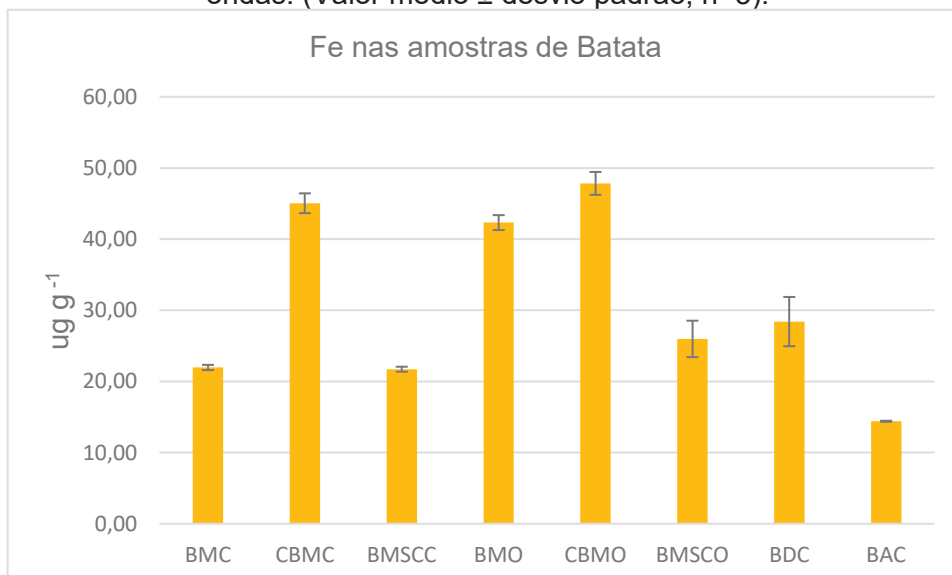
BMC – batata Monalisa convencional; CBMC – cascas de batata Monalisa convencional; BMSCC – Batata Monalisa sem casca convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; CBMO – cascas de batata Monalisa orgânica; BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica; BDC – batata doce convencional e BAC – batata Asterix convencional;

Figura 9 Teores de Ca, Mg, e P quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em meio ácido assistida por radiação de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).



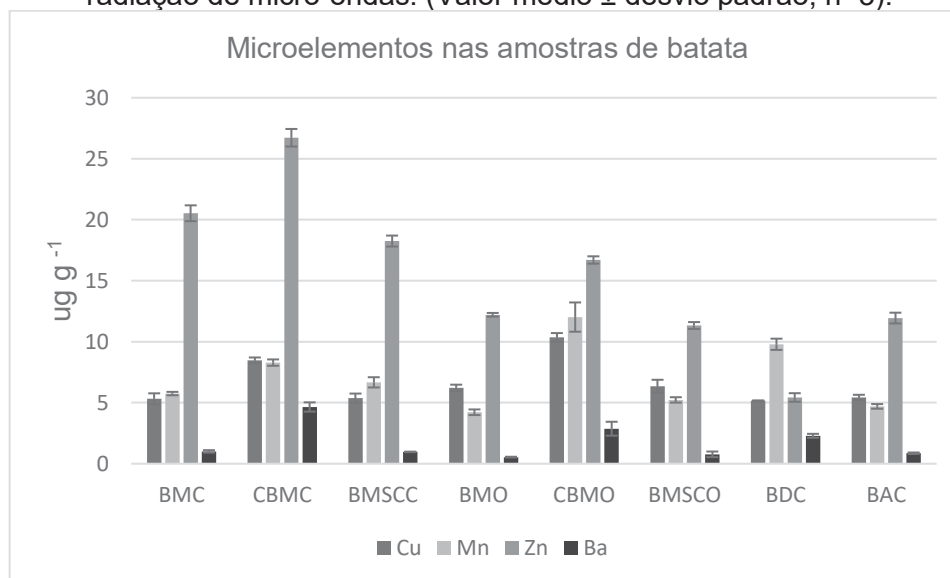
BMC – batata Monalisa convencional; CBMC – cascas de batata Monalisa convencional; BMSCC – Batata Monalisa sem casca convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; CBMO – cascas de batata Monalisa orgânica; BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica; BDC – batata doce convencional e BAC – batata Asterix convencional;

Figura 10 Teores de Fe quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em meio ácido assistida por radiação de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).



BMC – batata Monalisa convencional; CBMC – cascas de batata Monalisa convencional; BMSCC – Batata Monalisa sem casca convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; CBMO – cascas de batata Monalisa orgânica; BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica; BDC – batata doce convencional e BAC – batata Asterix convencional;

Figura 11 Teores de Cu, Mn, Zn e Ba quantificados por ICP OES em amostras de diferentes cultivares de batata (base seca) decompostas em meio ácido assistida por radiação de micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n=3).



BMC – batata Monalisa convencional; CBMC – cascas de batata Monalisa convencional; BMSCC – Batata Monalisa sem casca convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; CBMO – cascas de batata Monalisa orgânica; BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica; BDC – batata doce convencional e BAC – batata Asterix convencional;

Elementos como Cr, Co, V e Mo apresentaram valores abaixo do primeiro ponto da curva de calibração analítica, contudo, apresentaram bons valores de RSD e recuperações entre 80 e 120%, isso se deve ao fato de estarem acima do LOQ. Já o Sb, As, Be e Li encontraram-se abaixo do limite de detecção (0,36; 0,27; 0,008 e 0,013 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente). Os demais elementos estudados (Se, Sr, Tl, Sn, Si) não foram quantificados devido à falta de linearidade das curvas de calibração analítica, nas condições instrumentais aplicadas.

Em relação aos teores determinados por ICP OES, espera-se encontrar concentrações consideráveis de Cu, Mn, Zn e Fe nas amostras de batata, pois esses são micronutrientes essenciais para as plantas (BROADLEY *et al.*, 2012; KRAMER, 2010; PALMER; GUERINOT, 2009). O Fe, entre os microelementos, é o mais requerido pelas plantas, pois está relacionado a processos fundamentais como fixação de nitrogênio, fotossíntese, respiração, síntese de DNA e de hormônios, além de ser essencial ao metabolismo energético e atuar no desenvolvimento de tronco e raízes (JUCOSKI *et al.*, 2016; OZTURK *et al.*, 2011; NUNES, 2019). O Zn é um ativador enzimático e sua carência provoca uma redução do crescimento vegetal. O Mn possui papel importante na fotossíntese, respiração, redução e fixação de nitrogênio e sua carência altera a tonalidade das folhas, tornando-as verde-azuladas. Para o Ba, baixas concentrações em relação aos outros analitos são esperadas, pois esse elemento não possui função nutricional para as

plantas e em teores elevados pode levar a redução de crescimento foliar e radicular, levando-as a morte (MERLINO, 2013).

Os elementos Ca, P, K e Mg são considerados macronutrientes, o que significa que se encontram em teores mais elevados que os micronutrientes nas plantas. O Ca é responsável pela estruturação das membranas nas paredes celulares, de forma a proporcionar estabilidade, além de influenciar na resistência das batatas a mudanças ambientais, enquanto o fósforo desempenha um papel fundamental na biossíntese de carboidratos, nas reações de transferência de energia, na divisão celular, entre outros processos. Além do mais, o P faz parte da estrutura do DNA, mRNA e ATP. Já o Potássio está relacionado a osmoregulação, ativação enzimática e equilíbrio cátion-ânion, entre outros processos. Segundo White e Broadley (2009), as batatas apresentam quantidades elevadas de potássio. O Mg é um componente essencial da molécula de clorofila e, assim como os outros macronutrientes, está ligado diretamente ao metabolismo energético (SUBRAMANIAN *et al.*, 2011).

Aplicando-se uma ANOVA de fator único seguida por um teste Tukey aos resultados obtidos de concentração dos analitos verificou-se que para a maioria dos elementos estudados diferenças significativas foram observadas entre os diferentes cultivares de batata. Para o Ca, Mn, Zn as únicas amostras com teores que não se diferem entre si correspondem as amostras BAC e BMO, para os elementos Mg e Ba os valores de BAC e BMC não diferiram entre si, já para os elementos P, K e Fe todos os teores foram significativamente diferentes entre as amostras. O elemento Cu foi o que apresentou uma maior quantidade de amostra sem diferença significativa como no caso das amostras de BDC e BAC, BDC e BMC e, BAC e BMC. As diferenças entre amostras ocorrem, pois, apesar da essencialidade dos elementos químicos supracitados, seus teores nas amostras de batata podem variar consideravelmente a depender da composição química do solo, sua capacidade de troca catiônica, pH do solo, aplicação de fertilizantes/agroquímicos e localização geográfica, além da variedade da batata (KHAN *et al.*, 2017; KUMPULAINEN; PAAKKI; TAHVONEN, 1988; MANSOUR *et al.*, 2009; RIVERO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2019; OZTURK *et al.*, 2011; WANG; NIE; ZHU, 2016). As diferenças entre os teores encontrados nas batatas podem ser melhor compreendidas/corroboradas, a partir da comparação de estudos relacionados a composição química inorgânica de batatas em diferentes países, levando-se em consideração partes da batata (amostras de casca e batata (polpa) como também a batata como um todo (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 Comparação entre os teores encontrados para os constituintes inorgânicos nas cascas e nas polpas das batatas de diferentes cultivares a partir de estudos da literatura. Valores expressos em mg kg⁻¹ em base seca.

Análito	Concentração em mg kg ⁻¹					
	Subramanian et al. (2011)		Wszelaki et al. (2005)		Este Trabalho	
	Inglaterra		Estados Unidos		Brasil	
	Casca	Batatas (polpa)	Casca	Batatas (polpa)	Casca	Batatas (polpa)
Ca	2200	300	1128 - 1482	259 - 426	589* - 790**	146* - 181**
Mg	1900	1000	1706 - 2304	1184 - 1648	1046* - 1381**	576* - 1070**
P	3400	2800	3633 - 4972	3613 - 5030	1890** - 2385*	1781** - 2313*
K	39300	22400	52700 - 64206	24024 - 33780	27434** - 31978*	15337* - 17842**
Cu	10,2	4,30	16,7 - 20,0	10,4 - 13,9	8,48** - 10,4*	5,38** - 6,35*
Mn	17,5	5,20	25,9 - 99,6	11,1 - 16,9	8,29** - 12,0*	5,23* - 6,67**
Zn	32,8	9,80	37,8 - 42,2	29,4 - 32,6	16,7* - 26,7**	11,3* - 18,3**
Ba	-	-	-	-	2,87* - 4,65**	0,77* - 0,97**
Fe	307,6	15,5	421 - 780	51,9 - 103	45,0** - 47,8*	21,72** - 26,0*

* Batatas cultivadas de forma orgânica/ ** Batatas cultivadas de forma convencional. (SUBRAMANIAN et al., 2011; WSZELAKI et al., 2005)

Tabela 15 Comparação entre os teores dos constituintes químicos inorgânicos presentes nas amostras de batatas como um todo (sem levar em consideração os teores encontrados somente na casca ou somente nas polpas) em diferentes países. Valores expressos em mg kg^{-1} em base seca.

Análito	Concentração em mg kg^{-1}					
	Tadesse <i>et al.</i> (2015) Etiópia	Tamasi <i>et al.</i> (2015) Itália	Surdyk <i>et al.</i> (2010) Amostras de 2007	Sérvia Amostras de 2008	Ozturk <i>et al.</i> (2011) Turquia	Este Trabalho Brasil
Ca	176 – 254	340 - 478	-	-	-	174 - 397
Mg	420 – 438	1088 - 1434	-	-	-	423 - 1015
P	-	-	1387 - 2093	410 – 429	-	1186 - 2610
K	-	11019 - 13567	3980 - 6035	3007 – 3093	-	10268 - 25302
Cu	-	4,2 - 8,1	0,2 - 1,0	10,4 - 10,5	3,07 - 5,43	5,16 – 6,22
Mn	-	3,6 - 5,3	-	-	6,93 - 13,06	4,22 - 9,79
Zn	20,6 - 77,7	10,7 - 25,4	28,6 - 5,57	26,1 - 28,1	13,8 - 18,9	5,43 - 20,53
Ba	-	-	-	-	-	0,54 - 2,29
Fe	27,3 - 90,4	7,0 - 11,5	19,8 - 48,9	23,4 - 42,2	48,9 - 76,6	14,40 - 28,73

Observa-se que os teores determinados nas cascas das batatas são maiores para todos os elementos químicos estudados, com exceção do P, quando comparadas a polpa do tubérculo. Em outros estudos como de Subramanian *et al.*, 2011 e Wszelaki *et al.*, 2005 observou-se o mesmo comportamento (Tabela 11). Tal fato deve-se a função protetora exercida pela casca, a qual acaba por acumular maior quantidade de fibras e nutrientes (MULLIN; SMITH, 1991; NARVÁEZ-CUENCA *et al.*, 2018; SUBRAMANIAN *et al.*, 2011; WSZELAKI *et al.*, 2005).

Além disso, quando se compara este trabalho com os estudos na literatura verifica-se que as batatas brasileiras (região de Curitiba) apresentaram menor valor nutricional em relação aos nutrientes Ca, Mg, P e K que as batatas da Inglaterra (SUBRAMANIAN *et al.*, 2011) e dos Estados Unidos (WSZELAKI *et al.*, 2005). Contudo, os teores de Ca, com exceção da casca da batata monalisa ($790 \pm 71 \text{ mg kg}^{-1}$ em base seca) foram semelhantes aos teores encontrados na Etiópia e na Itália por Tadesse *et al.* (2015) e Tamasi *et al.* (2015). Em relação aos teores de Mg, a batata doce apresentou um teor semelhante ao estudo de Tadesse *et al.* (2015), enquanto as demais amostras continham teores mais elevados como descritos por Tamasi *et al.* (2015). Os valores de P, como pode ser observado no trabalho de Surdyk *et al.* (2010), variaram significativamente de uma safra para outra. De maneira que, a safra de 2007 na Sérvia, foi a que apresentou valores mais próximos aos encontrados neste trabalho. Para o K, com exceção da amostra de batata doce que apresentou valores entre os encontrados na Itália, as demais amostras apresentaram teores intermediários, ou seja, estando acima dos teores obtidos para os países Itália, Etiópia e Sérvia, e abaixo dos teores para as batatas da Inglaterra e Estados Unidos. Em relação aos micronutrientes é possível verificar significativa variação entre os teores presentes nas amostras em diferentes regiões do planeta e até mesmo de uma safra para outra como mostra o estudo de Surdyk *et al.* (2010), em particular para o cobre.

Segundo o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) os valores dos elementos inorgânicos podem variar entre $60 - 160 \text{ mg kg}^{-1}$ para Ca, $190 - 250 \text{ mg kg}^{-1}$ para Mg, $480 - 750 \text{ mg kg}^{-1}$ para P, $3680 - 5060 \text{ mg kg}^{-1}$ para K, $0,77 - 1,85 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cu, $1,16 - 2,41 \text{ mg kg}^{-1}$ para Mn, $2,70 - 3,50 \text{ mg kg}^{-1}$ para Zn e $4,70 - 12,4 \text{ mg kg}^{-1}$ para Fe, para batata inglesa em base úmida, valores esses maiores que os determinados no Brasil. Os valores de referências, no Brasil, são indicados pela Tabela TACO, dessa forma os teores encontrados nesse trabalho também foram comparados a esse informativo para uma avaliação referente as amostras analisadas. Observa-se na Tabela 16 que as amostras analisadas nesse trabalho apresentaram teores significativamente diferentes dos Tabelados para a maioria dos minerais. Para o Ca somente as amostras BMC e BAC apresentaram teores semelhantes ao Tabelado. A amostra BAC apresentou ainda valores

similares ao Tabelado para P e Mn. As amostras BDC e BMO somente apresentaram teores similares para Mn e Mg, respectivamente. Tais resultados são corroborados a partir de um teste t_{student} bicaudal com nível de confiança em 95% e 2 graus de liberdade.

Tabela 16 Comparação entre os teores dos constituintes inorgânicos determinados nesse trabalho e os valores de referência estimados pela Tabela TACO 4ª Ed. 2011.

Concentrações em mg kg ⁻¹ em base úmida						
Analito	TACO para Batata inglesa em geral	BMC	BMO	BAC	TACO para Batata doce	BDC
Ca	40	34,5 ±	37,8 ±	34,8 ±	210	107,2
		3,2	1,3	3,0		± 6,8
Mg	150	132,0 ±	138,3 ±	197,6 ±	170	114,2
		5,9	5,7	6,8		± 9,4
P	390	229,4 ±	495,9 ±	380,7 ±	1490	320,2
		5,2	10,5	12,0		± 10,8
K	3020	3289,3	3603,5	4263,1	5350	2771,
		± 120,6	± 13,9	± 179,2		0 ± 72,3
Cu	0,9	0,7 ±	1,2 ±	1,1 ±	1,5	1,4 ±
		0,06	0,05	0,04		0,01
Mn	1,0	0,7 ±	0,8 ±	0,9 ±	2,4	2,6 ±
		0,02	0,04	0,04		0,12
Zn	2,0	2,7 ±	2,3 ±	2,4 ±	8	1,5 ±
		0,08	0,03	0,09		0,09
Ba	-	0,1 ±	0,1 ±	0,2 ±	-	0,6 ±
		0,01	0,01	0,01		0,04
Fe	4,0	2,9 ±	5,5 ±	2,9 ±	8	7,7 ±
		0,05	0,2	0,01		0,63

BMC – batata Monalisa convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; BAC – batata Asterix convencional e BDC – batata doce convencional.

Deve ser mencionado que para a elaboração da Tabela TACO, leva-se em consideração uma quantidade elevada de amostras (5 fornecedores em volumes de 3 a 20 kg de batata) de forma a contemplar as diferentes regiões do Brasil. Desta forma, o valor médio do teor dos elementos inorgânicos encontrados a partir da análise da amostragem de batatas em todo o território nacional é reportado na Tabela TACO.

Após a determinação dos teores de nutrientes (exceção do Ba), avaliou-se o valor nutricional das amostras de batatas com base nos valores estabelecidos para ingestão diária pela RDC 269 (ANVISA, 2005). O cálculo foi realizado a partir da equação abaixo relativa à ingestão diária recomendada (IDR).

$$IDR = \frac{C_{\text{batata}} \times C_{\text{fator}} \times Q_{\text{alimento ingerido}}}{\text{Peso}_{\text{médio}}} \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde C_{batata} corresponde a concentração do metal na batata (mg kg^{-1}) em base seca, C_{fator} a conversão da base seca para base úmida (0,085), $Q_{\text{alimento ingerido}}$ a quantidade de batata ingerida por dia (em média 0,345 kg para adultos e 0,232 kg para crianças) e peso (em média 59,90 kg para adultos e 32,70 kg para crianças) (CHERACHI *et al.*, 2013).

Se não dividirmos pelo peso e levarmos em consideração somente a quantidade de batata ingerida, obtém-se a concentração em (mg) dos nutrientes ingeridos, sendo possível comparar com os limites estabelecidos pela RDC 269/2005 ANVISA e pela Diretriz da WHO (2012) sobre a ingestão de potássio para adultos e crianças (Tabela 17).

Tabela 17 Valores de ingestão diária a partir do consumo de batatas, levando-se em consideração o teor total dos nutrientes encontrados, em relação as quantidades estabelecidas pela RDC 269 da ANVISA e pela WHO (2012).

Analitos	Amostras					ANVISA	WHO
	BMC	BMO	BAC	BDC			
Ca (mg)	7,77	5,56	5,09	11,64	Adultos	1000	-
	5,23	3,74	3,42	7,83	Crianças	300 – 700	-
Mg (mg)	29,65	21,34	28,97	12,40	Adultos	260	-
	20,02	14,35	19,48	8,34	Crianças	36 – 100	-
P (mg)	51,75	76,54	55,82	34,78	Adultos	700	-
	34,80	51,47	37,54	23,39	Crianças	100 – 1250	-
Cu (mg)	0,16	0,18	0,16	0,15	Adultos	900	-
	0,10	0,12	0,11	0,10	Crianças	200 – 440	-
Mn (mg)	0,17	0,12	0,14	0,29	Adultos	2,3	-
	0,11	0,08	0,09	0,19	Crianças	0,003 – 1,5	-
Zn (mg)	0,60	0,36	0,35	0,16	Adultos	7	-
	0,40	0,24	0,23	0,11	Crianças	2,8 – 5,6	-
Fe (mg)	0,64	0,84	0,42	0,83	Adultos	14	-
	0,43	0,57	0,28	0,56	Crianças	0,27 – 9,0	-
K (g)	0,7	0,6	0,6	0,3	Adultos	-	3,5
	0,5	0,4	0,4	0,2	Crianças	-	3,5

BMC – batata Monalisa convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; BAC – batata Asterix convencional e BDC – batata doce convencional.

Os valores reportados indicam que a batata possui significativa contribuição para a ingestão diária quanto aos nutrientes aqui investigados. Dentre os quais destacam-se uma significativa contribuição para a dieta alimentar de Mg (de 4,8 a 11,4 % para adultos e 12,3 a 29,4% para as crianças), P (de 5,0 a 10,9% para adultos e 3,5 a 7,6% para as crianças), Mn (de 5,4 a 12,5% para adultos e 11,1 a 25,7% para as crianças), Zn (de 2,3 a 8,6% para adultos e 2,5 a 9,6% para as crianças), K (de 8,6 a 21,2% para adultos e 5,8 a 14,3% para as crianças) e Fe (de 3,0 a 16,3% para adultos e 5,8 a 14,3% para as crianças). Entretanto, Segundo a portaria nº 27 de 13 de Janeiro de 1998, um alimento só pode ser considerado fonte de minerais ao apresentar no mínimo 15% da IDR por 100 g, e considerado rico em minerais ao apresentar no mínimo 30% da IDR por 100 g. De modo

que ao levarmos em consideração o teor em 100 g, a batata não pode ser considerada fonte de minerais para nenhum dos elementos em estudo visto que a porcentagem máxima encontrada em 100 g da batata foi de 6,1% de K.

Apesar do fato de não ser considerada fonte de nutrientes, é válido ressaltar que dentre as verduras, hortaliças e tubérculos apresentados na Tabela TACO (2011) a batata inglesa crua se apresenta em 3º lugar em relação ao teor de P e em 4º lugar em relação ao teor de K. Visto que, a batata é a primeira colocada em consumo alimentício a nível mundial, o seu consumo ajuda na ingestão dos minerais essenciais, principalmente P e K, além do mais a batata apresenta outros nutrientes necessários ao bom funcionamento do organismo humano, como carboidratos, proteínas, vitaminas etc. Para os demais nutrientes, percebe-se que os teores encontrados na batata são semelhantes aos teores presentes nas demais verduras, hortaliças e tubérculos, com exceção do Ca, elemento no qual a batata apresenta menor teor.

O elemento Ba encontrado nas amostras de batatas nesse estudo, como já reportado na literatura, não é considerado essencial aos seres vivos, de forma que não há valores de ingestão diária (nutriente) recomendados pelas agências reguladoras. Pelo contrário, o Ba é considerado tóxico aos seres humanos principalmente na forma de íons Ba(II) (WHO, 2001). Dessa forma a WHO preconiza um limite máximo de ingestão diária de 0,02 mg de bário por kg de massa corporal por dia, sendo que até 0,21 mg/kg/dia é considerado o teor máximo de contaminante (TMC) que não apresenta efeitos deletérios à saúde humana (NOAEL – do inglês *no-observed-adverse-effect level*) (WHO, 2001). Utilizando a equação de IDR, obtém-se valores de 0,0003 – 0,0023 mg/kg/dia para adultos e de 0,0003 – 0,0028 mg/kg/dia para crianças, sendo os menores teores obtidos para a amostra de batata Monalisa orgânica (BMO) e os maiores para a casca de batata Monalisa convencional (BMC). Pode-se observar desse modo, que apesar da presença de Ba nas amostras, não há risco de contaminação aguda devido aos baixos teores encontrados.

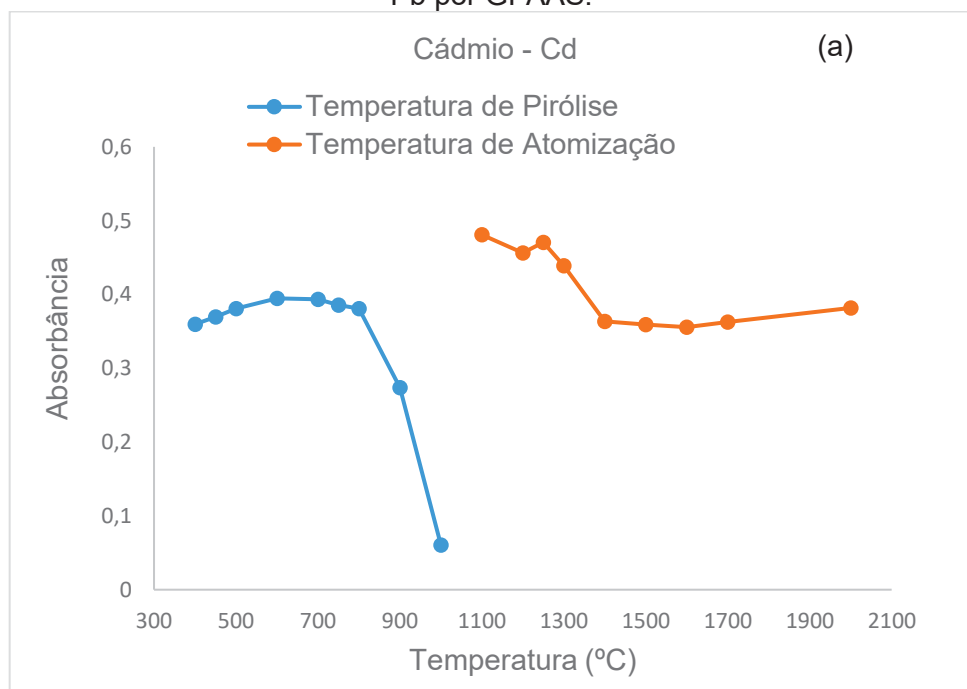
4.4 Desenvolvimento de método por GFAAS para a determinação de As, Cd, Cr e Pb nas amostras de batatas

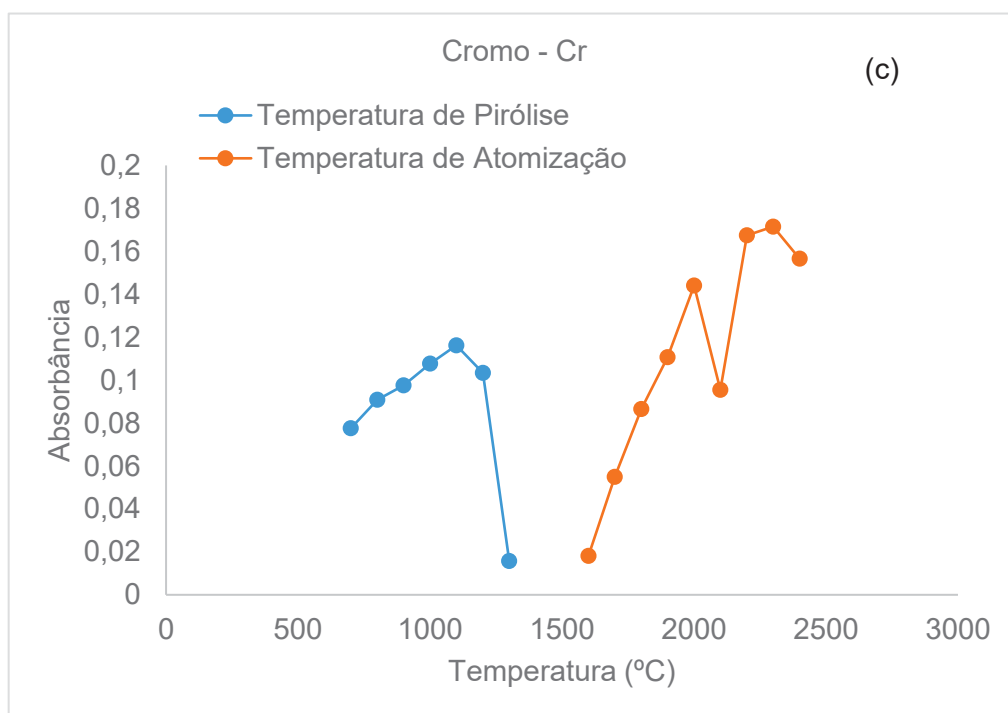
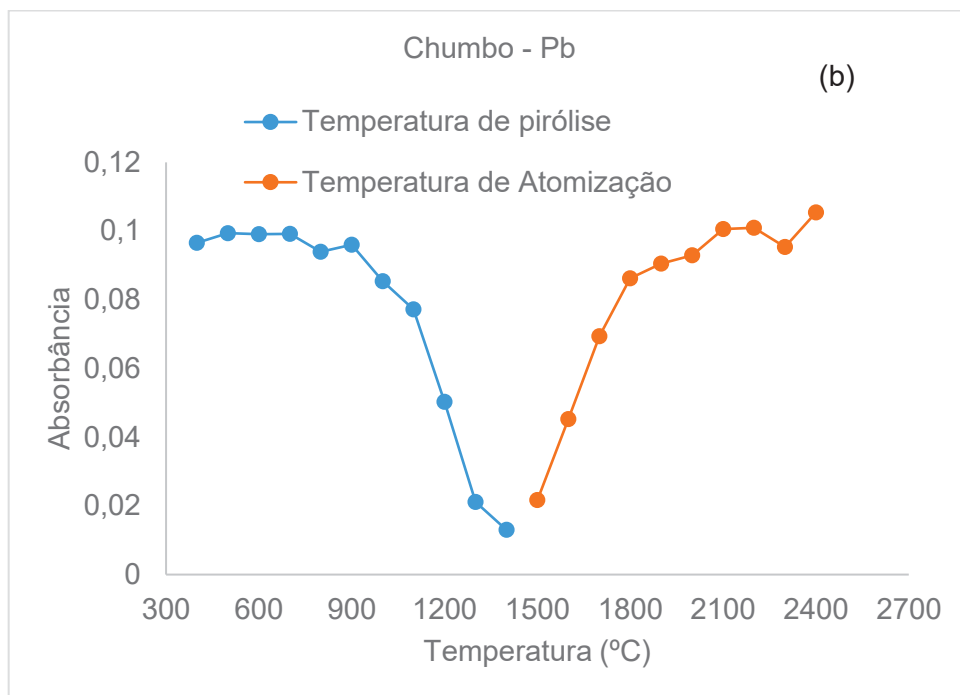
Diversos fatores influenciam nas temperaturas de pirólise e de atomização dos elementos químicos, como o tipo da matriz, a temperatura de ebulição do analito, a ligação do analito com a matriz, os reagentes adicionados na etapa de preparo de amostras, o modificador químico utilizado entre outros (SCHELEMMER *et al.*, 1999). Assim sendo, para se obter resultados analíticos confiáveis faz-se necessários estudos sobre tais temperaturas, parâmetros esses muito significativos para se obter resultados com qualidade analítica desejável.

Nessa etapa do estudo, $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de Cd e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de As, Cr e Pb em meio ácido HNO_3 1% v v⁻¹ foram empregados. Os diferentes níveis de concentração de cada analito foram empregados de acordo com o nível de detectabilidade do GFAAS, os quais favorecem a melhor visualização do perfil dos sinais analíticos, em termos de sua simetria, como também na avaliação do parâmetro SBR. O perfil do sinal transiente (sinal do analito) é um indicativo tanto da etapa de pirólise (separação térmica entre o analito e matriz) como também da etapa de atomização (condições reacionais) adequadas para a formação da nuvem atômica em um ambiente relativamente isotérmico no GFAAS.

Condições instrumentais adequadas foram obtidas a partir de uma otimização univariada das temperaturas de pirólise e de atomização para os elementos Cd, Cr e Pb. De forma que as curvas de otimização podem ser observadas na Figura 12 (a), (b) e (c). Para o analito As não foi possível a obtenção de bons resultados relacionados as Figuras de mérito e a simetria dos sinais transientes, de modo que decidiu-se por um estudo mais robusto através da execução de um planejamento fatorial, como mencionado na Seção 3 (materiais e métodos).

Figura 12 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para (a) Cd, (b) Pb e (c) Cr em meio ácido (HNO_3 1% v v⁻¹). Análise de $20 \mu\text{L}$ de solução padrão ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada analito e emprego de modificador químico (Pd $1 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) para a determinação de Cd e Pb por GFAAS.





O Cd apresentou maiores valores de absorvância quando a temperatura de pirólise (T_p) foi fixada em 600 °C e a temperatura de atomização (T_a) em 1100 °C. Porém, nessas condições, o sinal transiente do analito não retornava a linha de base, obtendo-se valores de absorvância discrepantes em relação ao nível de concentração empregado, visto que o valor da absorvância é obtido a partir da integração da área do sinal analítico (sinal transiente). Dessa maneira, selecionou-se a T_a de 1250 °C, a qual apresentou valores satisfatórios de absorvância com sinais transientes bem definidos (Fig. 12 (a)). Para o Pb,

as T_p e T_a ótimas ocorreram em 500 °C e 2400 °C (Fig. 12 (b)). Para o analito Cr, na T_p de 1100 °C e T_a de 2300°C foram obtidos sinais analíticos com perfil mais simétrico (Fig. 12 (c)) e com satisfatória resolução sinal do analito/sinal de fundo (SBR – 3,06), sendo essas as temperaturas selecionadas para as análises. Para a T_a , além do melhor SBR a temperatura de 2300°C apresentou melhor valor de recuperação, 87%, enquanto a T_a de 2200°C, apesar de apresentar maior absorvância do sinal analítico, apresentou valor de recuperação abaixo de 80%.

Quanto ao emprego de modificadores químicos, diferentes concentrações de Pd foram avaliadas para os analitos estudados. Welz e Sperling (1999) reportam a eficiência do modificador composto por Pd e Mg e somente de Pd para uma ampla faixa de elementos, tais como Ag, Al, Cd, Cu, Pb, Sb, Si, Zn entre outros. Além do mais, observou-se a partir de estudos prévios realizados pelo grupo GEPAm (NASCIMENTO *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2021), que uma pequena quantidade do modificador químico, aproximadamente 1 µg/5µL de Pd, é suficiente para que se promova a estabilização dos analitos Cd e Pb em meios com baixos teores de matéria orgânica, após otimização das condições reacionais e instrumentais. Ademais, devido à alta volatilidade desses analitos, (Cd e Pb) verificou-se que uma pequena quantidade de modificador deve ser adicionada de forma a estabilizá-los termicamente, de maneira a se obter sinais analíticos desejáveis para a técnica de GFAAS. (ARSLAN; TYSON, 2007; VOLZHENIN, 2018; WELZ; SPERLING, 1999). Já para o Cr, resultados satisfatórios dos parâmetros de validação foram atendidos sem a necessidade de modificadores químicos. Fato esse, que se deve aos baixos teores de RCC obtidos após a decomposição em meio ácido assistida por radiação micro-ondas. O Cr é conhecido por formar carbetos refratários que dificultam sua análise, porém em um meio oxidante (solução ácida após o processo de digestão assistida por radiação micro-ondas) e com pouca disponibilidade de carbono, como demonstrado pelo baixo RCC, a formação de carbetos é consideravelmente atenuada. Além do mais, em temperaturas acima de 1500 °C ($T_a = 2300$ °C) ocorre a decomposição dos compostos de Cr_3C que podem ter sido formados nas etapas anteriores à etapa de atomização, por meio da reação: $Cr_{3(g)} + C_{(s)}$ (DOBROWOLSKI; PAWLOWSKA-KAPUSTA; DOBRZYNSKA, 2012; QUINÁIA; NÓBREGA, 2000; WELZ; SPERLING, 1999).

Nas condições instrumentais otimizadas, valores de recuperação (resposta avaliada) dentro de 80 a 120% foram obtidos para todos os analitos. Na Tabela 18, os programas de aquecimento otimizados para os analitos Cd, Pb e Cr estão reportados, bem como os sinais transientes advindos (Figura 13) das condições reacionais/instrumentais aplicadas nesse estudo.

Figura 13 Sinais transientes obtidos para Cd, Cr e Pb nas condições ótimas de T_p e T_a , com modificador químico de Pd $1 \mu\text{g}/5\mu\text{L}$ para Cd e Pd e a ausência de modificador para Cr. O sinal em vermelho corresponde ao sinal do analito, enquanto o sinal em azul corresponde ao do *background* (sinal de fundo).

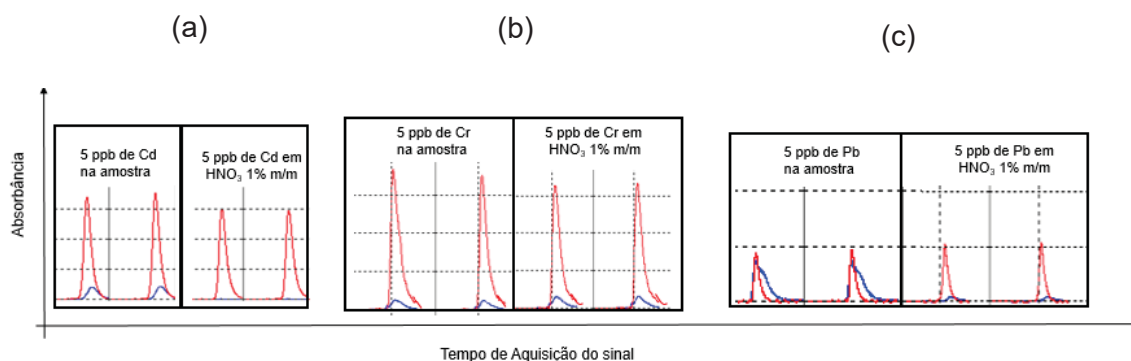


Tabela 18 Programa de aquecimento desenvolvido/otimizado no GFAAS para a determinação de Cd, Pb e Cr nas amostras de diferentes cultivares de batata decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas.

Etapa	Temperatura (°C)			Tempo (Seg)			Modo de Aquecimento	Fluxo de Ar (L min ⁻¹)
	Cd	Pb	Cr	Cd	Pb	Cr		
Secagem	120	150	150	35	20	20	Rampa	0,10
	250	250	250	10	10	10	Rampa	0,10
	400	500	800	10	10	10	Rampa	1,00
Pré pirólise	500	500	1100	10	10	10	Rampa	1,00
Pirólise	600	500	1100	3	3	3	Permanência (Hold)	0,10
Atomização	1250	2400	2300	3	2	2	Permanência (Hold)	0,00
Limpeza	2400	2500	2500	2	2	2	Permanência (Hold)	1,00

Para a determinação Cd e Pb, houve adição de modificador químico em todas as soluções de análise (soluções padrão, branco de reagente, branco de amostra e amostras) de forma a garantir um meio reacional semelhante entre as soluções analisadas. Assim como para as curvas construídas no ICP OES, as curvas analíticas de calibração para os analitos em GFAAS, apresentaram boa linearidade e um valor de R^2 dentro dos limites estabelecidos pelo INMETRO (2020). (Tabela 19).

Tabela 19 Parâmetros estatísticos das curvas de calibração analítica e os valores de LOQ obtidos nas análises por ICP OES.

Analito	Curva Analítica de Calibração	R ²	Intervalo $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ* $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ** $\mu\text{g L}^{-1}$
Cd	$y = 0,1934x + 0,0071$	0,99	0,05 – 1,0	0,063	0,057
Pb	$y = 0,0213x + 0,0172$	0,99	0,2 – 5,0	0,72	0,65
Cr	$y = 0,0163x + 0,0173$	0,99	0,5 – 6,0	0,49	0,44

* Calculado conforme preconizado pelo INMETRO (2020).

** Calculado conforme Welz e Sperling (1999).

O LOQ foi calculado como sugerido por Welz e Sperling (1999) por se tratar de cálculos específicos para a técnica utilizada nesse trabalho (GFAAS). Além do mais, os cálculos realizados apresentam nível de confiança de 95% para os valores de LOQ.

Ainda no processo de validação do método, foram realizados testes de recuperação em três níveis de concentração para os elementos em estudo. Os valores de recuperação foram calculados a partir da equação 2. Os resultados dos parâmetros exatidão e precisão mostraram-se adequados para o método desenvolvido (Tabela 20), visto que se encontram dentro dos valores preconizados pelo INMETRO (2020).

Tabela 20 Valores de recuperação obtidos para Cd, Pb e Cr em GFAAS para as amostras de batatas (BMC) decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas. (Valor médio \pm desvio padrão, n= 3)

	Teor do Analito na Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teor do Analito esperado após fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teor do Analito Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec (%)	RSD (%)
Cd	0,16 \pm 0,02	0,05	0,053 \pm 0,003	106	3,53
	0,16 \pm 0,02	0,35	0,35 \pm 0,04	97	0,78
	0,16 \pm 0,02	0,75	0,69 \pm 0,03	91	6,18
Cr	< LOQ	0,5	0,55 \pm 0,03	109	0,35
	< LOQ	3,0	3,54 \pm 0,06	118	1,63
	< LOQ	5,0	5,12 \pm 0,03	102	0,60
Pb	< LOQ	0,4	0,47 \pm 0,01	107	3,21
	< LOQ	2,0	2,09 \pm 0,11	104	5,41
	< LOQ	5,0	5,33 \pm 0,20	107	3,62

LOQ = 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr e 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb

Em relação ao As, a dificuldade de análise se deve ao baixo comprimento de onda (193,7 nm) do elemento, o qual está próximo ao limite sistema óptico do equipamento, gerando problemas espectrais não específicos (CASTRO, ALLER, 2003; CHAKRABORTI, IRGOLIC, 1984; EPA, 2007; PERAMAKI, PESONEN, PIISPANEN, 2000). Ademais, a presença de fosfatos, sulfatos, sódio e potássio, em concentração de mg L^{-1} podem

contribuir para uma possível supressão do sinal analítico do As e gerar sinais de fundo elevados. Dentre os íons citados, o fosfato desempenha maior supressão do sinal analítico para As, sendo classificado como interferência química. Segundo Welz et al. (1988), uma redução de 75% em relação ao sinal obtido na ausência de fosfato ocorre na presença de apenas 5 mg L⁻¹ de PO₄³⁻.

De fato, verifica-se pelos estudos reportados na literatura a necessidade de diferentes estratégias analíticas para a detecção de As por GFAAS em matrizes variadas, principalmente as que apresentam altos teores de fósforo em sua composição. Michon et al. (2007) relatou a necessidade de concentrações elevadas de modificador químico Pd-Mg (2 µg – 10 µg), além da utilização de uma lâmpada de catodo oco específica (UltrAA-Lamp que consiste é uma lâmpada de catodo oco de descarga intensificada de alta intensidade), que permitiu um aumento de 40% na absorbância, para determinação de concentrações abaixo de 10 µg L⁻¹ de As em amostras de água para consumo humano. Ainda em um estudo de interferência, Michon et al. (2007) corroborou a forte interferência do ânion PO₄³⁻ devido a propriedades químicas semelhantes com o íon arseniato. Irisov, Musin e Zakharov (2021), optaram por utilizar um forno de grafite com fonte contínua de alta resolução e 20 µg de Pd como modificador químico para obtenção de melhores resultados na quantificação de As em amostras de urina. Além do mais, um novo método de introdução de amostra, em duas etapas, foi utilizado para separação do As e íons fosfato. Menezes et al. (2021) relatou a necessidade de elevadas concentrações (7 µg) de modificador químico de Pd para determinação de As em derivados de cânhamo devido ao alto teor de fósforo nas amostras, o que ocasionou um maior sinal de fundo, e consequentemente menor sensibilidade nas análises.

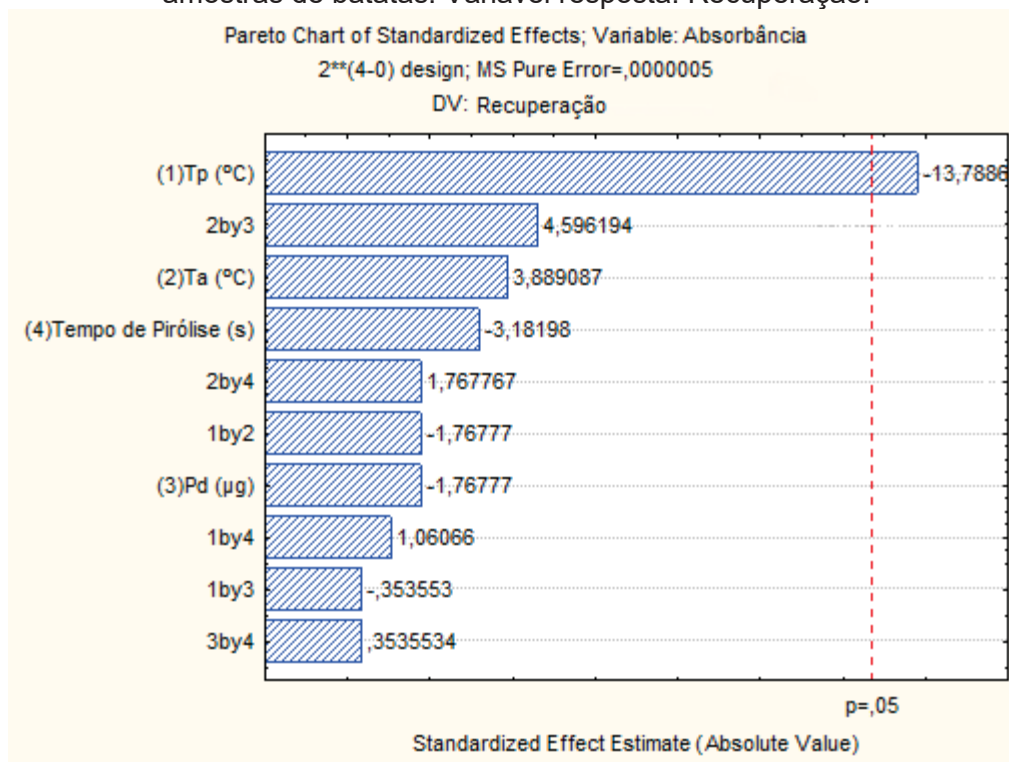
Como pode ser visto anteriormente nesse trabalho, altos teores de P e K foram encontrados nas amostras de batata em estudo, sendo necessário otimizar os parâmetros instrumentais de forma mais robusta através de um planejamento fatorial 2⁴ com ponto central (Anexo 1, Tabela A2).

Observou-se através dos resultados obtidos, a partir dos experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial, que para a recuperação (e consequente melhora do sinal analítico) a temperatura de pirólise foi considerada significativa (Figura 14), enquanto que para um melhor SBR, a concentração do modificador químico foi a variável significativa, ambos com sinais negativos, indicando que a influência de menores temperaturas e concentrações de modificador químico para as variáveis respostas.

O gráfico gerado em relação a recuperação (Figura 14) indicou que menores temperaturas de pirólise, eram mais adequadas, obtendo-se melhores valores de recuperação. Tal fato está de acordo com a literatura, visto que o As apresenta ponto de

ebulição relativamente baixo (614°C), sendo volatilizado em temperaturas de pirólise próximas e acima desse valor.

Figura 14 Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central na otimização do programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de As em amostras de batatas. Variável resposta: Recuperação.



Entretanto, menores temperaturas de pirólise não foram eficientes para a eliminação da maior parte das interferências ocasionadas pela presença de concomitantes, em particular, de compostos formados com P e K (WELZ et al. 1988; MICHON et al. 2007), elementos presentes nas amostras de estudo, como pode ser observado na Figura 15 (a).

Figura 15 Sinais transientes para As (em vermelho) e sinais de fundo (em azul) obtidos no GFAAS, para amostra de batata fortificada com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de As a partir do planejamento fatorial aplicado, 2^4 com ponto central. (a) $T_p = 500 \text{ }^\circ\text{C}$; (b) $T_p = 1200 \text{ }^\circ\text{C}$.

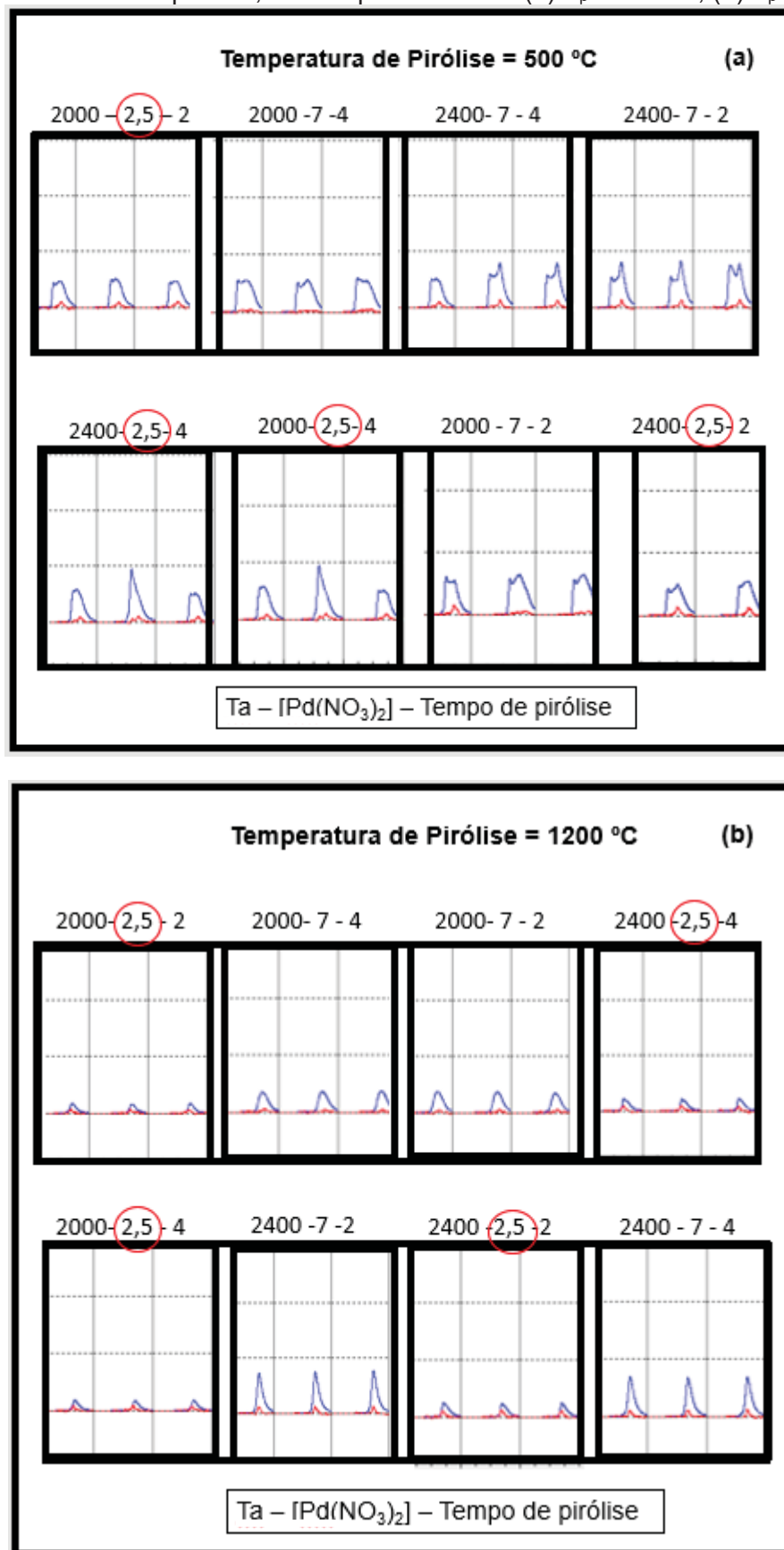
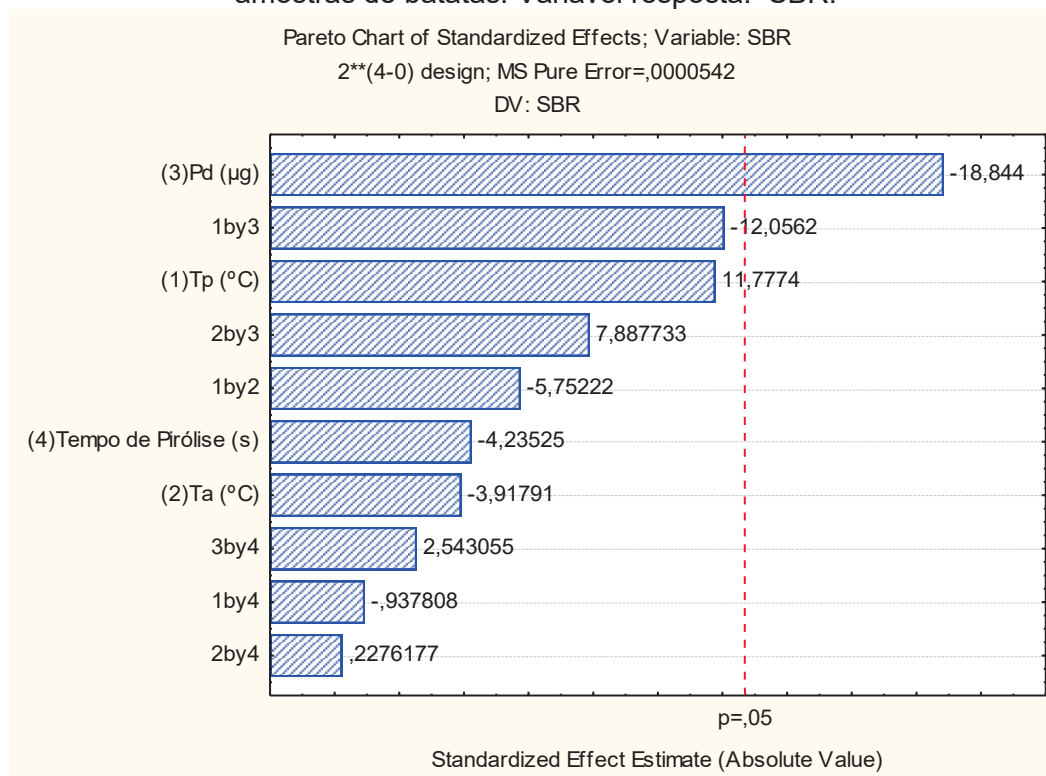


Figura 16 Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central na otimização do programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de As em amostras de batatas. Variável resposta: SBR.



Para o parâmetro SBR, apesar da temperatura de pirólise não ter sido considerada significativa (Figura 16), observou-se que esta variável, bem como a interação entre ela e a concentração de modificador químico estão próximas a linha de significância. Tais fatos, juntamente com os sinais observados na Figura 15, indicaram a necessidade de maiores temperaturas de pirólise para melhores resultados no parâmetro SBR. Assim sendo, uma Tp um pouco maior de 1200°C deve ser encontrada de forma a possibilitar com maior eficiência a eliminação dos interferentes e obter uma satisfatória razão para o SBR. Para isso, o modificador químico é comumente utilizado. O modificador químico converte o analito em uma forma menos volátil, permitindo maiores temperaturas de pirólise (etapa na qual ocorre a eliminação da matriz sem perda por volatilização do elemento a ser analisado), possibilitando a separação o analito dos concomitantes (IRISOV, MUSIN, ZAKHAROV, 2021; LEITE, 2010). Contudo como já mencionado anteriormente e corroborado pelo gráfico de pareto, uma elevada concentração de modificador pode ocasionar um maior sinal de fundo devido a formação de compostos mais refratários (WELZ, SPERLING, 1999). Em efeito, observa-se na Figura 15 que em 1200°C de Tp e $2,5\ \mu\text{g}$ de Pd, melhores sinais foram obtidos (Fig. 15 (b)), enquanto que em baixas temperaturas de pirólise (500°C), mesmo com uma baixa concentração de modificador ($2,5\ \mu\text{g}$), sinais de fundo elevados foram obtidos (Fig. 15 (a)). Constata-se com esses resultados que novos experimentos, que levem em consideração as variáveis significativas,

deveriam ter sido realizados. Entretanto, o equipamento utilizado para esses experimentos ficou inoperante por um longo período de tempo, impossibilitando a continuação desses estudos.

4.4.1 Análise do perfil tóxico das diferentes cultivares de batata por GFAAS.

Após a otimização dos métodos por GFAAS para Cd, Pb e Cr as amostras de batatas decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas foram analisadas. Para a análise de Cd as amostras foram diluídas 10 vezes, enquanto para Pb e Cr, foram diluídas 5 vezes. As amostras foram diluídas para diminuição do teor ácido (de 13% m m⁻¹ para 1,3% m m⁻¹ para Cd e 2,5% m m⁻¹ Pb e Cr). Visto que uma acidez elevada (13% m m⁻¹), além de diminuir a vida útil do tubo de grafite, leva a imprecisões nas análises e altos valores de RSD, conforme já observado em trabalhos prévios pelo grupo GEPAm (NASCIMENTO *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2021). Isso ocorre devido ao aumento da viscosidade e da tensão superficial da amostra, propriedades essas que afetam a formação da gota a ser inserida no interior do tubo de grafite, ocasionando em problemas de reprodutibilidade na introdução de amostra pelo autoamostrador prejudicando a qualidade analítica dos resultados (MINAMISAWA *et al.*, 2006; SHALTOUT; SEOUDI; EID, 2008). Os teores encontrados para os analitos nas amostras de batatas estão reportados na Tabela 21.

Tabela 21 Teor de Cd, Cr e Pb quantificados por GFAAS nas diferentes amostras de batatas digeridas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas. (Valor médio ± desvio padrão, n=3).

Amostra	Teor de Cd µg por 100g (BS*)	Teor de Cd µg por 100g (BU*)	Teor de Cr µg por 100g (BS*)	Teor de Pb µg por 100g (BS*)	Teor de Pb µg por 100g (BU**)
BMC	17,51 ± 0,92	2,34 ± 0,12	< LOQ	5,43 ± 0,01	0,70 ± 0,001
CBMC	22,78 ± 1,43	2,96 ± 0,19	21,85 ± 1,97	49,67 ± 1,24	6,45 ± 0,16
BMSCC	11,74 ± 0,59	1,52 ± 0,07	< LOQ	12,90 ± 0,96	1,67 ± 0,12
BMO	4,19 ± 0,23	0,54 ± 0,03	< LOQ	4,34 ± 0,45	0,56 ± 0,04
CBMO	8,58 ± 0,84	1,11 ± 0,08	80,28 ± 3,89	10,35 ± 0,75	1,35 ± 0,09
BMSCO	5,07 ± 0,36	0,66 ± 0,05	< LOQ	< LOQ	<LOQ
BDC	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,89 ± 0,46	1,02 ± 0,06
BAC	7,08 ± 0,32	0,91 ± 0,06	< LOQ	4,94 ± 0,33	0,64 ± 0,04

BMC – batata Monalisa convencional; CBMC – cascas de batata Monalisa convencional; BMSCC – Batata Monalisa convencional sem casca; BMO – batata Monalisa orgânica; CBMO – cascas de batata Monalisa orgânica; BMSCO – Batata Monalisa sem casca orgânica; BDC – batata doce convencional e BAC – batata Asterix convencional.

LOQ = 0,063 µg L⁻¹ Cd, 0,65 µg L⁻¹ Cr e 0,44 µg L⁻¹ Pb

*BS – Base Seca

**BU – Base úmida

O teor de Cd e Pb máximos permitidos em tubérculos pela ANVISA (RDC nº 42/2013) é de $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$, o que corresponde a $10 \mu\text{g}$ por 100g de amostra. O teor máximo permitido aplica-se aos alimentos no estado físico em que são oferecidos ao consumidor. Dessa maneira, ao calcular os teores de Cd e Pb para a amostra em base úmida, observou-se que as amostras de batatas analisadas se encontram abaixo do limite máximo preconizado para esses analitos.

Para o elemento Cr não há teores máximos preconizados pela ANVISA, visto que esse analito é considerado um micronutriente importante para a saúde humana. Assim sendo, avaliou-se o valor nutricional da casca de batata monalisa convencional e orgânica em relação aos valores estabelecidos para ingestão diária pela ANVISA (RDC 269, 2005), utilizando o mesmo cálculo de IDR, citado anteriormente (equação 13, seção 4.3). A ingestão diária de Cr para adultos encontra-se por volta de 35mg , enquanto para as crianças o teor é de 15mg , do qual observa-se uma contribuição de $0,02\%$ a $0,06\%$ para os adultos e $0,03\%$ e $0,10\%$ para as crianças com o consumo de cascas de batata convencionais e orgânicas, respectivamente (CHERACHI *et al.*, 2013).

Apesar do Cr ser considerado um nutriente importante para a saúde humana, é relevante ressaltar que o Cr hexavalente (VI) é considerado tóxico, de forma que muitos estudos relatam a necessidade de estudos de especiação química. Entretanto, segundo Shanker *et al.* (2019), o Cr (VI) é absorvido seletivamente pelas hemácias e reduzido a Cr (III) pela glutathione (uma molécula com função antioxidante). O Cr (III) por sua vez, possui diversas funções no organismo, entre elas, o aumento da ação da insulina, sendo recomendado para controle de diabetes do tipo 2 (DOBROWOLSKI; PAWLOWSKA-KAPUSTA; DOBRZYNSKA, 2012; QUINÁIA; NÓBREGA, 2000; CABRERA-VIQUE *et al.*, 1997).

Em contrapartida, os elementos Cd e Pb, não possuem nenhuma função para o organismo humano, sendo na verdade, considerados elementos tóxicos à saúde humana. A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou o cádmio como um carcinogêneo humano (Grupo 1) com base em estudos ocupacionais e em estudos mais recentes sobre a exposição humana, o Cd foi estatisticamente associado ao aumento do risco de câncer de pulmão, endométrio, bexiga e mama.

Segundo a associação *Food and Drug Administration* (FDA) o Pb é classificado como elemento tóxico classe 1, o que significa que esse elemento não deve estar presente em alimentos e medicamentos. Esse metal reage ou se complexa com muitas biomoléculas, afetando adversamente os sistemas reprodutivo, nervoso, gastrointestinal, imunológico, renal, cardiovascular, esquelético, muscular e hematopoiético, bem como os

processos de desenvolvimento, sendo, portanto, considerado cancerígeno pela IARC em 1987 (JOHNSON, 1998).

Embora os valores de Cd, Pb e Cr quantificados no trabalho estejam em baixas concentrações, observa-se a importância de monitoramento desses elementos uma vez que seus teores podem variar significativamente nas batatas a depender de diversos fatores, como o teor desses elementos no solo, no ar, na água e nos produtos de fertilização e agroquímicos, como também nas diferentes culturas de batata.

Na Tabela 22 pode ser verificada a diferença entre os teores desses analitos em amostras de batatas (e seus derivados) cultivadas em diferentes partes do mundo. Pode-se observar que no presente estudo foram obtidos os maiores teores de Cd, o que pode estar associado ao solo, qualidade/quantidade de fertilizantes e agroquímicos aplicados entre outros fatores já mencionados. (AL-ATTAR *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2018; THOMAS; OMUJETI; OGUNDAYOMI, 2012).

Tabela 22 Teores de Cd, Cr e Pb encontrados em amostras de batatas e suas variedades na literatura científica. (Teor em base seca).

Forma da batata	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Estudo
Resíduo de batata	-	0,075	0,014	Ju <i>et al.</i> 2017
Batatas Convencionais	-	-	ND – 0,46	Bochnia, 2010.
Batatas Convencionais	ND – 0,28*	ND – 15,6*	0,53 – 4,3	Mansour <i>et al.</i> 2009
Batatas Orgânicas	0,09 – 0,35*	0,01 – 14,6*	0,25 – 3,5*	
Chips de batata	ND – 3,12	ND – 4,4	ND – 1,89	Hariri <i>et al.</i> 2015
Batatas convencionais	0,08 – 0,32	-	0,51 – 0,77	Ozturk <i>et al.</i> 2011
Batatas convencionais	ND – 0,036	-	-	Corguinha <i>et al.</i> 2012
Cascas de batata	ND – 0,781	-	-	Fan <i>et al.</i> 2009
Batatas convencionais	0,046 – 0,15	-	-	
Batatas convencionais	0,06 – 1,3*	-	-	Sanderson <i>et al.</i> 2019
Batata Convencional	12 - 23	ND* – 0,22	ND* – 0,49	Neste estudo
Batata Orgânica	4,0 – 9,0	ND* – 0,80	ND* – 0,10	

ND = Não detectado / ND* = Abaixo do LOQ (=0,063 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr e 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb);

* Valores transformados para base seca, levando em consideração o teor de umidade médio de 85%

4.5 Estudos das frações bioacessíveis dos nutrientes/contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de batata

Conforme descrito na seção 3.8, dois protocolos referentes aos ensaios de bioacessibilidade foram aplicados na amostra de batata Monalisa convencional (BMC). A amostra BMC foi a escolhida uma vez que não houve diferença significativa entre os RCC obtidos para todas as amostras de batatas analisadas. A fração bioacessível (fase líquida) e a porção sólida obtidas após a aplicação dos protocolos foram posteriormente digeridas em meio ácido assistido por radiação micro-ondas e analisadas por ICP OES e GFAAS. Assim como no preparo de amostras para quantificação do teor total, as amostras *in natura* e cozidas não apresentaram bons resultados, em termos de precisão. De modo que, somente os resultados das amostras em base seca (liofilizadas) serão reportados e discutidos neste estudo.

Deve-se ressaltar que o protocolo P 1IN foi modificado em relação ao uso do extrato gástrico de coelho. A lipase gástrica (proveniente do extrato gástrico do coelho) é indicada por ser mais resistente a desnaturação ácida e por possuir propriedades bioquímicas adequadas para simulação *in vitro*. Nos seres humanos a digestão dos lipídios começa no estômago com ação da lipase pré duodenal (gástrica) e segue até o pâncreas, onde a lipase pancreática é responsável por digerir substratos lipídicos que foram mal digeridos na etapa anterior. Porém, para a efetiva ação da lipase gástrica faz-se necessário a utilização da enzima co-lipase, visto que a ação da lipase é inibida na presença dos ácidos biliares, ocasionando apenas a quebra de poucas ligações de ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas no estômago (CARRIÈRE *et al.*, 1998; PEIXOTO, 2015). Outro ponto a ser ressaltado está relacionado a polaridade dos lipídios, os quais são moléculas majoritariamente apolares que se encontram estáveis em suas ligações simples entre carbonos. De forma que, os lipídios não apresentam grupamentos ricos em elétrons para estabilizar os elementos metálicos que se comportam como ácidos de Lewis (MORRIS; MOHIUDDIN, 2021). Assim sendo, a probabilidade que os nutrientes estudados nesse trabalho estejam associados aos lipídios, é baixa. Ademais, encontram-se na literatura trabalhos recentes baseados neste protocolo que também não empregaram a lipase gástrica, tais como de Muleya *et al.* (2021) e Junejo *et al.* (2021). Aliás, a própria INFOGEST em sua versão anterior, não fazia uso desse reagente. Além dos fatores anteriormente citados, levando-se em consideração que há somente uma única empresa/fornecedor responsável pela comercialização (Lypolytech) da enzima gástrica de coelho, a qual não possui o reagente em estoque, sendo necessário em torno de seis meses para a emissão das remessas, e o alto valor de aquisição desse reagente, se optou por prosseguir os experimentos de bioacessibilidade sem esse reagente.

Estudou-se também a necessidade da utilização da enzima alfa-amilase, na etapa de digestão que ocorre na fase oral, obtendo-se resultados significativamente semelhantes entre os ensaios, quando na presença da alfa-amilase como na sua ausência. Isso ocorre, segundo Sherwood (2010), pois a etapa de digestão na fase oral é considerada pouco relevante, quando se leva em consideração o processo digestivo como um todo, não contribuindo significativamente para a liberação dos elementos inorgânicos na fração bioacessível. Essa constatação está relacionada a velocidade associada a fase oral de digestão (2 minutos no P 1IN), e principalmente, a capacidade das enzimas produzidas nas demais fases de digestão (gástrica e intestinal) de promover a completa digestão dos alimentos. Visto os resultados significativamente semelhantes e o alto custo da enzima alfa-amilase, optou-se por realizar a etapa oral da digestão do protocolo 1, sem a enzima alfa-amilase.

De forma geral, tem-se observado que em estudos que visam a mimetização da digestão *in vitro* maiores dispersões são relatadas para os resultados obtidos. Sendo as maiores dispersões relacionadas a fatores como a quantidade e o grau de pureza dos reagentes utilizados (MILANI, 2019). Levando-se em consideração as maiores dispersões pode se observar a partir da Figura 17 que ambos os protocolos aplicados se mostraram adequados para os estudos de bioacessibilidade. A recuperação foi o parâmetro utilizado para verificação da adequação dos métodos de digestão *in vitro*, de modo a avaliar quais os analitos estariam em níveis adequados para serem quantificados com adequada exatidão/precisão nas frações bioacessíveis, mesmo com as maiores dispersões. Com exceção do Ca e do Fe, os valores de recuperação obtidos para ambos os protocolos foram semelhantes estatisticamente. Entretanto, em relação as frações bioacessíveis os valores encontrados para Cu e Zn foram significativamente diferentes. Observa-se ainda, a partir da Figura 17, que para o protocolo P 1IN um valor discrepante de recuperação foi obtido para o Ca, fato esse que pode estar relacionado a maior quantidade de reagentes utilizados nesse protocolo, visto a utilização das soluções que simulam tanto a fase oral, gástrica, como a fase intestinal (Anexo 1 - Tabela A1) do processo digestivo.

Assim sendo, apesar da adequação dos dois protocolos estudados, optou-se por prosseguir somente com o ensaio P 1IN por se tratar de um protocolo normatizado, o que possibilita a comparação dos resultados com outros trabalhos da literatura. De forma que, os resultados obtidos a partir o protocolo P 1IN podem ser observados na Figura 18.

Figura 17. Valores de recuperação para os analitos Ca, Mg, P, Cu, Mn, Zn, Fe e K presentes na fração bioacessível para os dois protocolos (1IN e 2PE) de digestão *in vitro* aplicados em amostra de batata Monalisa convencional (BMC), em base seca.

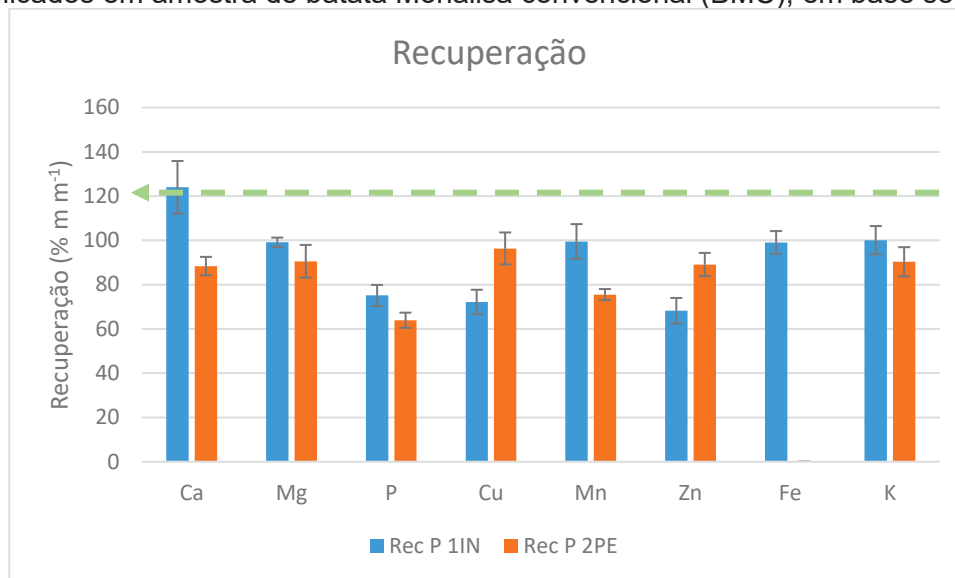
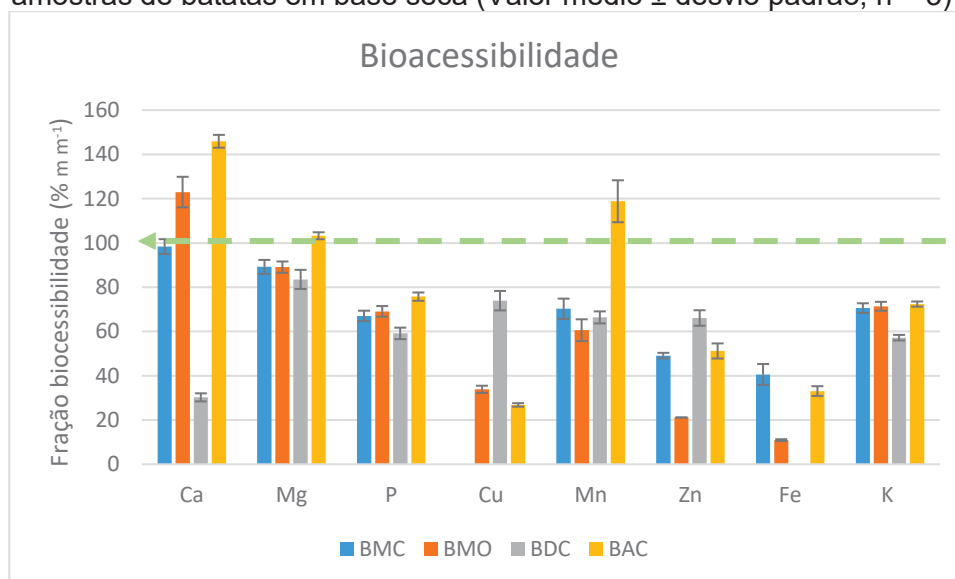


Figura 18. Teores dos elementos Ca, Mg, P, Cu, Mn, Zn, Fe e K presentes nas frações bioacessíveis aplicando-se o protocolo 1IN de digestão *in vitro* para as diferentes amostras de batatas em base seca (Valor médio \pm desvio padrão, n = 3)



Assim como nos estudos mencionados anteriormente na introdução deste trabalho, observa-se nesse estudo que as frações bioacessíveis dos elementos variam de elemento para elemento, e que os macronutrientes Ca, Mg, P e K apresentaram maior bioacessibilidade, para a maioria das amostras de batata, enquanto as menores frações bioacessíveis foram encontradas nos micronutrientes Cu, Zn e Fe. Este resultado pode ser explicado a partir da essencialidade e necessidade desses elementos tanto para os vegetais, frutas, tubérculos, como para os seres humanos (TOGNON, 2012). Os elementos Cd, Pb e Cr, analisados nas frações bioacessíveis por GFAAS, estavam abaixo do LOQ

(0,063 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr e 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb) não sendo possível inferir sobre suas frações bioacessíveis.

Observa-se na Figura 18 que entre as diferentes cultivares de batata estudadas, a amostra BDC foi a que apresentou menor fração bioacessível para Ca (30%) e Fe, enquanto a amostra BAC apresentou a maior fração bioacessível de Mn (118%) e uma fração discrepante para Ca (146%), a qual deve ser melhor investigada. Para Mg (83 – 103%), P (59 – 75%), Mn (60 – 70%), exceto para a amostra BAC, e K (58 – 72%), os teores das frações bioacessíveis apresentaram baixas variações entre as amostras.

Dentre os possíveis fatores para as diferentes frações bioacessíveis nas amostras de batata, é válido ressaltar neste caso a composição química da matriz, visto que todas as amostras foram submetidas ao mesmo ensaio de bioacessibilidade (P 1IN). Um bom exemplo da influência da composição química da matriz é a baixa bioacessibilidade do Ca na amostra de batata doce cultivada de forma convencional (BDC). A batata doce é um alimento rico em ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$), o qual é conhecidamente um inibidor de absorção de Ca, ocasionando em uma menor fração bioacessível do Ca nessa amostra quando comparadas as demais amostras estudadas (COZZOLINO, 2016). Ademais verifica-se que a amostra BDC apresentou as maiores frações bioacessíveis de Zn e Cu, enquanto as amostras com maiores frações bioacessíveis de Ca apresentaram menores frações bioacessíveis desses elementos. Isso acontece visto que altos níveis de Ca presentes na dieta, podem reduzir a bioacessibilidade e absorção de Fe, Zn e Cu (COZZOLINO, 2016; SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2015). Embora ainda não haja um consenso sobre os mecanismos pelos quais o Ca exerce uma influência negativa na bioacessibilidade e posterior absorção dos minerais, muitos autores sugerem um efeito em nível celular (COZZOLINO, 2016; YBARRA; COSTA; FERREIRA, 2001). Para que o Fe não heme (Fe de origem vegetal – Fe^{3+}) seja absorvido pelo organismo humano é necessário primeiro sua redução a Fe^{2+} para que a proteína transportadora de íons metálicos divalentes, conhecida como DMT-1, o transporte. Entretanto, essa proteína não é específica para o íon Fe^{2+} , sendo responsável também pelo transporte de íons divalentes como Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} . Dessa maneira, sugere-se que altos níveis de Ca^{2+} (um íon também divalente) iniba o transporte dos demais íons (GROTTO, 2008; YBARRA; COSTA; FERREIRA, 2001).

Outro exemplo relacionado a influência da composição química das amostras pode ser elucidado a partir do Fe. Esse nutriente tem sua fração bioacessível influenciada positivamente pela presença do ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) e do ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), seja na batata ou em alimentos ingeridos juntamente com a batata, o que significa que, quanto maior o teor desses compostos na batata, maior será a fração bioacessível do Fe. Em

contrapartida, o Fe terá sua fração bioacessível reduzida em amostras de batatas que apresentam maiores quantidades de fitatos ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) e alguns compostos fenólicos. Isso ocorre, pois, a presença dessas substâncias pode alterar a forma química dos nutrientes, bem como seu estado de oxidação. A presença de ácido ascórbico no alimento auxilia na redução do Fe^{3+} (Fe de origem vegetal) a Fe^{2+} , que possui uma melhor absorção pelas células. Por outro lado, compostos como o ácido fítico podem ser ligar ao Fe (e demais nutrientes), formando complexos insolúveis durante o processo de digestão humana, de maneira que o Fe se torna menos bioacessível ao organismo humano (ANDRE *et al.*, 2014; COZZOLINO, 2016; LANE, RICHARDSON, 2014).

Em efeito, as condições ambientais, o tipo de solo, o tipo e a concentração de fertilizantes/agroquímicos utilizados, bem como a variedade genética das batatas, são fortes determinantes de sua composição matricial (ANDRE *et al.*, 2014; ANDRE *et al.*, 2015; BURGOS *et al.*, 2007).

Da mesma forma os fatores genéticos dos indivíduos, como estado nutricional, sexo, idade e fatores gastrointestinais influenciam na quantidade dos nutrientes liberada pelos alimentos, isso porque fatores como o pH e as concentrações das enzimas nas sucessivas etapas de digestão podem alterar a forma química em que os elementos se encontram (COZZOLINO, 2016).

O fato é que, independentemente do fator pelo qual a bioacessibilidade é alterada, a maioria dos elementos estudados apresentou frações bioacessíveis menores do que 100%, o que significa que quase sempre a exposição interna (digestão) do nutriente é menor que o seu teor total presente na amostra. Dessa forma se observa a necessidade de adequação dos cálculos do IDR a partir das frações bioacessíveis, uma vez que somente os teores bioacessíveis é que estão disponíveis para a efetiva absorção e utilização por parte do organismo humano.

Os nutrientes investigados nesse trabalho são de suma importância para o bom funcionamento do organismo humano. O Ca além de ser um dos minerais mais importantes para a manutenção da vida, também é o mineral mais abundante no corpo humano, sendo responsável por aproximadamente 1 a 2% do peso corporal. Esse nutriente possui diversas funções tais como as funções estruturais, de formação e manutenção do esqueleto, regulação tempo-espacial na função neuronal entre outras. Acredita-se, ainda, que o Ca seja capaz de atuar na inibição da proliferação de certas células cancerígenas. Sendo o Ca um dos nutrientes mais importantes para os seres humanos, e sua deficiência pode causar diversos distúrbios ocasionando doenças como raquitismo, osteoporose, hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade entre outras (COZZOLINO, 2016).

Assim como o Ca, o P é considerado um dos principais componentes dos ossos e dos dentes. O P faz parte da estrutura química dos fosfolipídios, fosfoglicídeos, fosfoproteínas, ácidos nucleicos e nucleotídeos, grupos esses importantes para a agregação plaquetária. Dentre suas diversas funções no organismo humano, o P também apresenta a função de tamponamento de sistemas ácidos ou alcalinos, auxiliando na manutenção do pH, além de ser componente chave de duas moléculas de vital importância, o ATP e o 2,3-difosfoglicerato. Devido aos altos níveis de fosfato presente em animais e plantas que fazem parte da rotina alimentar dos seres humanos a deficiência de P é considerada rara, ocorrendo majoritariamente em razão da falta de administração desse mineral em pacientes em terapia nutricional parenteral. Já o K é um macronutriente necessário para o funcionamento correto das funções celulares, tais como a transmissão neural, a contração muscular, entre outras. A deficiência desse elemento está relacionada a perdas por vômitos, diarreias, desnutrição grave ou cirurgias, e em caso moderados ocasiona no aumento da pressão sanguínea, aumento no risco de cálculos renais, sensibilidade ao sal entre outros problemas. Em casos de deficiência aguda observa-se sintomas como arritmias cardíacas, fraqueza muscular e intolerância à glicose (COZZOLINO, 2016).

O Mg é um cofator (auxilia nas funções catalíticas) em mais de cem reações enzimáticas, além de ser extremamente importante no metabolismo de diversos nutrientes (Ca, K, P, Zn, Cu, Fe etc.), porém sua principal função está relacionada a estabilização da estrutura de ATP nos músculos e em outros tecidos moles. A baixa absorção de Mg está relacionada a elevação da pressão sanguínea, bem como aumento da excitabilidade muscular, arritmias cardíacas e outros diversos problemas (COZZOLINO, 2016).

Os micronutrientes Fe, Cu, Zn e Mn, assim como os macronutrientes, desempenham papéis importantes no organismo humano. No que diz respeito ao Fe, uma de suas funções mais importantes está relacionada ao transporte de oxigênio através da hemoglobina para os eritrócitos e através da mioglobina para os músculos. Sua deficiência está intrinsecamente relacionada a anemia, considerada a doença de maior incidência causada pela deficiência de um micronutriente. O Cu possui funções orgânicas bem específicas para respiração celular, oxidação e transporte de Fe, além de possuir um envolvimento considerável nos metabolismos do esqueleto, no sistema imunológico e na redução do risco de doenças cardiovasculares. Sua ausência no organismo é ocasionada por doenças como doença de Crohn, doença celíaca, fibrose cística e síndrome do intestino curto. A deficiência desse nutriente pode afetar o sistema nervoso causando graves danos neurológicos, e também, conduz à anemia. O Zn tem suas funções principais relacionadas ao sistema catalítico, estrutural e regulatório no organismo humano, atuando assim, de

forma fundamental no sistema imune. Sua deficiência no organismo está relacionada a distúrbios como anorexia, alteração do paladar, alopecia, disfunções imunológicas, entre outros. O Mn é um micronutriente indispensável no metabolismo dos macronutrientes, auxiliando na formação de tecidos, ossos e dos processos reprodutíveis. Assim como para o P, a deficiência de Mn é considerada rara em seres humanos (COZZOLINO, 2016). Dada a importância dos nutrientes estudados, os cálculos de IDR foram realizados para os teores encontrados nas frações bioacessíveis (Tabela 23).

Tabela 23 Valores de ingestão diária a partir do consumo de batatas, levando-se em consideração os teores obtidos pelas frações bioacessíveis dos nutrientes, em relação as quantidades estabelecidas pela RDC 269 da ANVISA e pela WHO (2012).

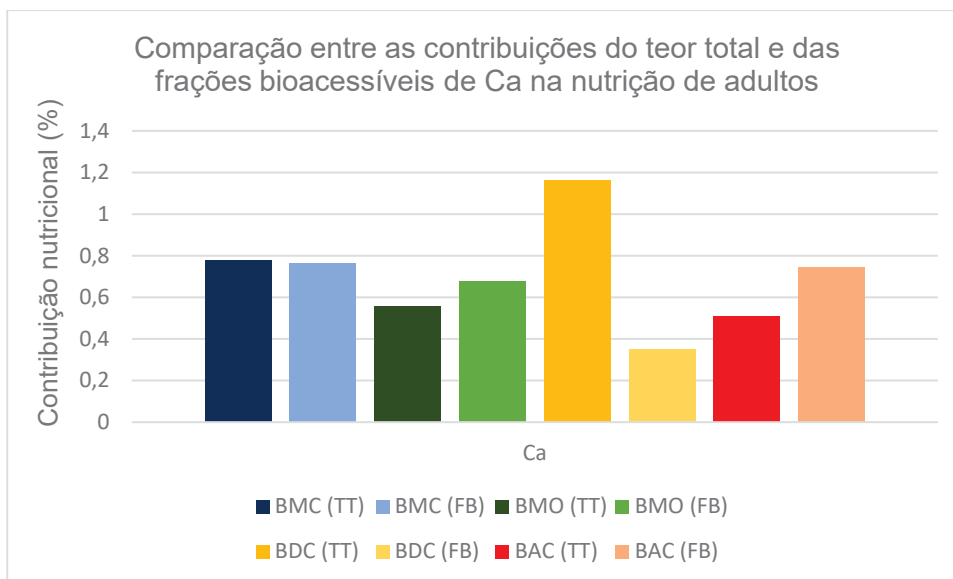
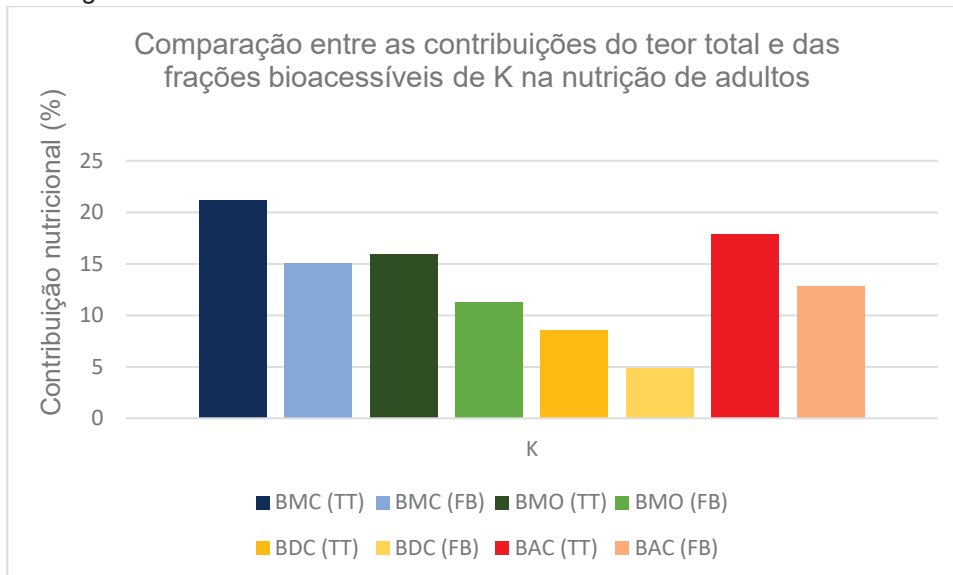
Analitos	Amostras					ANVISA	WHO
	BMC	BMO	BAC	BDC			
Ca (mg)	7,62	6,79	7,44	3,49	Adultos	1000	-
	5,12	4,56	5,00	2,35	Crianças	300 – 700	-
Mg (mg)	26,49	18,99	29,84	10,41	Adultos	260	-
	17,81	12,77	20,07	7,00	Crianças	36 – 100	-
P (mg)	34,68	52,82	42,42	20,52	Adultos	700	-
	23,32	35,52	28,53	13,80	Crianças	100 – 1250	-
Cu (mg)	-	0,06	0,04	0,11	Adultos	900	-
	-	0,04	0,03	0,08	Crianças	200 – 440	-
Mn (mg)	0,12	0,07	0,16	0,19	Adultos	2,3	-
	0,08	0,05	0,11	0,13	Crianças	0,003 – 1,5	-
Zn (mg)	0,30	0,08	0,18	0,11	Adultos	7	-
	0,20	0,05	0,12	0,07	Crianças	2,8 – 5,6	-
Fe (mg)	0,26	0,25	0,14	-	Adultos	14	-
	0,18	0,17	0,09	-	Crianças	0,27 – 9,0	-
K (g)	0,53	0,39	0,45	0,17	Adultos	-	3,5
	0,35	0,27	0,30	0,11	Crianças	-	3,5

BMC – batata Monalisa convencional; BMO – batata Monalisa orgânica; BAC – batata Asterix convencional e BDC – batata doce convencional.

Os valores reportados na Tabela acima indicam que a batata continua possuindo uma significativa contribuição para a ingestão diária da maioria dos nutrientes em relação as suas frações bioacessíveis. Dentre os quais destacam-se o Mg (de 4,0 a 11,5 % para adultos e 10,3 a 29,5% para as crianças), P (de 2,9 a 7,5% para adultos e 2,0 a 5,3% para as crianças), Mn (de 3,3 a 8,2% para adultos e 6,8 a 17% para as crianças), Zn (de 1,1 a 4,3% para adultos e 1,2 a 4,8% para as crianças) e K (de 4,9 a 15,1% para adultos e 3,3 a 10,1% para as crianças). Os elementos Ca e Cu possuem baixa contribuição nutricional tanto para o teor total (Tabela 17) como para a fração bioacessível. Enquanto o Fe apresenta uma menor contribuição nutricional quando sua fração bioacessível é considerada. A comparação entre as contribuições nutricionais da batata em relação aos teores totais e as frações bioacessíveis podem ser observadas nas Figuras 19 e 20 a seguir.

Figura 19 Gráfico de comparação entre a contribuição nutricional, das diferentes cultivares de batata, em relação ao teor total e as frações bioacessíveis de (a) K, (b) Ca, (c) Mg, P, Mn, Zn e Fe e (d) Cu para adultos.

TT – Teor total / FB – Fração bioacessível / BMC – Batata Monalisa convencional / BMO – Batata Monalisa orgânica / BDC – Batata Doce convencional / BAC – Batata Asterix convencional



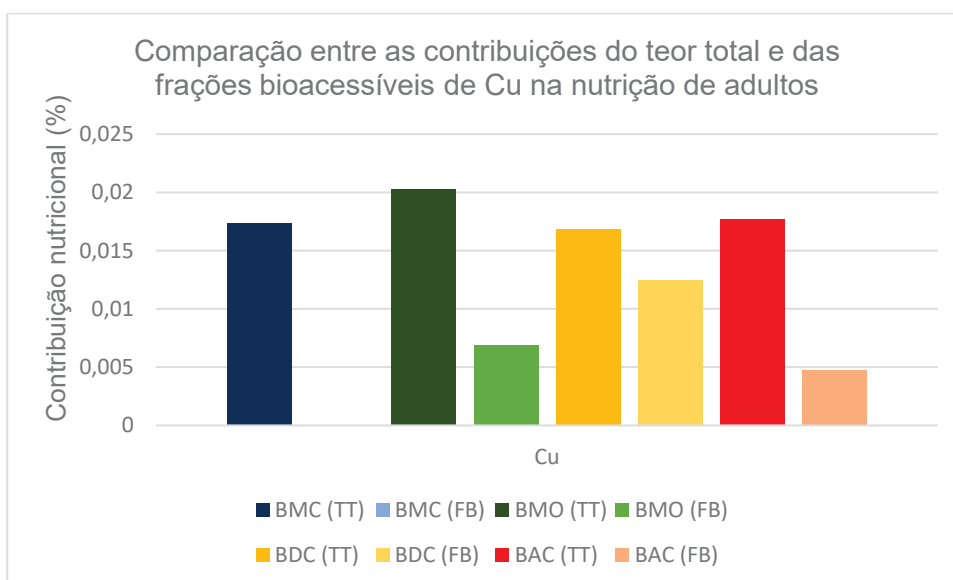
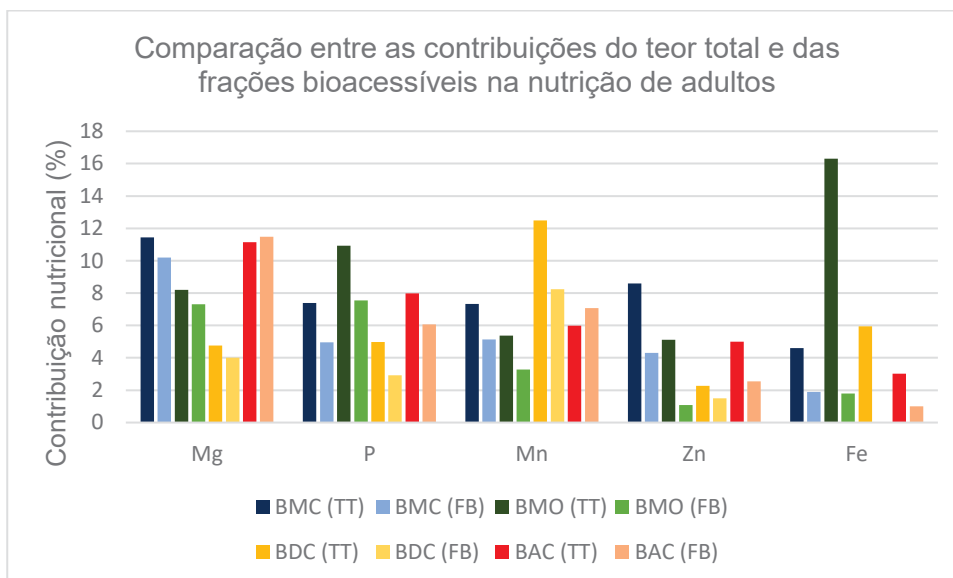
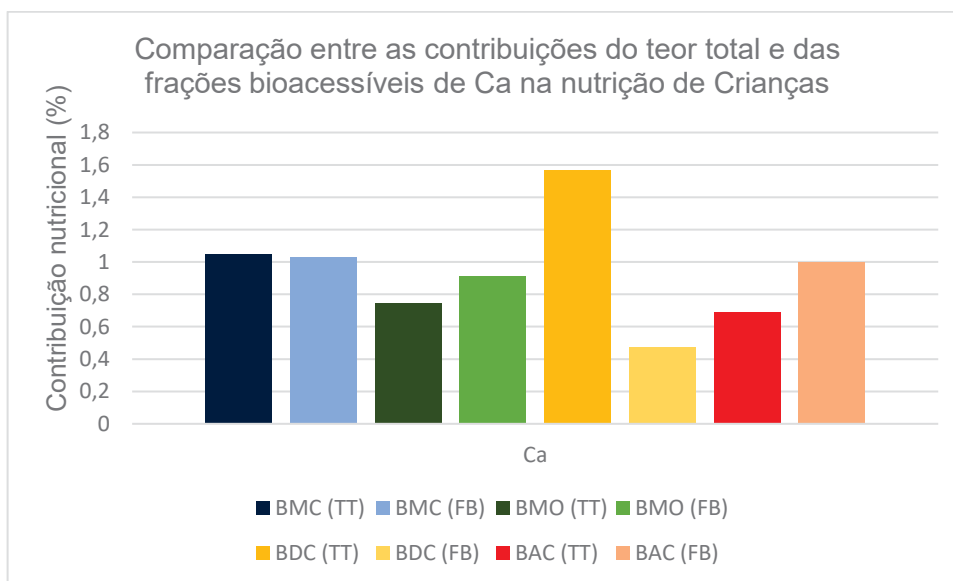
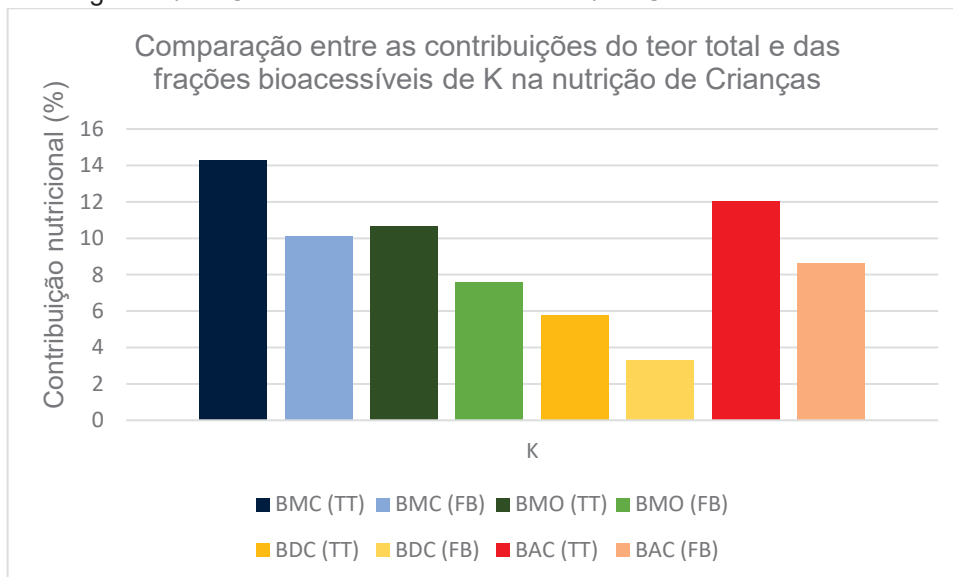
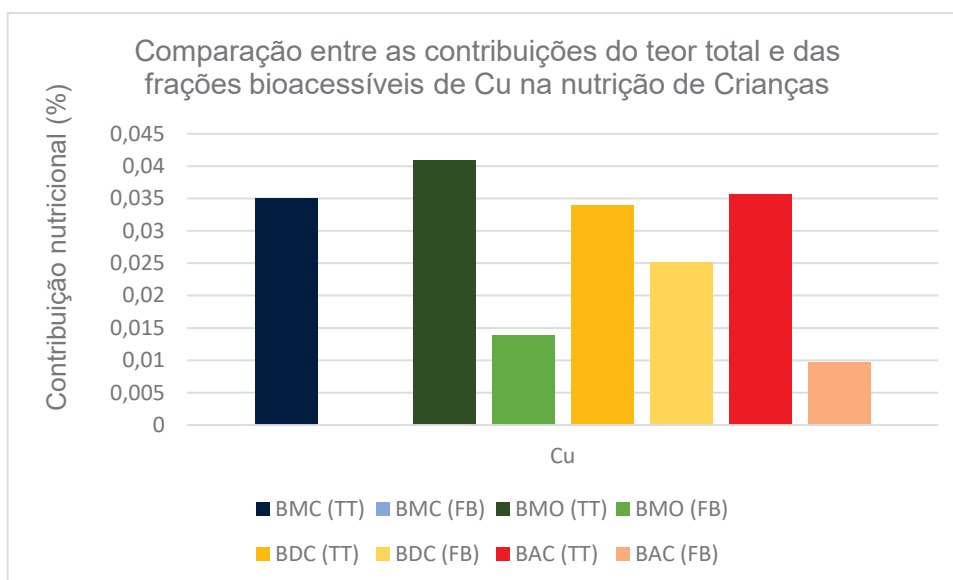
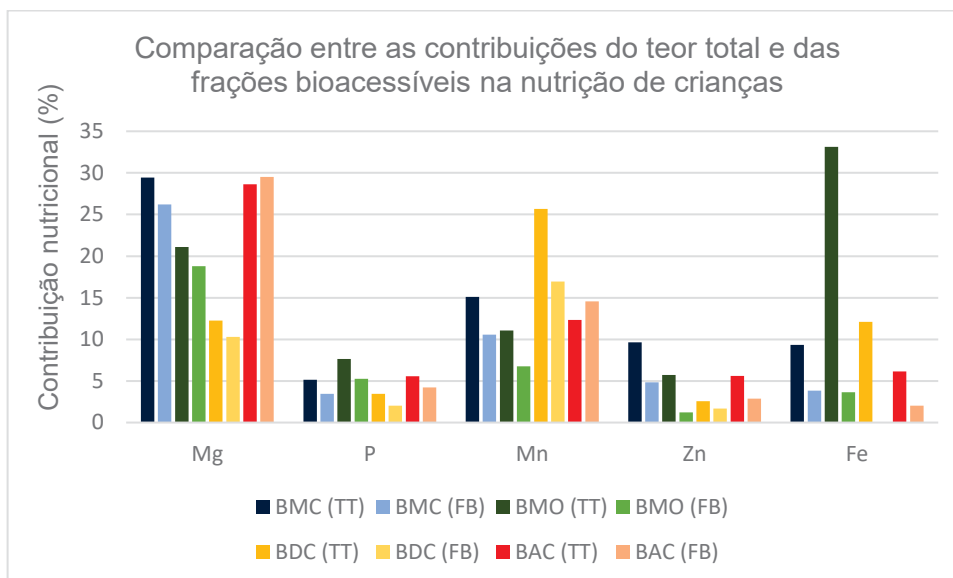


Figura 20 Gráfico de comparação entre a contribuição nutricional, das diferentes cultivares de batata, em relação ao teor total e as frações bioacessíveis de (a) K, (b) Ca, (c) Mg, P, Mn, Zn e Fe e (d) Cu para crianças.

TT – Teor total / FB – Fração bioacessível / BMC – Batata Monalisa convencional / BMO – Batata Monalisa orgânica / BDC – Batata Doce convencional / BAC – Batata Asterix convencional





Observa-se, a partir dos gráficos, que o para os elementos Ca, Mg, Mn e Fe as maiores contribuições nutricionais dizem respeito a nutrição infantil, enquanto que os nutrientes P e Zn a contribuição foi mais significativa para os adultos. Isso, levando-se em consideração a média de teores recomendados por dia para as crianças, os quais variam de acordo com as faixas etárias. Essas diferenças estão relacionadas tanto aos teores de nutrientes indicados na ingestão diária, bem como com o peso e o estado nutricional do indivíduo e com a quantidade de alimento ingerido. Como pode ser observado na Tabela 23, a necessidade dos minerais no organismo humano varia de acordo com a idade do indivíduo. Para melhor elucidar essa observação, tomamos como exemplo a quantidade diária recomendada para o Ca: enquanto crianças de 0 a 6 meses necessitam de 300 mg por dia, crianças de 7 a 10 anos devem ingerir 700 mg, e os adultos de modo geral, requerem 1000 mg por dia. O mesmo ocorre para os demais minerais (ANVISA, 2005). A

menor quantidade na fase infantil não está relacionada a menor necessidade dos nutrientes e sim a fatores do indivíduo, como peso, idade, fatores genéticos entre outros. Ainda utilizando o Ca como exemplo percebe-se a necessidade de maiores ingestões diárias por parte dos adultos devido a perda desse elemento pelo organismo. Como já mencionado, dentre as diversas funções exercidas pelo cálcio no organismo, esse elemento está intrinsicamente relacionado a formação e manutenção da estrutura óssea corporal. Porém devido ao processo de ressorção (liberação do cálcio do osso), mulheres na menopausa e homens idosos tendem a perder significativamente esse elemento, necessitando de maiores quantidades de Ca, enquanto em crianças o processo de formação óssea se sobrepõe ao processo de ressorção (COZZOLINO, 2016).

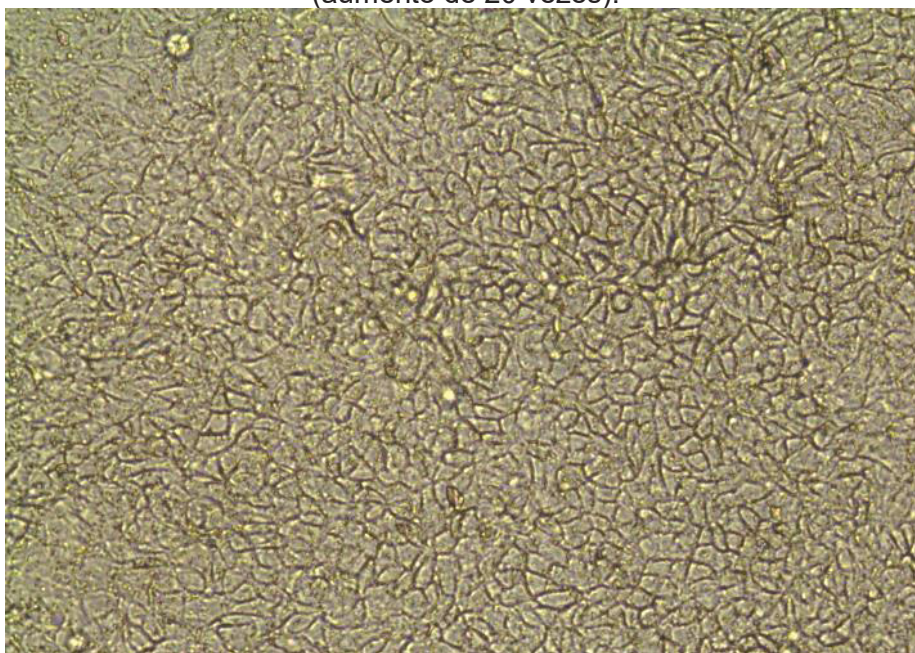
4.6 Estudos das frações biodisponíveis dos nutrientes inorgânicos presentes nas amostras de batata

Para que as células se multipliquem, permaneçam em cultura, formem a monocamada e se diferenciem é necessário que se disponibilize meios de cultura que promovam a nutrição celular e que simulem as condições adequadas para a cultura celular. Nesse sentido, componentes básicos como sais, vitaminas, aminoácidos, proteínas, antibióticos entre outros são comumente utilizados nos meios de cultura. Para as células Caco-2, os nutrientes necessários são disponibilizados a partir do meio de cultura DMEM contendo elevado teor de glicose suplementado com soro fetal bovino, solução de aminoácidos, L-glutamina, piruvato de sódio, antibióticos e HEPES. Porém, o meio de cultura suplementado, nesse caso, tem a função não somente de fornecer nutrientes, bem como oferecer outros fatores como os de crescimento e de adesão celular ao substrato e de promoverem o tamponamento do meio de cultura. Entretanto, além do meio de cultura, para a proliferação e sobrevivência das células o controle de outros parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, umidade e controle da composição atmosférica (% CO₂ e O₂) também são essenciais (GONÇALVES & SOBRAL, 2020). Dessa forma, visando o crescimento adequado da cultura celular Caco-2, o fornecimento de nutrientes foi realizado a cada 48 - 72 horas e as células foram mantidas incubadas a 37 °C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ e 95% de ar, como descrito em materiais e métodos (seção 3.8). Para a troca do meio de cultura e repique (subcultivo) foi necessário avaliar o crescimento e aderência das células a partir do microscópio óptico invertido. Para a troca do meio observou-se ainda os aspectos físicos do meio como coloração e opacidade e o aspecto químico: pH do meio (o qual deve estar entre 7,0 e 7,6). A depender da confluência, repiques (> 70%) ou a troca do meio (< 70%) foi realizada.

No que se refere aos ensaios de biodisponibilidade utilizando-se as células Caco-2, como já descrito na introdução, a formação da monocamada e a diferenciação das

células são imprescindíveis. Na Figura 21 é possível verificar a formação da monocamada obtida para as células cultivadas em laboratório após 8 a 10 dias de sua inserção nos insertos poliméricos, Transwell®. Apesar da sua heterogeneidade, observou-se contornos evidentes indicando a formação de uma monocamada. Para verificação da integridade da monocamada, além da observação morfológica das células, mediu-se a resistência elétrica transepitelial (TER) antes e durante os experimentos. A TER fornece informações sobre a proximidade e integridade das junções de oclusão (junções estreitas) presentes na monocamada, isso porque, a barreira formada pelas junções constitui um obstáculo para a troca de eletrólitos entre o compartimento apical e basolateral, gerando uma resistência elétrica. De modo que a resistência transepitelial indica o quão confluenta e justapostas estão as células na monocamada. Quanto mais justapostas, maior a dificuldade de transporte de um compartimento para o outro e maior a resistência transepitelial (PRESS & DI GRANDI; 2008). Assim sendo, conforme descrito em Peixoto (2015), somente os poços com monocamada que apresentaram TER maiores que $250 \Omega \text{ cm}^2$ foram utilizados, visto que valores acima de $250 \Omega \text{ cm}^2$ indicam uma confluência com células justapostas adequadas para os ensaios de biodisponibilidade.

Figura 21 Micrografia óptica das células Caco-2 em meio de cultura. (aumento de 20 vezes).

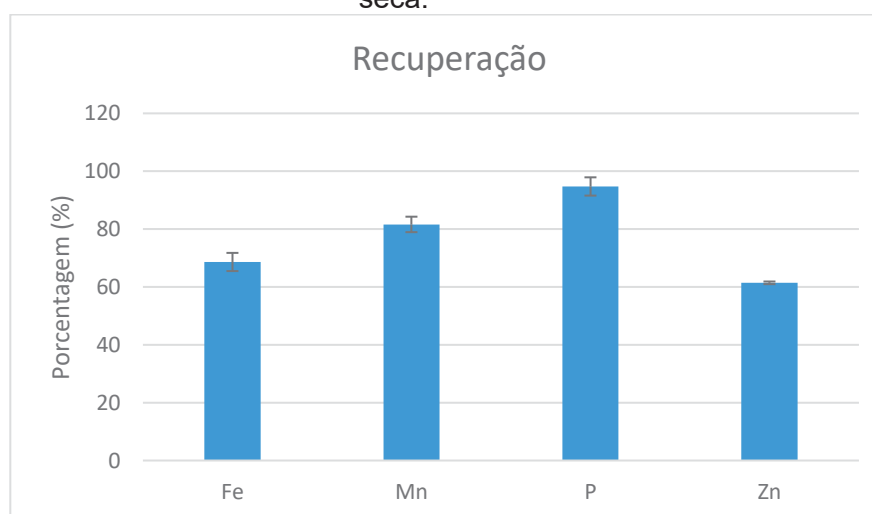


Além dos fatores anteriormente citados, para os estudos de absorção de compostos e elementos químicos inorgânicos utilizando-se células Caco-2, como neste trabalho, a concentração da osmolalidade também deve ser levada em consideração, afim de garantir a integridade da monocamada formada, a qual mimetiza a barreira física no epitélio intestinal. Valores de osmolalidade discrepantes de 310 mOsm Kg^{-1} podem levar a lise (morte) celular e a desintegração das monocamadas (VERHOECKX et al. 2015). Desse

modo as frações bioacessíveis das amostras de batata BMC liofilizada bem como a solução salina utilizada no compartimento basolateral, foram avaliadas. A solução salina apresentou uma osmolalidade de 304 mOS Kg⁻¹, enquanto as amostras de batata apresentaram 480 ± 9,7 mOSm Kg⁻¹ sendo necessária a diluição da amostra com água ultrapura. De modo que para inserção da fração bioacessível nos insertos poliméricos contendo as células, uma diluição de aproximadamente 1,6 vezes foi realizada, obtendo-se valores finais de osmolalidade de aproximadamente 306 ± 5,0 mOSm Kg⁻¹.

Assim como reportado no trabalho de Peixoto (2015), em relação aos ensaios de biodisponibilidade, os teores de Ca, K, e Mg não puderam ser quantificados pelas técnicas espectrométricas, utilizadas nesse trabalho, visto os altos teores desses elementos nos reagentes utilizados durante os experimentos. Observou-se também, que, assim como nos estudos relativos as frações bioacessíveis, os altos teores de elementos presentes nos reagentes e a grande quantidade de reagentes utilizados geraram uma maior dispersão nos resultados. De maneira que nesse estudo, uma dispersão elevada foi encontrada para o Cu (RSD > 40%), não sendo possível avaliar seus resultados. Para os analitos Fe, Mn, P e Zn valores de recuperação entre 60 e 95% foram obtidos para os ensaios de biodisponibilidade, conforme Figura 22, de modo que os seus resultados serão discutidos posteriormente nesse trabalho. Nesse caso, utilizou-se das frações bioacessíveis, obtidas através do protocolo padronizado P 1IN (INFOGEST), nos compartimentos apicais, para os ensaios de biodisponibilidade baseado no trabalho de Peixoto (2015).

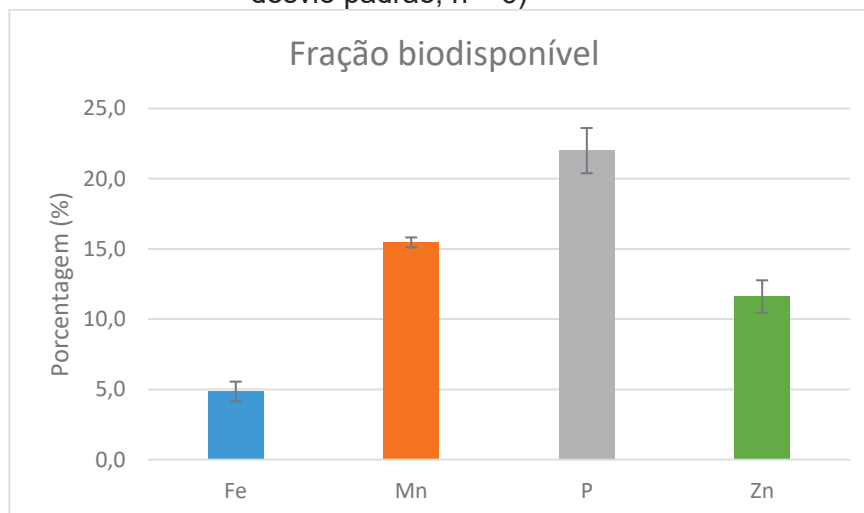
Figura 22 Valores de recuperação para os analitos Fe, Mn, P e Zn presentes na fração biodisponível aplicando-se o **protocolo de biodisponibilidade** baseado em Peixoto (2015) *in vitro* (células Caco-2), utilizando-se das frações bioacessíveis do protocolo P 1IN (INFOGEST) para as amostras de batata Monalisa convencional (BMC) em base seca.



Na Figura 23 é apresentado os teores dos elementos Fe, Mn, P e Zn aplicando-se o protocolo, referente aos ensaios de biodisponibilidade, de Peixoto (2015) para a

avaliação da fração biodisponível. Observou-se que as frações biodisponíveis variaram entre 4,9% a 22% a depender do analito.

Figura 23 Teores dos elementos Fe, Mn, P e Zn presentes nas frações biodisponíveis aplicando-se o **protocolo de biodisponibilidade** baseado em Peixoto (2015) *in vitro* (células Caco-2) utilizando-se das frações bioacessíveis do protocolo P 11N (INFOGEST) para as amostras de batata Monalisa convencional (BMC) em base seca (Valor médio \pm desvio padrão, n = 6)



Assim como nos estudos de bioacessibilidade, as frações biodisponíveis dos minerais podem ser influenciadas por diversos fatores, como os tipos de ligações química desses elementos na matriz, a presença ou ausência de outros componentes alimentares, metabolização, estado nutricional e de saúde do indivíduo, entre outros (AFFONFERE et al., 2023).

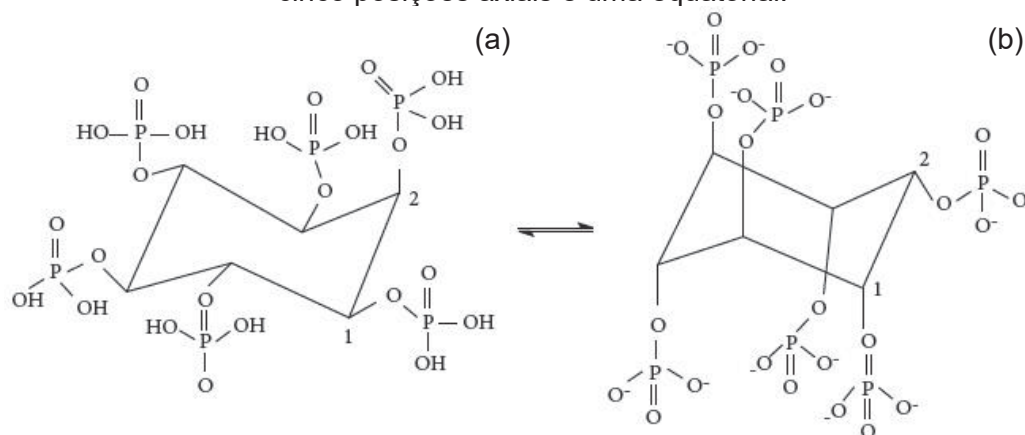
Para o Fe estima-se frações biodisponíveis entre 15 a 20% considerando o Fe heme, em dietas mistas (carnes e demais grupos alimentares), enquanto que para o Fe não heme, a disponibilidade é variável, contudo, sempre baixa. Ademais, ao tempo em que a absorção do Fe heme não é influenciada pelo estado nutricional do indivíduo, a absorção do Fe não heme é influenciada significativamente não somente por esse fator, bem como pela dieta alimentar (COZZOLINO 2016; SANTO et al., 2004). De modo que, apesar da baixa biodisponibilidade de Fe (4,9%) nesse trabalho, estudos relatam que dentre o grupo das hortaliças, leguminosas e tubérculos, a batata é o alimento que apresenta maiores frações biodisponíveis devido à presença de vitamina C e de baixos níveis de ácido fítico como explicado anteriormente na seção 4.5 (PADMANABHAN *et al.*, 2016). Assim como para o Fe, a biodisponibilidade do Zn (12%) nesse trabalho ficou abaixo do estimado por Cozzolino (2016), a qual indica uma absorção entre 20 e 40%. A menor absorção de Zn, em relação a literatura, pode estar relacionada dentre vários fatores ao teor de Ca apresentado nas amostras de batata Monalisa convencional. Pois, além do fato supracitado

do íon Ca^{2+} inibir o transporte dos metais divalentes, o cálcio pode ainda formar complexos insolúveis com o zinco diminuindo sua absorção no organismo humano.

A biodisponibilidade do fósforo e manganês, assim como dos demais elementos é influenciada pela forma química dos elementos no alimento e pela presença de uma série de substâncias como exemplificado para o ferro e zinco. Segundo a literatura o fósforo orgânico (naturalmente encontrado no alimento) apresenta uma menor disponibilidade, visto que necessita da ação de enzimas digestivas para ser hidrolisado e absorvido na forma inorgânica. O manganês tem sua absorção afetada principalmente por fontes de carboidratos, proteína animal e pela presença de outros minerais, dentre os quais o Fe é considerado o principal. Em efeito, um estudo realizado por Finley (1999) observou que em mulheres com baixa ferritina (proteína que reserva ferro) e baixa ingestão de manganês, a absorção do desse elementos foi 5 vezes maior do que em mulheres que apresentaram ferritina alta. De modo que, ao contrário do que se presume, para o manganês, a eficiência de absorção parece ser favorecida com a ingestão de menores teores. Tal fato está relacionado aos mecanismos de absorção por parte do organismo humano. Ademais, assim como para o Fe e Zn, a presença de ácido fítico presente na dieta a base de vegetais é responsável pela baixa biodisponibilidade de elementos como P e Mn (SANDBERG, 2002, COZZOLINO 2016, AFFONFERE et al., 2023). De modo que o fato da batata apresentar um baixo conteúdo de ácido fítico pode estar relacionado a uma maior fração biodisponível (22%) do fósforo e (15%) manganês nesse estudo.

O ácido fítico ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$) é um ácido orgânico que tem como papel fisiológico a reserva de fósforo, de energia, bem como ser fonte de cátions nos vegetais (COSGROVE, 1963). A depender do pH do meio, o ácido fítico pode apresentar diferentes conformações (Figura 24), e sua estrutura indica o alto potencial quelante, visto a presença de 12 átomos de hidrogênio substituíveis. Em valores de pH superior a 11,3 a maior parte dos grupos fosfatos (5) encontra-se na posição axial, já em pH abaixo de 10 a configuração muda de maneira que a maior parte do grupo fosfato (5) encontra-se na posição equatorial. As conformações variam de acordo com o pH de forma a fornecer maior estabilidade a molécula a partir da minimização das repulsões eletrostáticas da molécula (PATO; NOAILLY; MOSSOYAN, 1999).

Figura 24 Conformações do ácido fítico: (a) cinco posições equatoriais e uma axial; e (b) cinco posições axiais e uma equatorial.



Fonte: PATO; NOAILLY; MOSSOYAN, 1999

Ademais, o ácido fítico pode sofrer processos de desfosforilação durante os processos de armazenamento, cocção e digestão dos alimentos, de forma a produzir compostos pentafosfato (IP⁵), tetrafosfato (IP⁴), trifosfato (IP³) e até mesmo compostos difosfato (IP²) e monofosfato (IP¹). Entretanto somente os compostos puro com seis e com cinco grupos fosfatos apresentam efeitos antinutricionais em relação aos minerais. Isso ocorre, visto que 6 dos 12 prótons substituíveis são fortemente dissociados ($pK_a < 3,5$), de maneira que em compostos com 6 e 5 grupos fosfatos, o ácido fítico adquire carga fortemente negativa em uma ampla faixa de pH (acima de 5), interagindo facilmente com os cátions (e com proteínas até em valores de $pH=10$). (SANDBERG et al., 1989; PERSSON, 1998).

Segundo Thompson (1987), em pH intermediário, entre 5 a 10, além das ligações diretas entre os cátions metálicos e o ácido fítico (ligação tipo $O-M^{2+}-O$), as proteínas presente no meio podem também formar complexos ternários com os cátions e o ácido fítico (ligações $O-M^{2+}$ -proteínas). O fato é que devido a estabilização adquirida a partir da complexação dos metais e proteínas ao ácido fítico em pH intermediário, os complexos formados são em geral insolúveis, não permitindo a absorção por parte do organismo, como por exemplo a partir da proteína transportadora de íons metálicos divalentes, DMT-1 (COZZOLINO, 2016; SANDBERG et al., 1989; PERSSON, 1998).

Em relação a contribuição nutricional das frações biodisponíveis, percebe-se uma redução significativa visto as baixas taxas de transporte do compartimento apical para o basolateral. Entretanto, mesmo para as frações bioacessíveis, estudos que levem em consideração o estado no qual as batatas são ingeridas se fazem necessários para um melhor entendimento de suas funções nutricionais. Segundo relatado por Tognon (2012) os alimentos quando cozidos tendem a apresentar perdas dos nutrientes correspondentes

ao teor total, porém há um aumento nas frações bioacessíveis dos elementos, a qual pode influenciar na bioacessibilidade desses elementos. Esses fatos estão relacionados a capacidade das moléculas de água em “modificar” os compostos. As moléculas de água são capazes de atingir o interior do alimento e solubilizar uma parte dos elementos, transportando-os para fase líquida e diminuindo suas concentrações na fase sólida. Em contrapartida, as moléculas de água, quando em elevada temperatura, são capazes de desnaturar as proteínas e descaracterizar as fibras naturais, gelatinizando o amido, de forma a tornar os nutrientes mais bioacessíveis, visto a fragilização entre as ligações que ocorrem entre os nutrientes e os demais componentes alimentares. Em efeito, quando os resultados obtidos nesse estudo (amostras de batatas cruas) são comparados ao estudo de Andre *et al.* (2015), onde o teor bioacessível foi obtido a partir de amostras de batata cozidas, observa-se um aumento na fração bioacessível de 11 – 40 % (obtidas nesse estudo) para 64 – 79%.

Ademais, o estudo de outros fatores como a ingestão de grupos alimentares também se mostra necessário, pois como elucidado por Cozzolino (2016) os minerais e elementos – traços são mais lentamente absorvidos quando consumidos com outros componentes da dieta alimentar do que quando ingeridos isoladamente. Assim sendo, estudos que levem em consideração os componentes alimentares dos alimentos, comumente, ingeridos juntamente com a batata e sua forma de ingestão devem ser levados em consideração para uma análise mais eficaz sobre sua contribuição nutricional.

CONCLUSÃO

Como bem elucidado na literatura, o método de mineralização ácida assistida por radiação micro-ondas forneceu soluções compatíveis para as técnicas analíticas espectrométricas empregadas nesse trabalho. Bem como os métodos analíticos empregados em ICP OES e ICP-MS apresentaram adequados parâmetros de desempenho para a quantificação confiável dos nutrientes/contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de batata. Para a técnica GFAAS, os métodos desenvolvidos apresentaram adequada seletividade, sendo possível empregar uma curva analítica de calibração externa de modo a facilitar sua execução sem a necessidade de consumo de amostras para os elementos Cd, Cr e Pb, além de ter apresentado parâmetros de desempenho satisfatórios.

Em relação aos estudos das frações bioacessíveis e biodisponíveis, os protocolos *in vitro* utilizados tem se mostrado adequados, de acordo com a literatura, para a simulação e mimetização da digestão gastrointestinal e o processo de absorção dos elementos químicos na fase intestinal pelo organismo humano. Entretanto para situações diversas em que o indivíduo pode se encontrar, como por exemplo, ser portador de doenças, desnutrição, estar em estado de gestação entre outros, os parâmetros dos protocolos *in vitro* devem ser ajustados. Para os ensaios de bioacessibilidade realizados, apesar dos dois métodos utilizados apresentarem valores de recuperação próximos para os analitos investigados, com exceção do Fe, valores significativamente diferentes para as frações bioacessíveis foram obtidas para o Cu e o Zn. Fato este que pode estar associado a interação dos componentes da matriz com as soluções utilizadas nos protocolos, visto que no protocolo 2PE as enzimas foram solubilizadas em água, enquanto no protocolo P 1IN soluções de simulação de cada etapa do processo digestivo foram utilizadas. Ademais, além da diferença dos valores obtidos para as frações bioacessíveis de Fe, Cu e Zn entre os dois protocolos e da utilização das soluções que simulam a fase oral, gástrica e intestinal no protocolo P 1IN, optou-se pelo protocolo padronizado da INFOGEST, o qual permite uma maior comparação entre os trabalhos na literatura.

Apesar da influência de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos inerentes ao estudo realizado, quando na ingestão de nutrientes por parte do organismo humano, observou-se nesse trabalho que as amostras de batata apresentaram uma significativa contribuição em relação aos teores totais e suas frações bioacessíveis para Mg, P, K, Mn e Zn, enquanto para o Fe a contribuição nutricional diminuiu consideravelmente para as frações bioacessíveis (m m^{-1}) de 16% para 1,8% para adultos e 33% para 3,0% no caso das crianças, levando-se em consideração a amostra de batata Monalisa orgânica (BMO). O Ca apresentou as menores contribuições no que diz respeito aos macronutrientes (0,7 a 1,6% para crianças e de 0,5 a 1,2% para adultos), mesmo apresentando elevados teores

totais e frações bioacessíveis próximas a 100 %, fato este que é devido a grande quantidade recomendada de ingestão diária (1000 mg).

No que se refere as frações biodisponíveis observou-se que a batata apresenta baixa contribuição nutricional para todos os elementos estudados, dado as baixas frações encontradas (frações menores que 23% $m\ m^{-1}$). Ainda assim, observou-se na literatura que quando o grupo de alimentos compostos por hortaliças, leguminosas e tubérculos é levado em consideração, a batata tende a apresentar uma melhor absorção de minerais como Fe, Mn, Zn e P devido aos baixos teores de ácido fítico.

Para os elementos que apresentam toxicidade à saúde humana (Cd e Pb), tanto os teores totais, se encontraram abaixo do limite máximo preconizado pela RDC 269/2005 da ANVISA, como as frações bioacessíveis (<LOQ: 0,063 $\mu g\ L^{-1}$ Cd, e 0,44 $\mu g\ L^{-1}$ Pb) indicando o consumo seguro do alimento. Contudo, levando-se em consideração a presença de elementos como Cd, Pb entre outros potencialmente tóxicos em fertilizantes, principalmente os fosfatados, e agroquímicos utilizados no cultivo da batata, bem como a possibilidade da presença desses elementos no próprio solo, um monitoramento contínuo deve ser realizado de forma a garantir a segurança alimentar da população.

Assim sendo, os resultados obtidos a partir das frações bioacessíveis e biodisponíveis corroboram a importância de se levar em consideração o processo de digestão e absorção dos nutrientes para avaliação dos riscos de ingestão dos elementos potencialmente tóxicos, bem como a efetiva contribuição nutricional da batata.

Vale ressaltar também, que até o presente momento, a forma como o estudo está sendo conduzido e a abordagem/correlação dos resultados obtidos, conduz a novos entendimentos acerca da matriz de estudo, principalmente em termos de seu efeito nutricional, e também de seu potencial tóxico ao indivíduo. Ademais, que seja de nosso conhecimento, os resultados obtidos para a bioacessibilidade de Ca, Mg, K, P, Cu, Mn e Zn em amostras de batata e biodisponibilidade para Fe, Mn, P e Zn, são inéditos na literatura científica. O que é relevante, sendo a matriz de estudo (batata) um dos alimentos mais consumidos na atualidade.

ETAPAS FUTURAS

- Estudo sobre a influência de componentes alimentares na bioacessibilidade dos elementos em estudo;
- Estudos sobre os teores totais e as frações bioacessíveis e biodisponíveis em amostras cozidas a partir de análises por ICP-MS;
- Estudos sobre os teores totais e as frações bioacessíveis e biodisponíveis de Na, visto a importância da bomba sódio-potássio no organismo humano;
- Desenvolvimento de método adequado para a quantificação de As nas amostras de batata.

REFERÊNCIAS

- AFFONFERE, M. et al. in-vitro Digestibility Methods and Factors Affecting Minerals Bioavailability: A Review. *Foods Reviews International*, v. 39, n. 2, p. 1014 – 1042, 2023.
- AGUILERA-VELÁZQUEZ, J. R.; CALLEJA, A.; MORENO, I.; BAUTISTA, J.; ALONSO, E. Metal profiles and health risk assessment of the most consumed rice varieties in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 117, n. April, p. 105101, 2023.
- AL-ATTAR, L. ; AL-OU DAT, M.; SHAMALI, K.; GHANY, B. A. ; KANAKRI, S. Case study : heavy metals and fluoride contents in the materials of Syrian phosphate industry and in the vicinity of phosphogypsum piles. *Environmental Technology*, v. 33, n. 2, p. 143–152, 2012.
- ANDRADE, D. F. ; SPERANÇA, M. A. ; FILHO, E. R. P. ; Different sample preparation methods for the analysis of suspension fertilizers combining LIBS and liquid-to-solid matrix conversion: determination of essential and toxic elements. *Analytical Methods*, v. 9, p. 5156 – 5164, 2017.
- ANDRE, C.M. et al. In Vitro Bioaccessibility and Bioavailability of Iron from Potatoes with Varying Vitamin C, Carotenoid, and Phenolic Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 9012 – 9021, 2015.
- ANDRE, C.M. et al. The Potato in the Human Diet: a Complex Matrix with Potential Health Benefits. *Potato Research*, v. 57, p. 201–2014. 2014.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013-2015. Gerência Geral de Toxicologia, Brasília. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3778json-file-1>> Acesso em 15 de Julho de 2023.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013-2015. Gerência Geral de Toxicologia, Brasília.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- Resolução RDC nº 42, de 29 de Agosto de 2013.
- ARAUJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 57, n. April, p. 2121–2132, 2002.

ARCEUSZ, A.; RADECKA, I.; WESOŁOWSKI, M. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. *Food Chemistry*, v. 20, n. 1, p. 52–58, 2010.

ARPADJAN, S.; ÇELİK, G.; TAŞKESEN, S.; GUÇER, Ş. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 8, p. 2871–2875, 2008.

ARSLAN, Z.; TYSON, J. F. Slurry sampling for determination of lead in marine plankton by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 86, n. 2, p. 227–234, 2007.

BARELA, P. S.; SILVA, N. A.; PEREIRA, J. S. F.; et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. *Fuel*, v. 204, n. 15, p. 85–90, 2017.

BERTIN, R.L et al. Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. *Food Composition and Analysis*, v. 47, n. April, p. 45-51, 2016.

BIZZI, C. A.; PEDROTTI, M. F.; SILVA, J. S.; et al. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 32, p. 1448–1466, 2017.

BOCHNIA, L. P. Determinação de Cd, Cu e Pb em batata produzida na região de Guarapuava-PR utilizando técnica voltamétrica. 2010. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Centro Oeste – PR.

BROADLEY, M. et al. Function of Nutrients: Micronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3. ed. [s.l.] Academic Press, 2012. p. 191–248.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

BURGOS, G. et al. Iron and zinc concentration of native Andean potato cultivars from a human nutrition perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, n. 4, p. 668 – 675, 2007.

CABRERA-VIQUE, C.; TEISSEDE, P.; CABANIS, M.; CABANIS, J. Determination and Levels of Chromium in French Wine and Grapes by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1808 – 1811, 1997.

CÁMARA-MARTOS, F. et al. Selenium and cadmium in bioaccessible fraction of organic weaning food: Risk assessment and influence of dietary components. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 56, n. December, p. 116 – 123, 2019.

CARRIÈRE, F. et al. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1376, n. 3, p. 417-432, 1998.

CARRIÈRE, P.; MANTHA, M.; CHAMPAGNE-PARADIS, S.; JUMARIE, C. Characterization of basolateral-to-apical transepithelial transport of cadmium in intestinal TC7 cell monolayers. *Biometals*, v.24, n. 5, p. 857-874, 2011.

CASTRO, M.A.; ALLER, A.J.; Mechanistic study of the aluminum interference in the determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 58, n. 30, p. 901 – 908, 2003.

CHAKRABORTI, D.; IRGOLIC, F.A. Matrix interferences in arsenic determinations by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Recommendations for the determination of arsenic in water samples. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 17, n.3-4, p 241 – 256, 1984.

CHANTRET, I.; BARBAT, A.; DUSSAULX, E.; BRATTAIN, M. G.; ZWEIBAUM, A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research*, v. 48, n. 7, p. 1936 – 1942, 1988.

CHANTRET, I.; RODOLOSSE, A.; BARBAT, A.; DUSSAULX, E.; BROT-LAROCHE, E.; ZWEIBAUM, A.; ROUSSET, M. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*, v.107, n. Pt 1, p. 213 – 225, 1994.

CHERAGHI, M.; LORESTANI, B.; MERRIKHPOUR, H.; ROUNIASI, N. Heavy metal risk assessment for potatoes grown in overused phosphate-fertilized soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, p. 1825–1831, 2013.

CHIOCCHETTI, G. M. et al. Toxic trace elements in dried mushrooms: Effects of cooking and gastrointestinal digestion on food safety. *Food Chemistry*, v. 306, n. February, p. 125478, 2020.

Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (Consea). Os impactos dos agrotóxicos na segurança alimentar e nutricional: contribuições do Consea, Brasília, 2010.

CORGUINHA, A. P. B. et al. Cadmium in potato and soybeans : Do phosphate fertilization and soil management systems play a role ?. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 27, n. 1, p. 32–37, 2012.

CORGUINHA, A. P. B. et al. Assessing arsenic, cadmium, and lead contents in major crops in Brazil for food safety purposes. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 37, n. February, p. 143–150, 2015.

COSGROVE, D. J. The isolation of myoinositol pentaphosphates from hydrolysates of phytic acid. *Biochemical Journal*, v. 89, n. 1, p. 172-175, 1963.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. 5ª Edição. Baureri: Manole, 2016.

DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J. S. DE; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, v. 5, p. 156–163, 2018.

DOBROWOLSKI, R.; PAWLOWSKA-KAPUSTA, I.; DOBRZYNSKA, J. Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. *Food Chemistry*, v. 132, n. 1, p. 597–602, 2012.

EMBRAPA. Coleção Plantar : Batata. 1999.

EMBRAPA. Sistema de Produção da Batata. 2016. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=8803&p_r_p_-996514994_topicold=1301> Acesso em: 13 de Janeiro de 2022.

EPA, METHOD 7010 - GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, EPA - United States Environ. Prot. Agency. Revisão 0 (2007) 1–24.

ERDEMIR, U. S.; SAHAN, Y.; GUCER, S. ractionation and Bioaccessibility of Manganese, Copper, Zinc, Cadmium, and Lead in Commercial Vegetable and Rice Baby Foods Using Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS) with Central Composite Design (CCD). *Atomic Spectroscopy*, v. 52, n. 17, p. 2840 – 2851, 2019.

FAN, J.; ZIADI, N.; PARENT, L.E.; BÉLANGER, G. Cadmium accumulation in potato tubers produced in Quebec. *Canadian Journal of Soil science*, n. 2, p. 435 – 440, 2009.

FERNANDES, A. M.; SORATTO, R. P. Nutrição mineral, calagem e adubação da batateira. Botucatu, Itapetininga. FEPAF ABBA, p. 121, 2012.

FINLEY, J. W. Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. *The American Journal of clinical nutrition*, v. 70, n. 1, p. 37 – 43, 1999.

FIOROTO, A. M. et al. Analytical Capabilities of the Community Bureau of Reference Protocol to Estimate the Mobility of Nutrients and Toxic Elements from Mineral Fertilizer. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 25, p. 6255 – 6261, 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) - Codex Alimentarius Commission: WORKING DOCUMENT FOR INFORMATION AND USE IN DISCUSSIONS RELATED TO CONTAMINANTS AND TOXINS IN THE GSCTFF - CF/12 INF/1, 2018. Disponível em: <[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-7 35-12%252FWD%252Fcf12_INF01x.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-7%252F35-12%252FWD%252Fcf12_INF01x.pdf)> Acesso em: 13 de Janeiro de 2022.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) - Food and Agriculture data, 2022. disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> > Acesso em: 17 de Janeiro de 2022.

Food and Drugs Administration. Lead in Food, Foodwares, and Dietary Supplements. 2023. Disponível em <https://www.fda.gov/food/environmental-contaminants-food/lead-food-foodwares-and-dietary-supplements> Acesso em: 15 de Julho de 2023.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. Cultivo de células: da teoria à bancada. s.ed. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 30, n. 5, p. 390 – 397, 2008.

HAJAR, E. W. I.; SULAIMAN, A. Z. BIN; SAKINAH, A. M. M. Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of Stevia Rebaudiana Plant. Procedia Environmental Sciences, v. 20, p. 386–393, 2014.

HAMAMO, H.; LANDSBERGER, S.; HARBOTTLE, G.; PANNO, S. Studies of Radioactivity and Heavy metals in phosphate Fertilizer. Journal of Radioanalytical and nuclear Chemistry, v. 194, n. 2, p. 331–336, 1995.

HARIRI, E. et al. Carcinogenic and neurotoxic risks of acrylamide and heavy metals from potato and corn chips consumed by the Lebanese population. Journal of Food Composition and Analysis, v. 42, n. September, p. 91–97, 2015.

HE Y.; ZHENG, Y. Assessment of in vivo bioaccessibility of arsenic in dietary Rice by a mass balance approach. Science Total Environment, v. 408, p. 1430-1436, 2010.

HUR, S.J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; McClements, D. J. In vitro human digestion models for food applications. Food Chemistry, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia - São Paulo:

Instituto Adolfo Lutz, 2008.

HUSGAFVEL, R.; KARJALAINEN, E.; LINKOSALMI, L. DAHL, O. Recycling industrial residue streams into a potential new symbiosis product – The case of soil amelioration granules. *Journal of Cleaner Production*, v. 135, n. November, p. 90 – 96, 2016.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Lead [7439-92-1] and Lead Compound, Inorganic. *IARC Monographs*, v. 23, n. 7, 1987.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenesis Risks in Human*, v. 58, p. 41–117, 1993.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenesis Risks in Human* v. 84, p. 1-477, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado>> Acesso em: 08 de Junho de 2023.

INMETRO - Coordenação Geral de Acreditação. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008, 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf> Acesso em 22 de Dezembro de 2020.

IRISOV, D. S.; MUSIN, R. K.; ZAKHAROV, Y. A. Interference-free determination of arsenic in urine by atomic absorption using two-stage probe atomization in a graphite furnace. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 178, n. April, p. 106146, 2021.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. *Mutation research*, v. 410, n. 2, p. 123–140, 1998.

JU, D.; MU, T. HUA; SUN, H. NAN. Sweet potato and potato residual flours as potential nutritional and healthy food material. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 16, n. 11, p. 2632–2645, 2017.

JUCOSKI, G. DE O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A. DE. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 4, p. 720–728, 2016.

JUNEJO, S. A. et al. Pea cell wall integrity controls the starch and protein digestion properties in the INFOGEST in vitro simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 182, n. July, p. 1200–1207, 2021.

KHAN, M. N.; MOBIN, M.; ABBAS, Z. K.; ARABIA, S. Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 2018.

KHAN, Z. I.; AHMAD, K.; YASMEEN, S.; et al. Potential health risk assessment of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown on metal contaminated soils in the central zone of Punjab, Pakistan. *Chemosphere*, v. 166, n. January, p. 157–162, 2017.

KOOKANA, R. S.; BOXALL, A. B. A.; REEVES, P. T.; et al. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, n.19, p. 4227-4240, 2014.

KRAMER, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, n. 5, p. 517–534, 2010.

KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica, Parte 2: Atomização eletrotérmica em forno de grafite. *Ciência de Alimentos*, ESALQ/USP, 2007.

KULKARNI, S.D.; ACHARYA, R.; RAJURKAR, N.S.; REDDY, A.V.R. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. *Food Chemistry*, v. 103, n. 2, p. 681-688, 2007.

KUMPULAINEN, J.; PAAKKI, M.; TAHVONEN, R. Characterization of a potato reference material for major, minor and trace elements. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, v. 332, n. January, p. 685–688, 1988.

LANE, D. J. R.; RICHARDSON, D. R. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption! *Free Radical Biology and Medicine*, v. 75, n. October, p. 69 – 83, 2014.

LAPARRA, J.M.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; BARBERÁ, R.; FARRPE, R., Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 20, p. 6080-6085, 2003.

LEITE, A. J. B. Emprego de modificadores químicos permanentes para a determinação de cádmio e chumbo em amostras de água. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2010.

MANSOUR, S. A.; BELAL, M. H.; ABOU-ARAB, A. A. K.; ASHOUR, H. M.; GAD, M. F. Evaluation of some pollutant levels in conventionally and organically farmed potato tubers and their risks to human health. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 615–624, 2009.

MENEZES, I. M. N. et al. Simple and Robust GFAAS Methods for Determination of As, Cd, and Pb in Hemp Products Using Different Sample Preparation Strategies. *Food Analytical Methods*, v. 14, n. 5, p. 1043–1053, 2021.

MERLINO, L. C. S. Disponibilidade de bário para plantas de sorgo cultivadas em solo contaminado com o elemento. Tese, Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Jaboticabal, 2013.

MESQUITA, H. A. DE; PÁDUA, J. G. DE; YURI, J. E.; ARAÚJO, T. H. DE. Fertilização da cultura de batata. *Informa Agropecuário*, v. 33, n. 270, p. 52–61, 2012.

MICHON, J. et al. Optimization of a GFAAS method for determination of total inorganic arsenic in drinking water. *Talanta*, v. 71, n. 1, p. 479–485, 2007.

MILANI, R.F. Teor total, bioacessibilidade e biodisponibilidade de elementos-traço em bebidas não alcoólicas. Tese, Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

MILANI, R.F.; SANCHES, V. L. MORGANO, M. A.; CADORE, S. Trace elements in ready-to-drink ice tea: Total content, in vitro bioaccessibility and risk assessment. *Food Research International*, v. 137, n. November, p. 109732, 2020.

MILINOVIĆ, J.; LUKIĆ, V.; NIKOLIĆ-MANDIĆ, S.; STOJANOVIĆ, D. Concentrations of heavy metals in NPK fertilizers imported in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine (Belgrade)*, v. 23, p. 195–200, 2008.

MINAMISAWA, H. et al. Preconcentration and Determination of Cadmium by GFAAS after Solid-Phase Extraction with Synthetic Zeolite. *Analytical Sciences*, v. 22, n. 5, p. 709 – 713, 2006.

MOREDA-PIÑEIRO, J. et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trends in Analytical chemistry*, v. 30, p. 324 – 345, 2011.

MORRIS, A.L.; MOHIUDDIN, S.S. *Biochemistry, Nutrientes*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2021. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554545/>>. Acesso em 23 de Março de 2023

MULEYA, M. et al. Selenium speciation and bioaccessibility in Se-fertilised crops of dietary importance in Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 98, n. May, p. 103841, 2021.

MULLIN, W. J.; SMITH, J. M. Dietary Fiber in Raw and Cooked Potatoes. *Journal of food composition and analysis*, v. 4, p. 100–106, 1991.

NAIR, K. M.; AUGUSTINE, L.F. Food synergies for improving bioavailability of micronutrients from plant foods. *Food Chemistry*, v. 238, p. 180-185, 2018.

NARVÁEZ-CUENCA, C.E.; PEÑA, C.; RESTREPO-SÁNCHEZ, L.P.; KUSHALAPPA, A.; MOSQUERA, T. Macronutrient contents of potato genotype collections in the *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 66, p. 179–184, 2018.

NASCIMENTO, P. A.; SCHULTZ, J.; GONZALEZ, M. H.; OLIVEIRA, A. Simple GFAAS Method for Determination of Pb, As, and Cd in Cannabidiol Extracts Used for Therapeutic Purposes. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 5, p. 894–903, 2020.

NUNES, J. L. S. Nutrientes. Agrolink. Disponível em <https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_361443.html>. Acessado em janeiro de 2019.

OLIVEIRA, S. S. et al. Determination of essential and potentially toxic elements and their estimation of bioaccessibility in honeys. *Microchemical Journal*, v. 151, n. December, p. 104221, 2019

Organização Mundial da Saúde (OMS). Barium and Barium compounds. 2001. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42398/9241530332.pdf;jsessionid=FAA527DF524BC45877E01F2347D0F55D?sequence=1>> Acesso em 26 de Julho de 2020

Organização Mundial da Saúde (OMS). Potassium intake for adults and children, 2012. Disponível em: <https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/potassium_intake_printversion.pdf> Acesso em 23 de Novembro de 2021.

OZTURK, E.; ATSAN, E.; POLAT, T.; KARA, K. Variation in heavy metal concentrations of potato (*Solanum tuberosum* L .) cultivars. *The journal of Animal & Plant Sciences*, v. 21, n. 2, p. 235–239, 2011.

PADMANABHAN, P.; SULLIVAN, J. A.; PALIYATH, G. Potatoes and Related Crops. *Encyclopedia of Food and Health*, p. 446–451, 2016.

PALMER, C. M.; GUERINOT, M. LOU. Facing the challenges of Cu , Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 5, p. 333–340, 2009.

PATON, G.; NOILLY, M.; MOSSOYN, J. C. Conformational preferences and intramolecular interactions of myo-inositol hexakisphosphoric acid by ¹H e ³¹P NMR studies. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 12, n. 5, p. 401-407, 1999.

PERSSON, H. et al. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 8, p. 3194-3200, 1998.

PEIXOTO, R. R. A. Elementos Metálicos em achocolatados: teores totais e frações bioacessíveis e biodisponíveis. Tese (Doutorado) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PEIXOTO, R. R. A. et al. Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 48, n. May, p. 41–47, 2016.

PEIXOTO, R. A.; MAZON, E. A.; CADORE, S. Estimation of the Bioaccessibility of Metallic Elements in Chocolate Drink Powder using an in vitro Digestion Method and Spectrometric Techniques. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 5, p. 884 – 890, 2013.

PENG, Y.; YANG, R.; JIN, T.; CHEN, J.; ZHANG, J. Risk assessment for potentially toxic metal(loid)s in potatoes in the indigenous zinc smelting area of northwestern Guizhou Province, China. *Food and Chemical Toxicology*, v. 120, n. October, p. 328–339, 2018.

PERAMAKI, P.; PESONEN, M.; PIISPANEN, J. Development of a microwave sample preparation method for the determination of arsenic in humus and moss samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analisis*. v. 28, n. 9, p. 830 – 834, 2000.

PERELLÓ, G.; MARTÍ-CID, R.; LLOBET, J. M.; DOMINGO, J. L. Effects of Various Cooking Processes on the Concentrations of Arsenic, Cadmium , Mercury , and Lead in Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 56, p. 11262–11269, 2008.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. eds., *Food Science*. Springer, New York, 1998.

PRESS, B. DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Current Drug Metabolism*, v. 9, n. 9, p. 893 – 900, 2008.

QUINÁIA, S.P.; NÓBREGA, J.A. Determinação direta de cromo em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. *Química Nova*, v. 23, n.2, p. 185 – 190, 2000.

RASCHEN, M. R. et al. Determinação do teor de umidade em grãos empregando radiação micro-ondas. *Ciência Rural*, v. 44, n. 5, p. 925–930, 2014.

RAVEN, K.P.; LOEPPERT, R.H. Heavy metals in the environment: heavy metal composition of fertilizers and soil amendments. *Journal of Environmental Quality*, v. 26, p. 551–557, 1997.

- RIVERO, R. C.; HERNÁNDEZ, P. S.; RODRÍGUEZ, E. M. R.; MARTÍN, J. D.; ROMERO, C. D. Mineral concentrations in cultivars of potatoes. *Food Chemistry*, v. 83, n. 2, p. 247–253, 2003.
- RODELLA, A. A. Legislação sobre teores de contaminantes em fertilizantes – Estudo de um caso. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 29, n. 5, p. 797 – 801, 2005.
- ROSSI, F. et al. Cultivares de batata para sistemas orgânicos de produção. *Horticultura Brasileira*, v. 29, n. 3, p. 372–376, 2011.
- SANDBERG, A. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition*, v. 88, n. 3, p. 281 – 285, 2002.
- SANDBERG, A.S., CARLSSON, N.G., SVANBERG, U. Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*, Chicago, v.54, n.1, p.159-161, 1989.
- SANDERSON, D.; VOUTCHKOV, M.; BENKEBLIA, N. Bioaccumulation of cadmium in potato tuber grown on naturally high levels cadmium soils in Jamaica. *Science of the Total Environment*, v. 649, n.1, p. 909–915, 2019.
- SANTOS, A. M. P.; LIMA, J. S.; SANTOS, I. F.; et al. Mineral and centesimal composition evaluation of conventional and organic cultivars sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) using chemometric tools. *Food Chemistry*, v. 273, n. February, p. 166–171, 2019.
- SANTOS, I. et al. Prevalência e fatores associados à ocorrência de anemia entre menores de seis anos de idade em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 403-415, 2004.
- SANTOS, J. S.; DOS SANTOS, M. L.; CONTI, M. Comparative Study of Metal Contents in Brazilian Coffees Cultivated by Conventional and Organic Agriculture Applying Principal Component Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 8, p. 1468 – 1476, 2010.
- SAVIO, M. et al. Multielemental analysis in vegetable edible oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chemistry*, v. 159, n. September, p. 433–438, 2014.
- SCHLEMMER, G.; RADZIUK, B. *Analytical Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Laboratory Guide*, 1st ed., Birkhäuser Basel, Überlingen, Germany, 1999. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7576>
- SHALTOUT, A. A.; SEOUDI, R.; EID, K. A. Developed Method for Spectroscopic Studies of Viscous Samples. *Analytical Letters*, v. 41, n. 17, p. 3034–3048, 2008.

SHARMA, R. K.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F. M. Heavy metal (Cu, Zn, Cd and Pb) contamination of vegetables in urban India: a case study in Varanasi. *Environmental Pollution*, v. 154, n. 2, p. 254 – 263, 2008.

SHANKER, A. K. Chromium: Environmental pollution, health effects and mode of action. *Encyclopedia of Environmental Health*, v. 1, n. August, p. 624–633, 2019.

SHARP, P. Methods and Options for Estimating Iron and Zinc Bioavailability Using Caco-2 Cell Models: Benefits and Limitations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 75, n. 6, p. 413 – 421, 2005.

Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), 2020. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 08 de Junho de 2020

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*. 6ª Edição, Bookman, 2009.

SUBRAMANIAN, N. K.; WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R.; RAMSAY, G. The three-dimensional distribution of minerals in potato tubers. *Annals of Botany*, v. 107, n. 4, p. 681–691, 2011.

SURDYK, N.; CARY, L.; BLAGOJEVIC, S.; et al. Impact of irrigation with treated low quality water on the heavy metal contents of a soil-crop system in Serbia. *Agricultural Water Management*, v. 98, n. 3, p. 451–457, 2010.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Solubility and bioaccessibility of Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Sr and Zn in slim coffee infusions by in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 9, p. 1781–1789, 2015.

THE EUROPEAN COMMUNITIES. implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, COMMISSION DECISION of 12 August 2002.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4ª edição revisada e ampliada. Campinas, 2011. Disponível em: < http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf > Acessado em : 15 Julho 2021.

TADESSE, B.; ATLABACHEW, M.; MEKONNEN, K. N. Concentration levels of selected essential and toxic metals in potato (*Solanum tuberosum* L.) of West Gojjam, Amhara Region, Ethiopia. *Springer Plus*, v. 4, p. 507–514, 2015.

TAMASI, G.; CAMBI, M.; GAGGELLI, N.; et al. The content of selected minerals and vitamin C for potatoes (*Solanum tuberosum* L.) from the high Tiber Valley area, southeast Tuscany. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 41, n. August, p. 157–164, 2015.

THOMAS, E. Y.; OMUETI, J. A. .; OGUNDAYOMI, O. The Effect of Phosphate Fertilizer on Heavy Metal in Soils and *Amaranthus Caudatus*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, v. 3, n. 4, p. 145–149, 2012.

THOMPSON, I. Reduction of Phytic Acid Concentration in Protein Isolates by Acylation Techniques. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 64, n.12, p. 1712 – 1717, 1987.

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of Detection in Spectroscopy. *Spectroscopy*, v. 18, p. 112 – 114, 2003.

TOGNON, A. L. *Quantificação e Avaliação da Bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais*. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2012.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA)- Food Data Central, Potatoes, flesh and skin, raw, 2018. Disponível em:<<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170026/nutrients>> Acesso em 10 de Julho de 2020.

VÁZQUEZ, M.; CALATAYUD, M.; JADÁN PIEDRA, C.; CHIOCCHETTI, G.M., VÉLEZ, D.; DEVESA, V. Toxic trace elements at gastrointestinal level. *Food and Chemical Toxicology*, v. 86, n. December, p. 163 – 175, 2015.

VERHOECKX, K. et al. *The impact of food bio-actives on gut health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Nova Iorque, 2015.

VIRGILIO, A.; AMAIS, R.S.; SCHIAVO, D.; GOMES, J.A.; NÓBREGA, N.; NÓBREGA, J.A. Elemental Analysis of Phytotherapeutic Products by Inductively Coupled Plasma – Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, v. 50, n. 5, p. 842 - 852, 2017.

VOLZHENIN, A. V. et al. Two-stage probe atomization GFAAS for direct determination of trace Cd and Pb in whole bovine blood. *Microchemical Journal*, v. 141, n. September, p. 210–214, 2018.

WANG, S.; NIE, S.; ZHU, F. Chemical constituents and health effects of sweet potato. *Food Research International*, v. 89 part 1, n. November, p. 90–116, 2016.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, v. 182, n. 1, p. 49–84, 2009.

WELZ, B.; SCHELEMMER, G.; MUDAKAVIT, J.R. Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. Part 2. Determination of arsenic, cadmium, copper, manganese, lead, antimony, selenium and thallium in water. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. v. 3, n. 5, p. 695 – 701, 1988.

WELZ, B.; SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3ª Edição, Alemanha. Editora WILEY-VCII, 1999.

WSZELAKI, A. L.; DELWICHE, J. F.; WALKER, S. D.; et al. Sensory quality and mineral and glycoalkaloid concentrations in organically and conventionally grown redskin potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 5, p. 720–726, 2005.

XIAOBING, W.; WUXING, L.; ZHEN, L.; et al. Effects of Long-Term Fertilizer Applications on Peanut Yield and Quality and on Plant and Soil Heavy Metal Accumulation. *Pedosphere*, v. 30, n. 4, p. 555 – 562, 2017.

YBARRA, L.M.; COSTA, N.M.B.; FERREIRA, C.L.L.F. Interação cálcio e ferro: uma revisão. *Nutrire Revista Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, v. 22, n. Dezembro, p. 85 – 107, 2001.

ANEXO 1 – Tabelas e gráficos referentes ao texto

Tabela A1 Preparo de soluções estoque dos fluidos digestivos oral (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) para um volume final de 400 mL (1,25x*) para realização do ensaio de bioacessibilidade P 1IN.

	Concentração da solução estoque (SE)			Oral - SSF			Gástrica – SGF			Intestinal - SIF		
	mol L ⁻¹	mL adicionado da SE	Concentração final em SSF mmol L ⁻¹	mL adicionado da SE	Concentração final em SSF mmol L ⁻¹	mL adicionado da SE	Concentração final em SSF mmol L ⁻¹	mL adicionado da SE	Concentração final em SSF mmol L ⁻¹			
KCl	0,5	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,9	6,8	6,8			
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8			
NaHCO ₃	1	6,8	13,6	12,5	25	42,5	25	42,5	85			
NaCl	2	-	-	11,8	47,2	9,6	47,2	9,6	38,4			
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,5	0,5	0,4	0,12	1,1	0,12	1,1	0,33			
NaHCO ₃	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	0	0,5	0	-			
HCl	6	0,09	1,1	1,3	15,6	0,7	15,6	0,7	8,4			
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ **	0,3	0,025	1,5	0,005	0,15	0,04	0,15	0,04	0,6			

Todos os volumes são calculados para 400 mL de uma solução de armazenamento concentrada 1,25x; pouco antes do uso, eles são misturados com as quantidades necessárias de enzima e finalmente diluídos para uma solução de trabalho de concentração de 1x (ou seja, 4 partes de solução de eletrólito + 1 parte consistindo de enzimas e água resultam em uma concentração de 1x dos fluidos de digestão).

** CaCl₂ (H₂O)₂ deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

Figura A1 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Ca em diferentes amostras de batata por ICP OES.

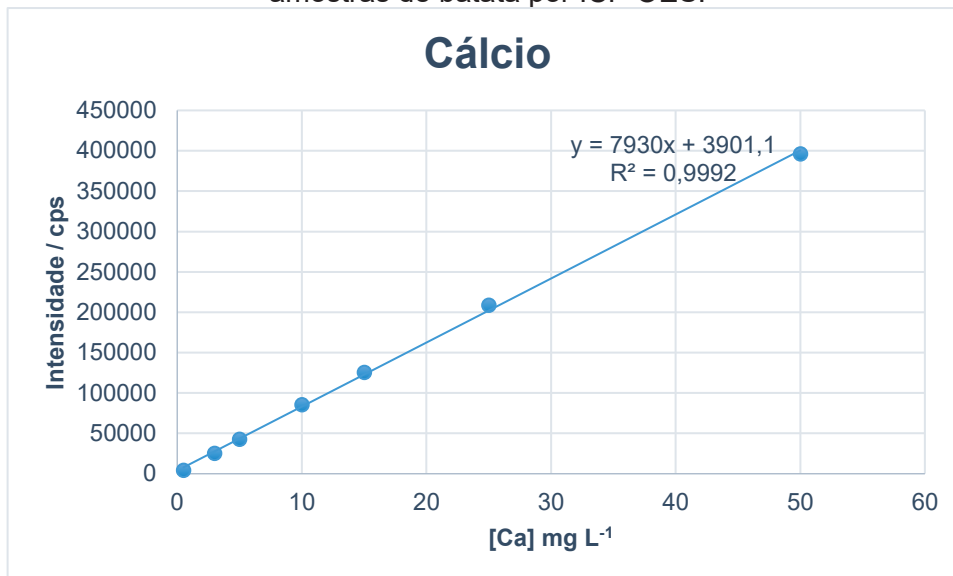


Figura A2 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Mg em diferentes amostras de batata por ICP OES.

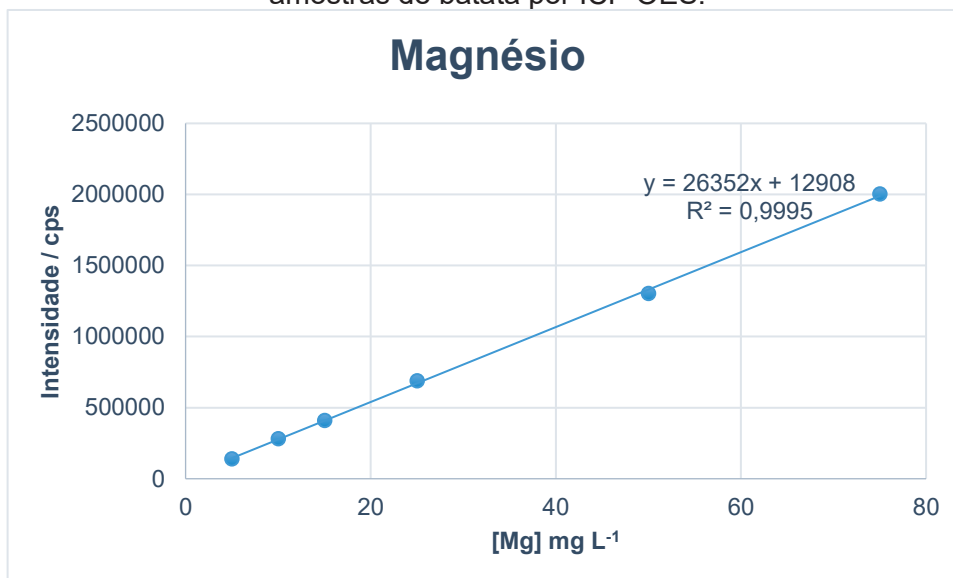


Figura A3 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de P em diferentes amostras de batata por ICP OES.

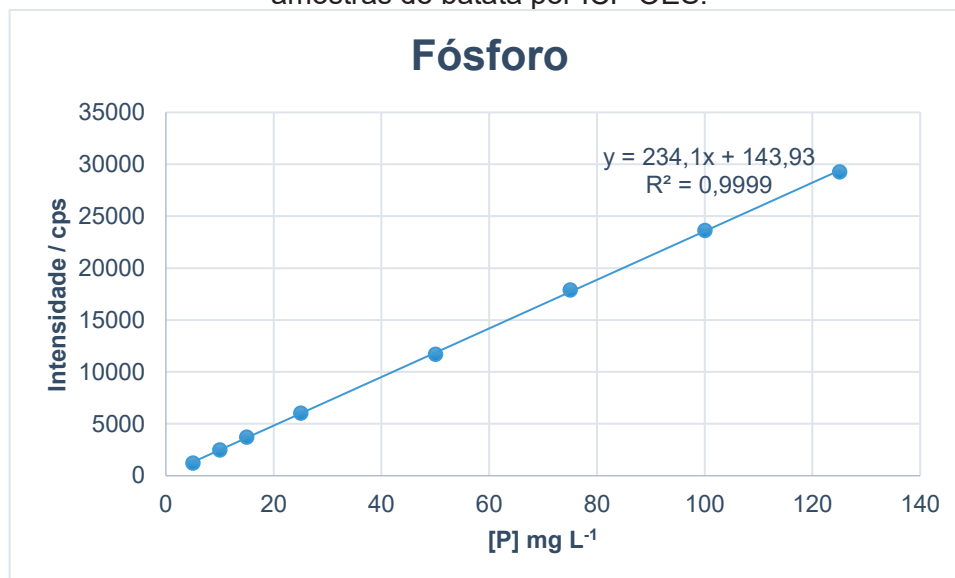


Figura A4 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de K em diferentes amostras de batata por ICP OES.

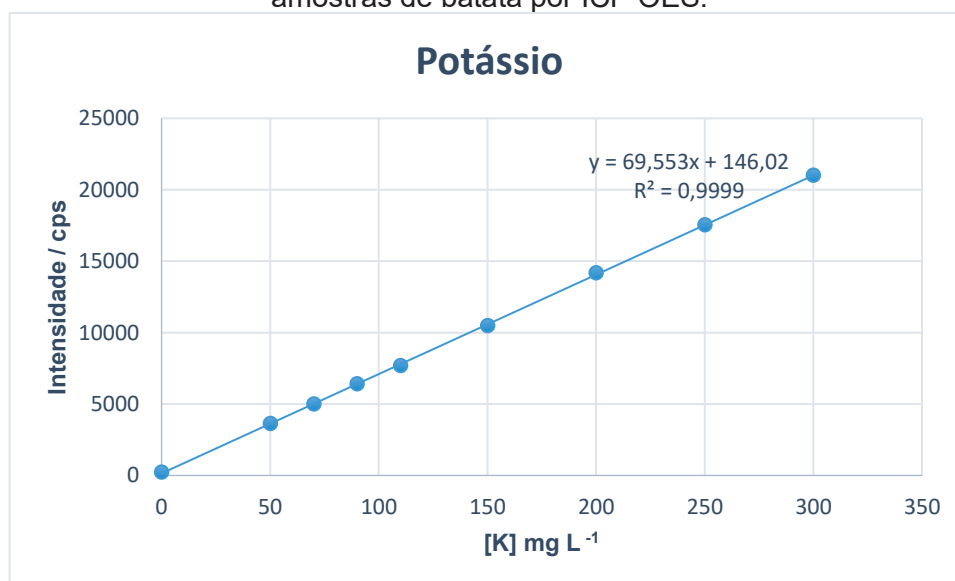


Figura A5 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Cu em diferentes amostras de batata por ICP OES.

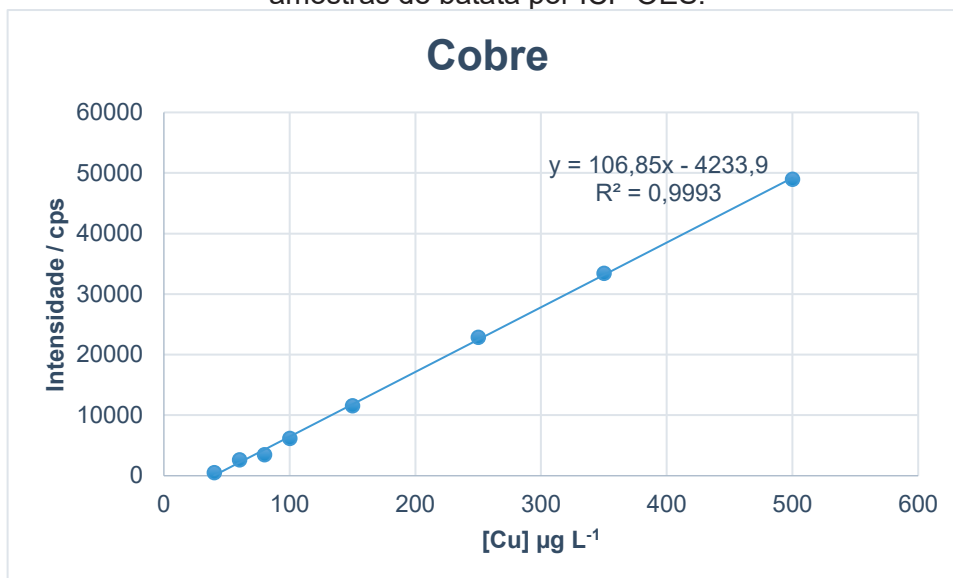


Figura A6 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Mn em diferentes amostras de batata por ICP OES.

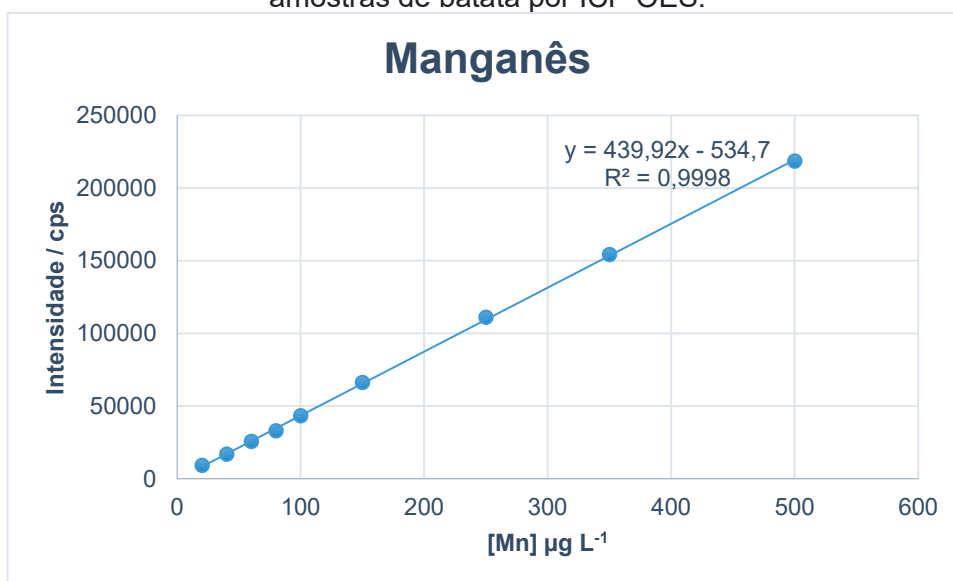


Figura A7 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Zn em diferentes amostras de batata por ICP OES.

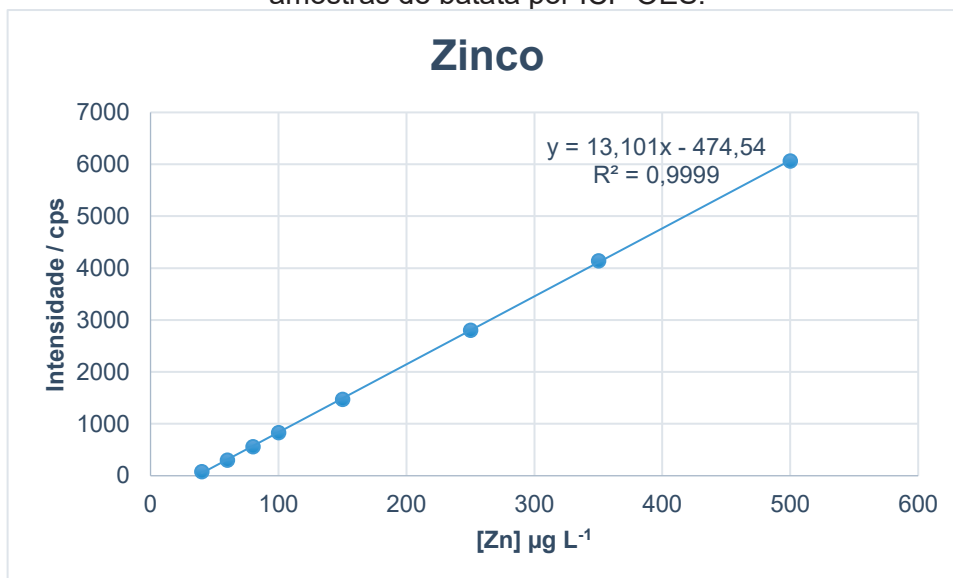


Figura A8 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Ba em diferentes amostras de batata por ICP OES.

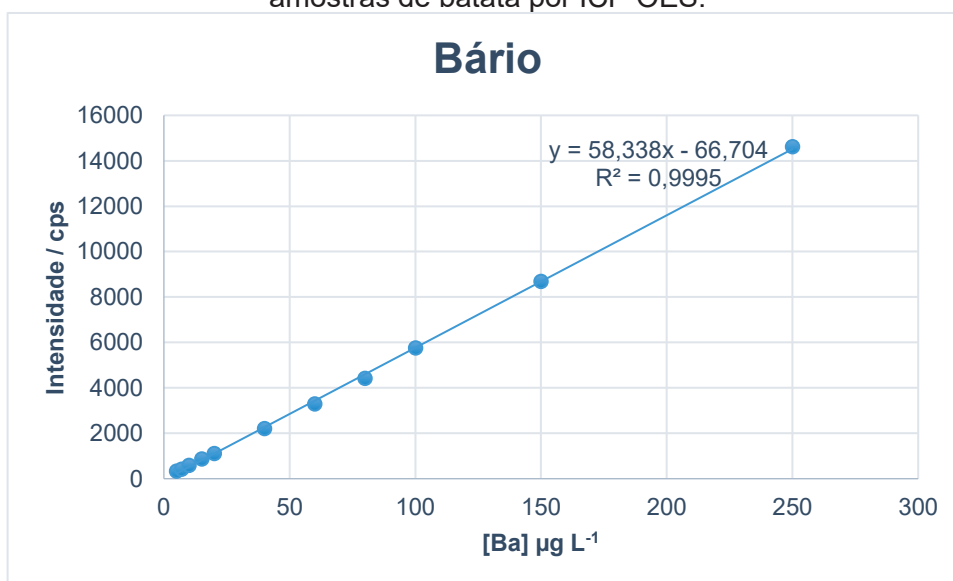


Figura A9 Curva de calibração analítica utilizada para quantificação de Fe em diferentes amostras de batata por ICP OES.

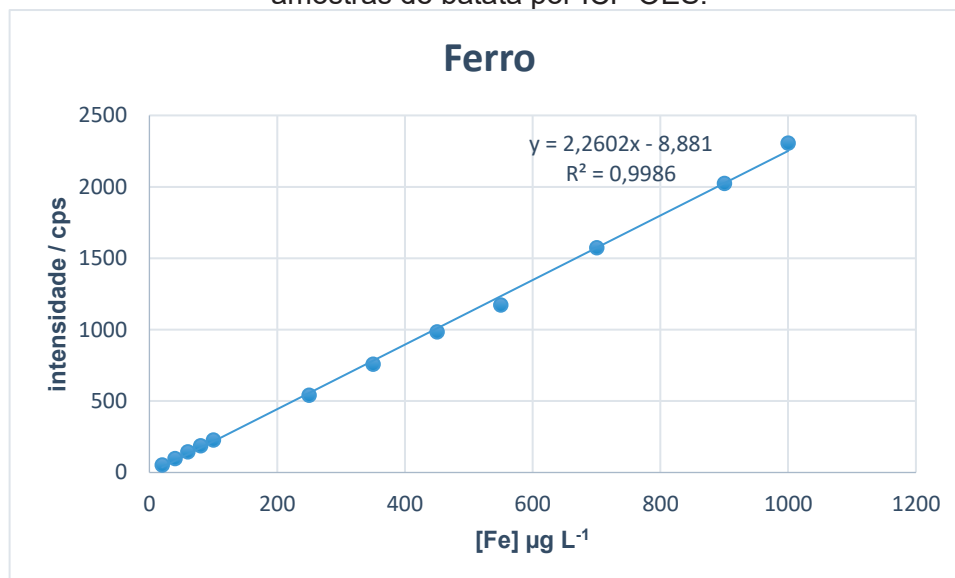


Tabela A2 Matriz referente ao planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central utilizado para a otimização de parâmetros instrumentais da técnica GFAAS para quantificação de As em amostras de diferentes cultivares de batata.

T_p	T_a	[Pd(NO₂)₃]	Tempo de T_p	SBR
1200	2000	2,5	2,0	-0,796
850	2200	5,0	3,0	-0,953
1200	2000	7,0	4,0	-0,972
500	2000	2,5	2,0	-0,917
1200	2000	7,0	2,0	-0,942
500	2000	7,0	4,0	-0,971
500	2400	7,0	4,0	-0,941
1200	2400	2,5	4,0	-0,912
1200	2000	2,5	4,0	-0,800
1200	2400	7,0	2,0	-0,959
500	2400	7,0	2,0	-0,942
1200	2400	2,5	2,0	-0,846
500	2400	2,5	4,0	-0,938
850	2200	5,0	3,0	-0,943
500	2000	2,5	4,0	-0,929
500	2000	7,0	2,0	-0,951
500	2400	2,5	2,0	-0,920
1200	2400	7,0	4,0	-0,935