



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA

MARIA ISABEL ANDREKOWISK FIORAVANTI

**MINERAIS EM FÓRMULA INFANTIL E LEITE: ESTUDO DO TEOR TOTAL E
DA BIOACESSIBILIDADE**

CAMPINAS

2020

MARIA ISABEL ANDREKOWISK FIORAVANTI

**MINERAIS EM FÓRMULA INFANTIL E LEITE: ESTUDO DO TEOR TOTAL E
DA BIOACESSIBILIDADE**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti

Orientador: Dr. Marcelo Antônio Morgano

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano

CAMPINAS

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Código de Financiamento 001), da **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo, processo 2017/11334-8) e **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 303142/2017-0).

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

F517m Fioravanti, Maria Isabel Andrekowisk.

Minerais em fórmula infantil e leite: estudo do teor total e da bioacessibilidade.

Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2020.

128 f.

Orientador: Dr. Marcelo Antônio Morgano.

1. Alimento infantil. 2. Micronutrientes. 3. Extração por ultrassom. 4. Digestão in vitro. 5. Fração bioacessível. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Fioravanti, Maria Isabel Andrekowisk. III. Título.

Título em inglês: Mineral content in infant formula and milk: Total content and a bioaccessibility study.

Key-words: Infant food; micronutrients; ultrasound extraction; in vitro digestion; bioaccessible fraction.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dr. Marcelo Antônio Morgano, Dra. Elisabete Segantini Saron, Dra. Raquel Fernanda Milani.

Data da Defesa: 04 de março de 2020

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti, aprovada pela Comissão Julgadora em 04/03/2020.

Prof. Dr. Marcelo Antonio Morgano
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Presidente)

Dra. Elisabete Segantini Saron,
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Raquel Fernanda Milani >
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Solange Cadore
Universidade Estadual de Campinas (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, e toda minha família pelo incentivo e suporte incondicional.

“(...) Por favor, concede-me a luz de tua sabedoria
Para dissipar a escuridão da minha mente
E curar o meu *continuum* mental (...)”
Prece Libertadora
Louvor a Buda Shakyamuni

AGRADECIMENTOS

A concretização deste projeto exigiu muita dedicação e esforço, sendo que muitos me auxiliaram nesta jornada e sou extremamente grata a todos eles. Visando reconhecer e demonstrar meus agradecimentos faço uma dedicatória:

Aos meus pais, Sílvia e Atílio, vida, incentivo, suporte incondicional e, como não mencionar, a aquisição das amostras de fórmulas infantis internacionais.

Ao Professor Dr. Marcelo Antônio Morgano, pela excelente orientação, confiança, paciência, além de exemplo de profissional e pesquisador.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL por garantir um programa de Pós-Graduação de excelência, dando a oportunidade de vivenciar aulas com professores que contribuíram muito durante esta etapa. Cada ensinamento foi muito valioso e me sinto orgulhosa por ter feito parte desta instituição.

A todos os funcionários e estagiários do CCQA, em especial a Adriana, que foi uma peça fundamental para a realização da minha pesquisa.

Aos colegas da pós-graduação, Elisa, Esther, Ana Paula, Mariana, por tornar agradável nossa convivência além das inúmeras discussões sobre diferentes temas de pesquisas.

À Dra. Elisabete e Dra. Raquel, integrantes da minha banca examinadora na qual contribuíram de maneira valiosa para esta dissertação.

Mais uma vez registro o meu agradecimento a Dra. Raquel, pelo seu apoio, carinho, atenção, paciência e colaboração em todas as etapas da execução deste trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz por permitir a realização deste projeto ao longo destes dois anos incentivando a abrangência de conhecimento de seus pesquisadores. Além dos colegas de trabalho do CLR – IAL de Campinas III, Elaine, Paulo, Laila e Gleize pelo grande apoio e imensa ajuda nas atividades.

E por fim, aos meus familiares e amigos, pelo grande apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A fórmula infantil (FI) é o principal substituto do leite materno para crianças de 0 a 12 meses e sua ingestão de forma inadequada e deficiente pode afetar o desenvolvimento e gerar consequências ao longo da vida. Conhecer o valor total e a fração bioacessível dos nutrientes, como os minerais, presente no alimento é importante, pois estudos demonstram que apenas uma fração dos nutrientes são potencialmente bioacessíveis. A quantificação dos minerais também é importante para que os fabricantes e autoridades garantam a qualidade e segurança das FI. O objetivo deste estudo foi avaliar e validar um método de extração assistida por ultrassom para a determinação simultânea dos teores totais de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em FI por ICP OES; estabelecer as condições analíticas do método *in vitro* de solubilidade e dialisabilidade; determinar e avaliar os resultados de FI nacionais e internacionais, e de leites de vaca pasteurizados, em pó e UHT. Como resultado, o método de extração por ultrassom mostrou ser um método alternativo, em acordo com os princípios da “Química Verde”, barato, rápido e simples, satisfatório para as figuras de mérito seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão e recuperação. Os testes para a determinação das frações solúvel e dialisada, permitiu uma etapa de *overnight* entre as etapas que simulam as digestões gástrica e intestinal, redução do volume de enzima pancreatina e sais biliares em relação ao volume normalmente utilizado em adultos, possibilitando a realização mais cautelosa da análise com sensibilidade, exatidão e precisão adequadas. Os resultados encontrados para as FI demonstraram que existe variação nas concentrações dos elementos entre as diferentes amostras estudadas, exceto para o Na. Ao comparar os resultados encontrados (mg ou µg /100kcal) com os valores sugeridos pelo *Codex alimentarius*, todos os elementos apresentaram valores dentro do estabelecido. Entre os leites de vaca e as FI foram encontradas diferenças significativas tanto para o valor total quanto para as frações bioacessíveis, reforçando a recomendação do uso de FI para crianças com menos de um ano.

Palavras-chave: Alimento infantil; micronutrientes; extração por ultrassom; digestão *in vitro*; fração bioacessível.

ABSTRACT

Infant formula (FI) is the main breast milk substitute for children aged 0 to 12 months and the inadequate and deficient intake can affect development and lead to life consequences. Knowing the total value and the bioaccessible fraction of nutrients, such as minerals, present in food is important because studies show that only a fraction of nutrients are potentially bioaccessible. The quantification of minerals is also important for manufacturers and authorities to guarantee the quality and safety of FI. The aim of present study was to evaluate and validate an ultrasound assisted extraction method for the simultaneous determination of total levels of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn by ICP OES; to establish the analytical conditions of the in vitro solubility and dialysability methods; determine and evaluate the results of national and international FI, and pasteurized, powdered and UHT whole bovine milks. As a result, the ultrasound extraction method proved to be an alternative method, in agreement with the principles of “Green Chemistry”, inexpensive, rapid and simple, satisfactory in terms of selectivity, linearity, LOD, LOQ, trueness and precision. The tests for the determination of solubility and dialyzability allowed an overnight step between gastric and intestinal digestions, reduction of the volume of pancreatin enzyme and bile salts in relation to the volume normally used in adults, allowing a more careful analysis with sensitivity, accuracy and precision. The results found for FI showed that there is variation in elements concentrations between the different samples studied, except for Na. When comparing the results found (mg or μg / 100kcal) with the values suggested by Codex alimentarius, all elements presented values within the established and between milk and the IF, significant differences were found for both the total value and for the fractions bioaccessible, reinforcing the recommendation to use IF for children under 1 year.

Keywords: Infant Food; micronutrients; ultrasound extraction; in vitro digestion; bioaccessible fraction.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
Objetivos Específicos:	4
CAPÍTULO 1	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Fórmula infantil e leite como substituto do leite materno.....	6
2. Minerais e sua importância na fortificação de fórmula infantil	15
3. Técnicas de análise para determinação de minerais	24
4. Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)	28
5. Bioacessibilidade de minerais em fórmula infantil.....	30
6. Referências bibliográficas	43
CAPÍTULO 2	57
Simple and Fast Ultrasound-Assisted Method for Mineral Content and Bioaccessibility Study in Infant Formula by ICP OES.....	57
Abstract	58
1. Introduction	59
2. Materials and methods.....	60
2.1. Reagents, solutions and samples	60
2.2. Instrumentation	61
2.3. Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn determination.....	62
2.4. In Vitro Digestion and Method evaluation	63
3. Statistical analyses	64
4. Results and Discussion.....	64
4.1. Method evaluation and validation for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn contents in IF	64
4.2. In vitro digestion method evaluation for mineral bioaccessibility in infant formulas	69

4.3. In vitro digestion method validation for mineral bioaccessibility in infant formulas	70
4.4. Method application in real Sample	72
5. Conclusions	75
6. References	76
CAPÍTULO 3	80
Influência dos diversos ingredientes na bioacessibilidade de minerais em fórmulas infantis e leites	80
Resumo	81
1. Introdução	82
2. Material e métodos	83
2.1. Equipamentos	83
2.2. Reagentes e soluções	84
2.3. Amostras	85
2.4. Determinação do teor total de minerais	85
2.5. Determinação do teor bioacessível	88
2.6. Análise estatística	89
3. Resultados	90
4. Discussão	99
5. Conclusão	106
6. Referências bibliográficas	107
CONCLUSÃO GERAL	112
ANEXO	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Nível de Ingestão, do inglês <i>Adequate Intake</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Comunidades Analíticas, do inglês <i>The Association of Analytical Communities</i> .
ATPase	Enzimas Adenosinatrifosfatases
BSSL	Lipase Estimulada por Sais Biliares
Célula Caco-2	Linha contínua de células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano heterogêneo.
Codex	<i>Codex Alimentarius</i>
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês <i>Certified Reference Materials</i>
Da	Unidade de Medida de Massa (Dalton)
DHA	Ácido-Docosa-Hexaenóico
EAR	Necessidade Média Estimada, do inglês <i>Estimated Average Requirement</i>
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FI	Fórmula Infantil
GOS	Galactooligossacarídeos
GUL	Limites Superiores de Referência, do inglês <i>Guidance Upper Levels</i>
HGL	Lipase Gástrica Humana

ICP OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma com Acoplamento Indutivo, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IF	Fórmula Infantil, do inglês <i>Infant Formula</i>
INFOGEST	Rede internacional para comparar e harmonizar modelos digestão
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LCPUFAs	Ácidos Graxos Polinsaturados de Cadeia Longa
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LSR	Limites Superiores de Referência
MS	Ministério da Saúde do Brasil
MWCO	Membrana de diálise de peso molecular de corte definido, do inglês <i>Molecular Weight Cut Off</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P+B	Solução de pancreatina mais sais biliares
PTFE	Politetrafluoretileno
PTL	Lipase de Triglicerídeos Pancreático
PTLRP2	Proteína Lipase de Triglicerídeos Pancreático - Relacionada a Proteína 2
RDA	Ingestão Dietética Recomendada, do inglês <i>Recommended Dietary Allowances</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rec (%)	Recuperação em Porcentagem
rhLf	Lactoferrina Humana Recombinante
TIM	Modelo Gastrointestinal Dinâmico
UHT	Temperatura Ultra Alta, do inglês <i>Ultra High Temperature</i> .
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

INTRODUÇÃO

Um dos principais substituintes do leite materno na alimentação de lactentes e crianças de primeira infância é a fórmula infantil (FI) que é definida como produtos à base de leite de vaca ou outros animais ou uma mistura destes e/ou outros ingredientes provadamente adequados para alimentação de lactentes até e/ou a partir do sexto mês de vida e para alimentação de crianças de primeira infância (BRASIL, 2011a). A RDC 44 (BRASIL, 2011b) estabelece os requisitos mínimos de identidade, composição e segurança que devem obedecer às FI comercializadas no Brasil.

O consumo de minerais durante a primeira infância é um fator crítico devido à alta taxa de crescimento das crianças e sua deficiência pode afetar o desenvolvimento e gerar consequências ao longo de sua vida (Vieira da Silva *et al.*, 2013). A determinação do teor total dos nutrientes presentes em fórmula infantil é fundamental para garantir a qualidade do produto segundo as legislações nacionais (BRASIL, 2011a) e sua determinação em alimentos pode ser realizada por diferentes métodos analíticos. Para a determinação dos minerais em FI os métodos de digestão utilizando a radiação por micro-ondas e a digestão por via seca em forno tipo mufla têm sido os mais utilizados e, nos últimos anos, a extração assistida por ultrassom (sonicação) vem se destacado como um método eficiente, com redução significativa do tempo de análise e do consumo de reagentes (Machado, Bergmann & Pistón, 2016).

O conhecimento da concentração total de nutrientes no alimento não é suficiente para determinar se o alimento provê as necessidades nutricionais adequadas, sendo importante o conhecimento da fração disponível (bioacessibilidade) que pode ser efetivamente absorvida pelo corpo (Do Nascimento da Silva *et al.*, 2013). O estudo da bioacessibilidade *in vitro* de minerais em matriz vegetal realizado por De Lima *et al.* (2014) demonstrou que apenas uma fração da quantidade total de nutrientes é potencialmente bioacessível e os resultados obtidos para Cu, Fe e Zn indicaram que a porcentagem de absorção para estes nutrientes pode variar dependendo dos componentes da matriz.

Os métodos *in vitro* que simulam processos de digestão são amplamente utilizados para estudar o comportamento dos alimentos no trato gastrointestinal e a absorção de nutrientes, apresentando a vantagem de serem mais rápidos, menos dispendiosos, menos trabalhosos, sem restrições éticas, além de permitirem que um número relativamente grande de amostras seja medido em paralelo para fins de triagem (Minekus *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi desenvolvido um método simples e rápido para determinação dos teores totais de minerais em diferentes FI comerciais (nacionais e internacionais) e em leite de vaca (pasteurizado, em pó e UHT) por ICP OES; e posteriormente foi estudada a avaliação da bioacessibilidade (fração solúvel e dialisável) dos minerais.

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre FI e leite como substituto ao leite materno; as técnicas de análise para determinação de minerais e os estudos sobre bioacessibilidade de nutrientes. O Capítulo 2 traz o desenvolvimento do método para estudo dos minerais em FI e foi redigido em conformidade às normas da revista *Food Analytical Methods*. O Capítulo 3 descreve o estudo dos nutrientes minerais, teores totais e bioacessíveis, encontrados em FI e leites, em acordo com as normas da revista *International Dairy Journal*.

Referências bibliográficas

- BRASIL (2011a). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.
- BRASIL (2011b). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.
- De Lima A. C. S., Soares D. J., da Silva L. M. R., de Figueiredo R. W., de Sousa P. H. M., & de Abreu Menezes E. (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-

- intestinal digestion. *Food Chemistry*, 161, 142–147. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.123
- Do Nascimento da Silva, E., Leme, A. B. P., Cidade, M., & Cadore, S. (2013). Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. *Talanta*, 117, 184–188. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.008
- Machado, I., Bergmann, G., & Pistón, M. (2016). A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chemistry*, 194, 373–376. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.027
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., et al (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5:1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j
- Vieira da Silva, S., Mattanna, P., Bizzi C. A., Richards, N. S. P. S, & Barin, J. S. (2013). Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 96(6) 3498–3505. doi: 10.3168/jds.2012-6268.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um método simples e rápido para determinação dos teores totais de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), sódio (Na), fósforo (P) e zinco (Zn) em fórmulas infantis e leites de vaca utilizando a técnica de ICP OES e avaliar sua fração bioacessível.

Objetivos Específicos:

- Avaliar o desempenho de três métodos de preparo das amostras: digestão ácida assistida por micro-ondas; digestão por via seca em forno tipo mufla e extração assistida por ultrassom para a determinação de minerais em FI.
- Validar o método de preparo de amostra escolhido considerando tempo de análise, simplicidade e custo analítico para as figuras de mérito: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação.
- Determinar o teor total de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de fórmulas infantis (nacional e internacional) destinadas às faixas etárias de 0-6 meses (seis fórmulas infantis para lactentes), de 6-12 meses (oito fórmulas infantis de seguimento para lactentes) e de 0-12 meses (quatro fórmulas infantis para lactentes e de seguimento para lactente); e em leite integral disponível em mercados (três leites pasteurizados, três leites em pó e três leites UHT) de Campinas-SP.
- Comparar a quantidade bioacessível dos elementos nas fórmulas infantis de diferentes marcas, através do valor total e das frações solúveis e dialisáveis.
- Avaliar e comparar os teores dos minerais, totais e bioacessíveis, presentes em amostras de fórmulas infantis e de leites de vaca.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1. FÓRMULA INFANTIL E LEITE COMO SUBSTITUTO DO LEITE MATERNO.

Estudos científicos comprovam a importância e a superioridade do leite materno como a melhor fonte de nutrientes para lactentes a termo até seis meses, sendo fonte de compostos bioativos e nutrientes balanceados adequados para o crescimento e desenvolvimento da criança (BRASIL, 2009; Zou, Pande & Akoh, 2016). Além da vantagem nutricional, a amamentação é conveniente, barata e uma experiência de vínculo entre mãe e bebê compreendido em um contexto sociocultural e familiar (BRASIL, 2009; Martin, Ling & Blackburn, 2016).

A decisão de amamentar é altamente pessoal e muitas vezes influenciada por fatores sociais, econômicos, culturais, étnico-raciais, psicológicos e comportamentais (BRASIL, 2015). Em certas situações, a amamentação não é possível ou é inadequada. Quando a amamentação não é possível, desejável ou as mães são incapazes de fornecer leite suficiente, fontes alternativas balanceadas de nutrientes devem ser usadas. Atualmente a opção recomendada para crianças nascidas a termo saudável (recém-nascido cuja idade gestacional foi entre 37 semanas e 41 semanas e 6 dias) é a fórmula infantil, que desempenham um papel indispensável na nutrição infantil (Vieira da Silva *et al.*, 2013; Martin, Ling & Blackburn, 2016; Zou, Pande & Akoh, 2016).

Globalmente, apenas 38% das crianças são exclusivamente amamentadas até os 6 meses de idade. Nos Estados Unidos, 75% dos bebês iniciam a amamentação desde o nascimento; no entanto, aos três meses de idade, 67% dos lactantes dependem da fórmula infantil como uma parte de sua nutrição (Martin, Ling & Blackburn, 2016). Um estudo de âmbito nacional realizado em 2009, considerando as capitais brasileiras e o Distrito Federal, encontrou uma prevalência do aleitamento materno exclusivo de 41% em crianças menores de 6 meses com duração mediana da amamentação materna de 341,6 dias (11,2 meses). Os dados obtidos neste estudo demonstraram uma melhora significativa da situação do aleitamento materno no Brasil em comparação a estudos anteriores (BRASIL, 2009). Porém, o Brasil encontra-se distante do cumprimento das metas propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) de que a amamentação seja exclusiva nos primeiros 6 meses de vida e

complementada até 2 anos de idade ou mais, com a introdução de alimentos sólidos/semissólidos de qualidade (BRASIL, 2015).

Apesar dessas recomendações, em todo o mundo a grande maioria das crianças recebem fórmula infantil, ou outros alimentos complementares caseiros ou comerciais, em determinado momento dos primeiros meses de vida como substituto do leite materno, seja como única fonte de nutrição ou em combinação (Koletzko, Shamir & Ashwell, 2012). Um estudo realizado, entre 2012 a 2015, com 700 lactentes (idade mediana de 5,5 meses) na cidade de São Paulo sobre a introdução de alimentos complementares demonstrou que a água (80%), seguida pela fórmula infantil (64%) e pelo suco (51%) foram os alimentos mais utilizados e mais precocemente introduzidos aos lactentes (Moreira *et al.*, 2019). Portanto, os conceitos, padrões e práticas relacionados à qualidade e segurança dos produtos alimentícios voltados para lactentes são de grande importância para a saúde pública (Koletzko, Shamir & Ashwell, 2012), já que podem ser a única fonte de nutrição nos primeiros 6 meses de vida, um período crítico para o crescimento e desenvolvimento (Donovan, 2019).

Segundo o *Codex Alimentarius Standard for Infant Formula*, a fórmula infantil é um substituto do leite materno especialmente preparado para satisfazer, por si só, os requisitos nutricionais dos bebês durante os primeiros meses de vida até a introdução da alimentação complementar adequada. A segurança nutricional e a adequação das fórmulas para lactentes devem ser cientificamente demonstradas para apoiar o crescimento e o desenvolvimento de lactentes (FAO/WHO, 2016).

Os regulamentos técnicos de fórmulas para lactentes e produtos lácteos são delineados por padrões internacionais elaborados pela Comissão do *Codex* sob a autoridade da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e a Organização Mundial da Saúde ou em padrões específicos elaborados principalmente pela União Europeia, Estados Unidos, China, Austrália e Nova Zelândia (Poitevin, 2016). A composição da fórmula infantil é estritamente regulamentada e cada fabricante deve seguir as diretrizes estabelecidas pelas agências governamentais do país onde será comercializada. Estas diretivas estabelecem critérios para rotulagem e sua composição (valor energético, proteína, carboidrato, gordura, substâncias minerais, vitaminas e outros

ingredientes) incluindo, quando necessário, limites mínimos e máximos importantes para atender as necessidades nutricionais dos lactentes saudáveis e evitar um consumo excessivo que possa vir a produzir efeitos adversos (Vieira da Silva *et al.*, 2013).

No Brasil, as fórmulas infantis são regulamentadas pelas seguintes Resoluções: RDC nº 42, 43, 44, 45 e 46, de 19 de setembro de 2011, do Ministério da Saúde. A RDC nº 43 (Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes) e a RDC nº 44 (Regulamento Técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância) estabelecem que fórmulas infantis para lactentes sejam produtos à base de leite de vaca ou outros animais ou uma mistura destes e/ou outros ingredientes provadamente adequados para alimentação de lactentes até e/ou a partir do sexto mês de vida e para alimentação de crianças de primeira infância (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c; BRASIL, 2011d; BRASIL, 2011e).

O mercado deste produto é substancial em todo o mundo e vem ganhando popularidade devido ao aumento de mulheres no mercado de trabalho, além de ser impulsionado pelo crescente número de comércio, lojas físicas e plataformas eletrônicas, que disponibilizam facilmente o produto ao consumidor (Insights, 2019). Comercialmente as fórmulas infantis estão disponíveis em três formas: (1) pó, a forma mais barata, que deve ser misturada com água antes da alimentação; (2) líquido concentrado, que deve ser misturado com uma quantidade igual de água; e (3) pronto para consumo, à forma mais cara, que não requer mistura (FDA, 2014).

As fórmulas infantis disponíveis hoje são classificadas de acordo com a faixa etária do lactente e incluem, entre outras denominações: **“fórmulas infantis para lactentes”** para os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias), **“fórmulas infantis de seguimento para lactentes”** a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias), **“fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactente”** para os primeiros doze meses de idade incompletos (até 11 meses e 29 dias) e **“fórmulas infantis para crianças de primeira infância”** para crianças de 1 a 3 anos (European Commission, 2006; BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c). Para facilitar o entendimento das faixas etárias são adotadas as seguintes denominações

simplificadas: de 0-6 meses para fórmulas infantis para lactentes; de 6-12 meses para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e de 0-12 meses para fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactente.

Existe também a categoria de fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas, produtos que abrangem todas as faixas etárias e atendem as necessidades nutricionais decorrentes de alterações fisiológicas, de doenças temporárias ou permanentes e de risco de alergias (BRASIL, 2011d; Insights, 2019). A quantidade dos compostos (nutrientes) das diferentes faixas deve estar de acordo com o regulamento técnico específico, sendo que determinados compostos podem não ser aplicáveis a alguns tipos de fórmulas, principalmente em relação às fórmulas para necessidades dietoterápicas específicas (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011d).

Além das diferentes classificações por faixas etárias, comercialmente as fórmulas infantis são divididas quanto à base proteica: fórmula à base de leite de vaca, ou outros animais (ou uma mistura) e à base de soja (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c). Estas variam em relação à nutrição, calorias, digestão e custo. Em 2019, as fórmulas infantis à base de leite de vaca e de proteína de soja foram as mais comumente consumidas, sendo que à base de leite de vaca representou mais de 71% do mercado (Insights, 2019). A Figura 1 traz um diagrama simplificado da distribuição do mercado de fórmulas infantis.

Comercialmente, ao comparar as diferentes classificações por faixa etária, o consumo de fórmulas infantis destinada a 0-6 meses não são expressivas devido ao incentivo e benefícios do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês. Após o 6º mês, o uso de fórmulas infantis de seguimento (6-12 meses) atua como substituto do leite materno e, em 2018, representou mais de 40% da participação do mercado mundial de fórmula infantil. Os dados indicam que fórmula infantil para crianças de primeira infância (1-3 anos) será o seguimento que mais crescerá até 2025 devido a maior conscientização de seus benefícios a saúde da criança, além da mudança de estilo de vida e aumento da renda da população nas economias emergentes (Insights, 2019).

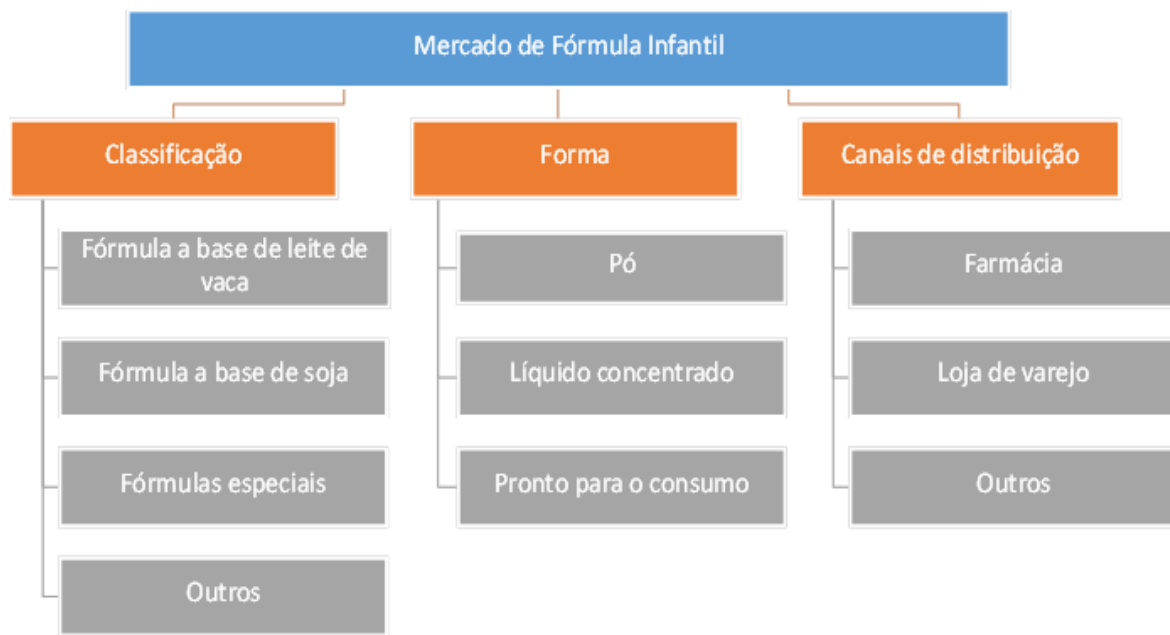


Figura 1. Classificação, forma e canais de distribuição das fórmulas infantis comerciais (fonte: Insights, 2019).

A primeira fórmula infantil comercial foi desenvolvida em 1867 e compreendia farinha de trigo, leite de vaca, malte e bicarbonato de potássio. No início do século XX, a composição da fórmula infantil em pó foi melhorada para torná-la mais semelhante ao leite materno, particularmente quanto seu conteúdo de lipídios, adicionando gorduras e óleos ao leite de vaca desnatado (Zou, Pande & Akoh, 2016). Atualmente, os substitutos alimentares para lactentes são desenvolvidos considerando como modelo a composição média do leite materno maduro (após o primeiro mês do nascimento) para atenderem às necessidades nutricionais da grande maioria dos bebês saudáveis a termo (Lönnerdal & Hernell, 2016).

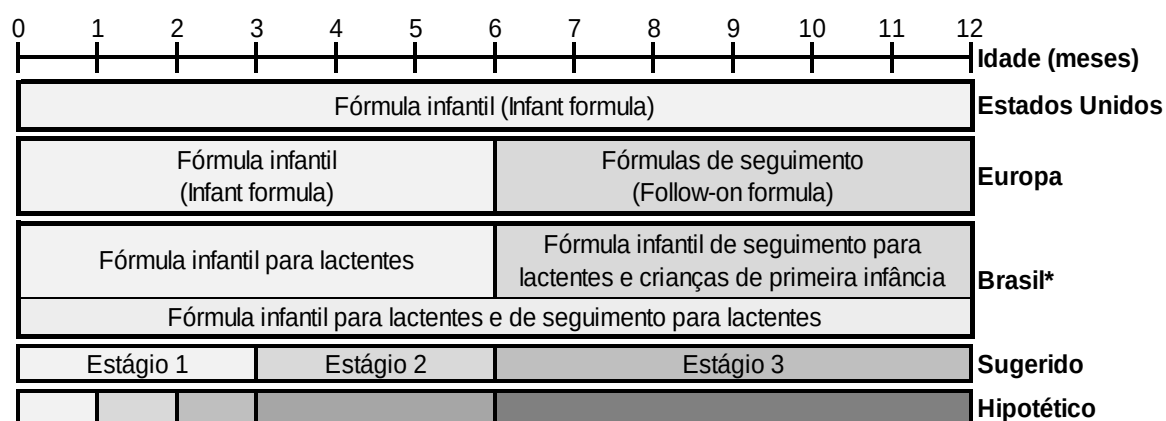
Nos últimos 30 anos, a composição da fórmula infantil vem evoluindo para se aproximar ao máximo do leite materno. No entanto, apesar dessas tentativas, persistem disparidades entre lactentes alimentados com leite materno e com fórmula quanto ao crescimento, desenvolvimento neurológico, composição do microbioma, função imune e incidência de doenças infecciosas. Se aceita que os componentes bioativos no leite materno sejam em parte responsáveis por essas diferenças de desenvolvimento (Donovan, 2019). A introdução precoce de fórmula (antes do sexto mês) também pode estar associada a um aumento de episódios de diarreia, hospitalizações por doença respiratória, diminuição na absorção de minerais como o ferro e o zinco, e pelo maior risco de desnutrição, associados

tanto pela diluição excessiva das fórmulas, levando a uma oferta inadequada de nutrientes, quanto à qualidade e higiene da água e utensílios utilizados no preparo da fórmula (BRASIL, 2015).

Parte da razão dessas diferenças também é atribuída à abordagem estática nas composições das fórmulas infantis disponíveis. O leite humano é uma matriz complexa com uma composição geral de 87% de água, 3,8% de gordura, 1,0% de proteína e 7% de lactose. No entanto, a composição do leite humano é dinâmica e muda ao longo do tempo, adaptando-se às novas necessidades da criança em crescimento (Martin, Ling & Blackburn, 2016). Essas mudanças naturais do leite humano, que refletem na alteração da velocidade de crescimento e maturação das funções imunológicas e fisiológicas da criança, não foram amplamente consideradas no desenvolvimento de fórmulas (Lönnerdal & Hernell, 2016; Martin, Ling & Blackburn, 2016). Portanto, compreender as diferentes necessidades nutricionais da criança pode ser a chave para o desenvolvimento de fórmulas infantis apropriadas e sua composição nutricional também deve variar dependendo dos estágios de desenvolvimento da criança (Zou, Pande & Akoh, 2016).

No Brasil, as fórmulas infantis são designadas para dois principais estágios de vida, 0-6 meses e 6-12 meses e, as fórmulas infantis cuja composição e rotulagem atendam aos critérios estabelecidos para os dois estágios, podem ser definidas para lactentes de 0-12 meses (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c). Nos Estados Unidos, as fórmulas infantis regulares destinam-se a todos os lactentes a termo durante o primeiro ano de vida (0-12 meses). Enquanto que na União Europeia, a fórmula infantil (*infant formula*, em inglês) deve ser empregada durante os primeiros 6 meses de vida, a fórmula de transição (*follow-on formula*, em inglês) deve ser empregada a partir do sexto mês de vida e para crianças de 1 a 3 anos existem as fórmulas infantis para crianças de primeira infância (*toddler infant formula*, em inglês) (European Commission, 2006; Lönnerdal & Hernell, 2016).

A Figura 2, baseada no trabalho de Lönnerdal & Hernell (2016), apresenta um resumo dos seguimentos de fórmula infantil, para o primeiro ano de vida, disponíveis hoje nos Estados Unidos, Europa e Brasil e as mudanças (sugestões e hipótese) de novas designações de fórmula infantil.



* RDC nº 43 e 44, de 19/09/2011, do Ministério da Saúde apresenta diferentes designações.

Figura 2. Designação das fórmulas infantis por idade – situação atual e mudanças, baseada no trabalho de Lönnerdal & Hernell (2016).

Lönnerdal & Hernell (2016) sugerem um mínimo de três estágios diferentes (um estágio a mais da realidade atual no Brasil e Europa) para as fórmulas infantis até os 12 meses de vida: **Estágio 1** (de 0–3 meses), primeira infância, período de maior desenvolvimento do lactente; **Estágio 2** (de 3-6 meses de idade); **Estágio 3** (de 6-12 meses), quando a dieta está sendo diversificada. As sugestões são baseadas nos diferentes estágios do lactente visando possibilitar um melhor equilíbrio da quantidade de nutrientes em cada fase, como por exemplo, maiores necessidades de proteína, energia e DHA (Ácido Docosa-Hexaenóico) durante os primeiros meses de vida, bem como uma menor quantidade de ferro durante os seis primeiros meses e maiores após o sexto mês.

Como hipótese, os autores preveem etapas adicionais considerando que as mudanças mais profundas na composição do leite materno ocorrem durante os primeiros 4 a 6 meses. Portanto, mais estágios seria um avanço nutricional e fisiológico para a alimentação com fórmulas infantis no início da vida, mas para tanto são necessários mais comprovações científicas quanto essa abordagem (Lönnerdal & Hernell, 2016).

A ingestão equilibrada de nutrientes ao lactente pode ser conseguida pelo consumo de fórmula infantil e é sem dúvida mais adequada do que o consumo de leite de vaca (Vieira da Silva *et al.*, 2013). Não apenas por sua composição estar cada vez mais próxima do leite materno, mas outras tendências e tecnologias estão se tornando populares, como a adição de ácidos graxos polinsaturados de

cadeia longa (LCPUFAs), nucleotídeos, aminoácidos essenciais, prebióticos e probióticos e o desenvolvimento de fórmulas especializadas para necessidades específicas (Zou, Pande & Akoh, 2016).

O leite materno e o leite de vaca apresentam diferenças em suas composições em relação aos tipos e as proporções de proteínas presentes. O leite de vaca possui três vezes mais proteína que o leite humano, sobrecarregando os rins quando consumido em alta quantidade (BRASIL, 2015). A razão de proteína do soro de leite/caseína (α -, β -, γ - e κ -caseína) no leite de vaca é de, aproximadamente, 20/80, enquanto no leite materno maduro (após o primeiro mês do nascimento) a razão proteína do soro de leite/caseína (α -, β - e κ -caseína) é de 60/40. A concentração de α -caseína no leite materno é muito baixa e constante durante toda a lactação, enquanto que a concentração de caseína total (β - e κ -) aumenta ligeiramente ao longo do primeiro mês de lactação, antes de declinar e permanecer relativamente estável no leite maduro. Na fórmula infantil, a proporção proteína do soro/caseína é semelhante ao leite humano maduro (60/40), mas contém todas as caseínas do leite de vaca (Donovan, 2019).

Ao consumir leite de vaca não modificado, o sistema do lactente apresenta dificuldade em lidar com os altos níveis de proteínas, além das altas cargas de sódio e potássio presentes e, o leite de vaca não fornece quantidades suficientes de vitamina E, ferro ou ácidos graxos essenciais (Martin, Ling & Blackburn, 2016). De acordo com o estudo de Sager, McCulloch & Schoder (2018) foi verificado que as fórmulas infantis adquiridas no comércio da Tanzânia continham metade das concentrações de K, Mg, Mo, Na e S, e um terço a menos de Ca do valor encontrado em amostras de referência de leite de vaca, enquanto que as concentrações de Cu e Fe foram 10 a 30 vezes superiores. A OMS observou que o leite de vaca não modificado, principalmente quando cru e puro, não deve ser administrado a menores de 1 ano como substituto do leite humano ou fórmula infantil (WHO, 2014).

Fórmulas a base de proteínas de soja são opções eficazes para lactentes com galactosemia ou deficiência congênita de lactase, sendo recomendadas para casos de bebês alérgicos a proteínas do leite de vaca. Como os fitoestrogênios (substâncias análogas aos hormônios sexuais femininos produzidos por plantas) estão presentes na fórmula à base de soja, o uso destas fórmulas é limitado pela

preocupação de possíveis danos ao bebê, embora este tema continue controverso (Martin, Ling & Blackburn, 2016). Desde a década de 1960, a composição da fórmula infantil a base de soja melhorou e responde às necessidades nutricionais dos bebês. As indicações médicas para a soja são muito limitadas, mas a fórmula infantil à base de soja também é usada por razões econômicas, religiosas e filosóficas. Os produtos de soja não são recomendados para prematuros ou para menores de seis meses de idade, devido ao teor de alumínio, ao risco de desenvolver osteopenia e aos possíveis efeitos negativos no crescimento (Vandenplas, De Greef & Hauser, 2010).

Os dados obtidos nos trabalhos de Bosscher *et al.* (2003) e de Rodríguez Rodríguez, Alaejos & Romero (2000) indicam que as fórmulas infantis apresentam uma concentração total de micronutrientes maior em comparação as concentrações encontradas em leite materno. Bosscher *et al.* (2003) demonstraram que a alta concentração de micronutrientes na fórmula infantil, não corresponde a uma maior biodisponibilidade, já que os resultados encontrados para disponibilidades em leite materno foram de 19,6% para Ca, 30,2% para Fe e 48,2% para Zn, enquanto que para a fórmula infantil foram de 13,5% para Ca, 3,4% para Fe e 9,3% para Zn, indicando a necessidade de maiores estudos e um monitoramento dos valores efetivamente disponíveis dos nutrientes.

Lesniewicz *et al.* (2010) compararam os valores encontrados de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn, em 12 amostras de fórmulas infantis com os valores declarados na rotulagem e, em geral, os valores declarados pelos fabricantes foram considerados iguais aos valores experimentais, e as discrepâncias não estavam fora do intervalo permitido pela legislação citada no estudo. González-Bermúdez *et al.* (2014), analisaram o efeito da adição de diferentes agentes espessantes nas propriedades de viscosidade e na disponibilidade *in vitro* (fração dialisada e solúvel) do Ca, Fe e Zn em fórmula infantil, demonstrando que o tipo de agente adicionado à fórmula pode interferir na disponibilidade destes elementos. Estes estudos demonstram os rigorosos padrões de qualidade e de segurança que os fabricantes de fórmula infantil devem seguir para atender as diretrizes estipulados por organizações e legislações. O estudo de González-Bermúdez *et al.* (2014) evidenciou que, apesar da necessidade de adição de ingredientes suplementares às fórmulas para uma melhor aproximação da

composição do leite materno, a busca por melhorias na qualidade nutricional não pode negligenciar sua importância, sempre demonstrando cientificamente o benefício ou não do composto de interesse para o crescimento e desenvolvimento dos lactentes.

Dados que vem de encontro com o fato de apesar da composição da fórmula ser baseada na do leite materno, não apenas a quantidade de nutrientes deve ser considerada, mas também sua biodisponibilidade e a forma física e química são importantes, sempre respeitando os níveis mínimos e máximos estipulados para cada nutriente (Zou, Pande & Akoh, 2016). Visando melhorar a qualidade das fórmulas, em 2014 o FDA (*Food and Drug Administration*) publicou regras quanto as Boas Práticas de Fabricação para a fórmula infantil onde exige, entre outros itens, que as fórmulas infantis satisfaçam os fatores de qualidade do crescimento físico normal e a qualidade biológica suficiente do componente proteico da fórmula (quantidades adequadas de proteína em uma forma que pode ser usada pelo lactente), como mais um desafio para a indústria de fórmula infantil.

2. MINERAIS E SUA IMPORTÂNCIA NA FORTIFICAÇÃO DE FÓRMULA INFANTIL

Os minerais são micronutrientes requeridos pelo organismo na ordem de micro a miligramas, essenciais para a vida, assim como os macronutrientes (água, carboidratos, proteínas, lipídios), as vitaminas e as enzimas. Correspondem a cerca de 4% da massa total do corpo humano, desempenhando papel importante na estrutura óssea, regulando certas funções e ajudando a manter o equilíbrio hídrico do corpo e, por serem indispensáveis ao funcionamento do organismo, devem estar presentes regularmente na dieta (Quintaes & Diez-Garcia, 2015; Martin, Ling & Blackburn, 2016; Martínez *et al.*, 2018).

Devido à essencialidade dos minerais, a fortificação de alimentos é adotada há mais de 80 anos em países industrializados como um meio de restaurar os micronutrientes perdidos pelo processamento de alimentos e em programas governamentais para minimizar as carências características de certas regiões. A fortificação é a prática de aumentar deliberadamente o conteúdo de um

micronutriente essencial, ou seja, vitaminas e minerais (incluindo elementos traços) em um alimento, a fim de melhorar a qualidade nutricional do suprimento alimentar e proporcionar um benefício à saúde pública com risco mínimo à saúde (WHO, 2006). E é devido à fortificação que as fórmulas infantis e outros produtos nutricionais apresentam maiores concentrações de alguns minerais do que no leite materno (Dubascoux *et al.*, 2018).

Os minerais podem ser classificados em dois grupos: **macrominerais** (Ca, K, Na, P, Mg), conhecidos como principais materiais de construção celular e estrutural, necessários em maiores quantidades na dieta; e **microminerais** (Fe, Cu, Mn, Zn) que são igualmente essenciais na dieta humana, embora sejam necessários em quantidades menores, e tipicamente conhecidos por agregar valor nutritivo e por serem constituintes de processos biológicos como eletrólitos, enzimas e hormônios (Quintaes & Diez-Garcia, 2015; Martin, Ling & Blackburn, 2016; Poitevin, 2016).

Nas últimas décadas, inúmeras determinações de minerais e de elementos traços foram realizadas em leite materno para gerar níveis de referência e estabelecer recomendações dietéticas confiáveis quanto à ingestão dos nutrientes durante a infância. Essas informações nutricionais são, portanto, a base para que a indústria de alimentos desenvolva produtos fortificados o mais próximo da composição mineral do leite materno. A constituição do leite acompanha os diferentes estágios do lactente, sendo que as mudanças mais rápidas ocorrem no início (0 a 6 meses) (Zou, Pande & Akoh, 2016). Para tanto, níveis de ingestões (AI - *Adequate Intake*, em inglês) foram estabelecidos para lactentes em dois estágios distintos: de 0-6 meses e de 7-12 meses de idade (WHO, 2006). AI é um valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda de estimativas de ingestão de nutrientes para grupos de pessoas saudáveis e que, *a priori*, considera-se adequado. Assim, o valor de AI é usado quando os valores de EAR (Necessidade Média Estimada, do inglês *Estimated Average Requirement*) ou de RDA (Ingestão Dietética Recomendada, do inglês *Recommended Dietary Allowances*) não podem ser determinados (Padovani *et al.*, 2006). A Tabela 1 apresenta os valores de AI dos minerais para lactentes e suas essencialidades.

Tabela 1. Padrão de essencialidade e níveis de ingestão diária (AI, do inglês *Adequate Intake*) de minerais para Lactentes.

Categoria	Elemento	Essencialidade para bebês*	Níveis de ingestões diárias recomendados	
			0-6 meses	7-12 meses
Macromineral	Cálcio (Ca)	Essencial	210 mg	270 mg
	Potássio (K)	Essencial	400 mg	700 mg
	Magnésio (Mg)	Essencial	30 mg	75 mg
	Fósforo (P)	Essencial	100 mg	275 mg
	Sódio (Na) ^a	Essencial	120 mg	370 mg
Microminerais	Cobre (Cu)	Essencial	200 µg ou 30 µg/kg	220 µg ou 24 µg/kg
	Ferro (Fe)	Essencial	0,27 mg	11mg ^b
	Manganês (Mn)	Essencial/ Potencialmente tóxico	0,003 mg	0,6 mg
	Zinco (Zn)	Essencial	2 mg	3 mg

*conforme as diretrizes da WHO 2006; ^aNa: o AI foi baseado em pessoas capazes de obter uma dieta nutricionalmente adequada; ^bFe para estágio 7-12 meses referente a RDA (Recommended Dietary Allowances). Fonte de dados: Padovani *et al.* (2006) e Zou, Pande & Akoh (2016).

O padrão internacional para fórmula infantil estabelecido pela Comissão do Codex (FAO/WHO, 2016) recomenda valores mínimos e máximos ou limites superiores de referência (LSR) para fornecer fórmulas infantis seguras e nutricionalmente adequadas, sendo os valores, em 100 kcal (ou 100 kJ), estabelecidos considerando as seguintes premissas:

- A ingestão média de fórmula preparada para lactentes desde o nascimento até seis meses de idade é de 750 mL por dia;
- Um peso corporal representativo de 5 kg durante esse período;
- Uma ingestão calórica representativa de 500 kcal por dia durante esse período.

A Tabela 2 apresenta os níveis mínimos (min) e máximos (max) ou LSR recomendados pelo Codex e estabelecidos pelas legislações brasileiras (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b), europeia (European Commission, 2006) e americana (FDA, 1985).

Tabela 2. Níveis mínimos (min), máximos (max) e limite superior de referência (LSR) recomendados pelo *Codex Alimentarium* e estabelecidos pelas legislações brasileiras, europeia e americana.

		CODEX*			RDC n° 43*			RDC n° 44*			UE*		UE*		FDA*	
		Min	Max	LSR	Min	Max	LSR	Min	Max	LSR	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Ca	mg/100 kcal	50	-	140	50	-	140	50	-	140	50	140	50	140	60	-
	mg/100 kJ	12	-	35	12	-	35	12	-	35	12	33	12	33	-	-
Cu	µg/100 kcal	35	-	120	35	-	120	35	-	120	35	100	35	100	60	-
	µg/100 kJ	8,5	-	29	8,5	-	29	8,5	-	29	8,4	25	8,4	25	-	-
Fe	mg/100 kcal	0,5	-	-	0,5	1,3	-	0,9	2	-	0,3	1,3	0,6	2	0,2	3
	mg/100 kJ	0,1	-	-	0,1	0,3	-	0,2	0,5	-	0,1	0,3	0,1	0,5	-	-
K	mg/100 kcal	60	180	-	60	180	-	60	180	-	60	160	60	160	80	200
	mg/100 kJ	14	43	-	14	43	-	14	43	-	15	38	15	38	-	-
Mg	mg/100 kcal	5	-	15	5	-	15	5	-	15	5	15	5	15	6	-
	mg/100 kJ	1,2	-	3,6	1,2	-	3,6	1,2	-	3,6	1,2	3,6	1,2	3,6	-	-
Mn	µg/100 kcal	1	-	100	1	-	100	1	-	100	1	100	1	100	5	-
	µg/100 kJ	0,3	-	24	0,3	-	24	0,3	-	24	0,3	25	0,3	25	-	-
P	mg/100 kcal	25	-	100	25	-	100	25	-	100	25	90	25	90	30	-
	mg/100 kJ	6	-	24	6	-	24	6	-	24	6	22	6	22	-	-
Zn	mg/100 kcal	0,5	-	1,5	0,5	-	1,5	0,5	-	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	-
	mg/100 kJ	0,1	-	0,36	0,1	-	0,36	0,1	-	0,36	0,1	0,36	0,1	0,36	-	-
Na	mg/100 kcal	20	60	-	20	60	-	20	60	-	20	60	20	60	20	60
	mg/100 kJ	5	14	-	5	14	-	5	14	-	5	14	5	14	-	-

*Codex: orientações para fórmulas para lactentes (FAO/WHO, 2016); RDC: legislações brasileiras (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c), UE: legislação europeia (European Commission, 2006); FDA: legislação americana (FDA, 1985).

Os LSR são limites para nutrientes e outras substâncias obtidos a partir das necessidades nutricionais dos lactentes e do histórico de uso estabelecido aparentemente seguro, estipulados para nutrientes sem informações suficientes quanto à avaliação de risco. O objetivo dos LSR é fornecer orientação aos fabricantes, não devendo ser interpretados como valores máximos a serem alcançados, sendo que todas as fórmulas infantis comercializadas devem atender aos padrões locais, baseados nos níveis nacionais de saúde (FAO/WHO, 2016; Chen *et al.*, 2018). Os níveis nos quais os minerais estão presentes na fórmula infantil e nos produtos lácteos é o resultado de um equilíbrio dinâmico dos minerais entre as fases aquosa e coloidal do leite, tratamento tecnológico (osmose reversa, ultrafiltração por membrana e pulverização) e a fortificação mineral aplicada durante o processo de fabricação (Poitevin, 2016).

Os Estados Unidos e a União Europeia adotam apenas valores mínimos e máximos, enquanto que o Brasil, em geral, seguiu rigorosamente as recomendações do *Codex Alimentarium*. Os valores do Fe diferem significativamente entre todas as legislações, sendo que o próprio *Codex* recomenda que estes valores devam ser determinados pelas autoridades de cada país, levando em conta as características de alimentação e teor de Fe no suprimento de água, recomendação aplicada também ao teor de Cu. A RDC nº43 e RDC nº 44 (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c) estabelecem que para fórmulas infantis à base de proteínas isoladas de soja ou de misturas destas com proteínas lácteas, o limite máximo de Fe deve ser de 2,0 mg/100 kcal (0,5 mg/100 kJ) e de 2,5 mg/100 kcal (0,65 mg/100 kJ), respectivamente. A quantidade de P em fórmulas à base de proteína de soja também pode ser maior que o descrito na Tabela 2 (European Commission, 2006; FAO/WHO, 2016).

O estudo realizado por Martínez *et al.* (2018) com fórmulas infantis comercializadas na Espanha e leite materno demonstrou que os níveis dos minerais e elementos traços (Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sn, Sr e Zn) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nas fórmulas do que no leite materno. Ao observar as designações das fórmulas por faixa etária, as concentrações de Ca, Fe, K, Mg, Na e Sn nas fórmulas infantis de 0-6 meses foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) do que nas amostras de fórmulas de transição (6-12 meses). Resultado que demonstra uma tendência dos fabricantes em seguirem as

variações estipuladas de Al para as diferentes faixas etárias, mesmo que a legislação da União Europeia exija diferença de concentração apenas para o Fe entre as duas faixas etárias.

Em geral, os estudos para a determinação de macrominerais e microminerais em fórmulas infantis e alimentos para bebês são multielementares e os principais analitos determinados são aqueles que podem causar problemas à saúde da criança, seja por ingestão excessiva ou insuficiente. Nos estudos envolvendo minerais, a determinação simultânea de Ca, Fe e Zn, ou de Fe e Zn nos alimentos desperta a atenção. A razão para essas abordagens integradas é provavelmente baseada no fato de que esses três minerais desempenham um papel importante na saúde de adultos e crianças e são susceptíveis a interações complexas, como por exemplo, Fe e Zn são elementos críticos para a saúde do lactente, devido à sua biodisponibilidade relativamente baixa nos alimentos para crianças (Etcheverry, Grusak & Fleige, 2012; Mir-Marqués, Cervera & La Guardia, 2015).

Do Nascimento da Silva *et al.* (2013) estudaram a bioacessibilidade de Fe em 3 tipos de misturas de farinhas e em 3 tipos de alimentos para bebês e encontraram uma expressiva variação para a fração bioacessível do Fe: de 14% a 97%. Esta variação é decorrente das diferentes formas em que o Fe pode estar presente nos alimentos (heme e não-heme) e da presença de inibidores de absorção como os fitatos, os ligantes de Fe e certos compostos fenólicos, fato também observado nos estudos de De Lima *et al.* (2014) e Fernández-Palacios *et al.* (2017).

O Fe é um dos elementos mais estudados, não apenas por ser um transportador de oxigênio, mas também por desempenhar um papel importante em várias funções fisiológicas, incluindo desenvolvimento e comportamento psicomotor em crianças e funções imunológicas (Dominguez-González & Bermejo-Barrera, 2015). Lactentes a termo com peso normal nascem com reservas relativamente grandes de Fe existindo um consenso geral de que essas reservas são adequadas para atender aos requisitos de Fe nos primeiros 6 meses de vida. Após essa idade é difícil atender às necessidades de Fe e a fortificação das fórmulas infantis com Fe são recomendadas, assim como alimentos complementares ricos em Fe. O nível de fortificação de Fe usado nas fórmulas é

bastante generoso, podendo ser de 20 a 40 vezes maior do que no leite materno, e a principal razão para isso é atender aos requisitos de Fe durante os últimos meses do lactente (Lönnerdal & Hernell, 2016).

A deficiência de Fe é o distúrbio nutricional mais comum e difundido no mundo sendo um problema de saúde pública tanto em países industrializados quanto em não industrializados (WHO, 2006). No entanto, quantidades excessivas desse elemento também podem ser prejudiciais à saúde. As práticas atuais de fortificação de fórmulas infantis comerciais podem gerar um excesso de Fe livre no intestino do lactente e aumentar o risco infantil de infecção, por fornecer uma abundante fonte de Fe para patógenos (Quinn, 2013). De maneira semelhante, a suplementação com zinco pode afetar o metabolismo do ferro, dependente do cobre, e as funções imunológicas (Sandström, 2001). Devido à sua importância mundial, o Fe juntamente com o Zn são os minerais mais estudados em fórmulas infantis e em alimentos para bebês (Rodríguez Rodríguez, Alaejos & Romero, 2000; Bosscher *et al.*, 2003; Cava-Montesinos *et al.*, 2005; Lesniewicz *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012; Bağdat *et al.*, 2013; Erdogan *et al.*, 2015; Fernández-Palacios *et al.*, 2017; Sager, McCulloch & Schoder, 2018).

O Zn é um componente essencial de um grande número de enzimas e desempenha um papel central no crescimento e na diferenciação celular em tecidos com rápida renovação, incluindo os do sistema imune e do trato gastrointestinal. É provável que a ocorrência de deficiência de Zn esteja fortemente associada à deficiência de Fe, pois tanto o Fe quanto o Zn são encontrados nos mesmos alimentos (carne, frango e peixe) e, em ambos os casos, sua absorção pelos alimentos são inibidas por fatores antinutricionais (WHO, 2006). O Zn e o Cu são mutuamente antagônicos, interferindo na absorção gastrointestinal e levando potencialmente a um desequilíbrio. O excesso de Zn também pode diminuir a captação de Mg e Ca e, por outro lado, altos níveis de Ca na dieta podem diminuir a absorção de Zn (Carvalho *et al.*, 2015).

Ca, P e Mg são distribuídos principalmente nos ossos e tecidos, variando de 70 a 80% para Mg e P a 99% para Ca (Poitevin, 2016). Além de seu papel na manutenção da rigidez e na força do esqueleto, o Ca está envolvido em um grande número de processos metabólicos, os quais são mantidos mesmo quando a ingestão é baixa, onde a fonte de Ca passa a ser os ossos. Assim, a ingestão

insuficiente de Ca leva à diminuição da mineralização óssea e, conseqüentemente, aumenta o risco de osteoporose em adultos (WHO, 2006).

Roig *et al.* (1999), encontraram uma quantidade de Ca total em leite materno de 29,2 mg/100mL, sendo que no ensaio de bioacessibilidade, a fração dialisável correspondeu a 13,6% e a fração solúvel 55,8%. Para fórmulas infantis à base de proteína de leite de vaca foi encontrado um teor total de 42,3 mg de Ca/100mL, a fração dialisável e solúvel corresponderam a 8,1% e 11,4%, respectivamente. Essa tendência da porcentagem de Ca bioacessível (frações solúvel e dialisável) em fórmula ser menor em relação ao leite materno também foi observada no estudo de Bosscher *et al.* (2003), apesar da maior concentração do teor total de Ca nas fórmulas.

Ca e P são íons fundamentais para mineralização óssea (Rigo & Senterre, 2006), sendo o P intimamente associado ao Ca na nutrição humana e chamado de “gêmeo metabólico”. Desta forma, os fatores que favorecem ou dificultam a absorção do P são praticamente os mesmos do Ca e suplementos contendo Ca, ou mesmo elevadas ingestões de Ca, podem comprometer este equilíbrio e afetar a absorção do P (Lobo & Tramonte, 2004). O leite materno contém níveis substanciais de P, e sua relação Ca:P é ideal para absorção. Para ajudar a manter o equilíbrio normal sérico, as fórmulas infantis devem manter uma razão mínima de Ca:P de 1:1 e máxima de 2:1 (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c). O equilíbrio entre os sais de Ca e P pode ser afetado pelas diversas características dos processos tecnológicos ao qual o leite pode ser submetido (pH, temperatura, pressão, concentração), porém se o processamento for moderado, o balanço entre estes itens se mantém estável (Angel de la Fuente & Juárez, 2015).

Como cátion essencial no fluido intracelular, o K é um dos minerais mais importantes para apoiar o crescimento e o desenvolvimento saudáveis de bebês por estar criticamente envolvido na função de equilíbrio base-ácido, regulação da pressão osmótica, condução do impulso nervoso, construção muscular e Na^+ / K^+ ATPase. Uma ingestão incorreta de K também pode causar doenças (como hipercalemia e hipocalemia), o que torna importante o controle correto do conteúdo de K (Chen *et al.*, 2018).

O Na, K, Ca, Mg e P são essenciais para a manutenção do balanço hídrico, da função cardíaca, mineralização do esqueleto e das funções dos sistemas nervoso, muscular e enzimático. As necessidades diárias dependem da maturidade do recém-nascido (Rigo & Senterre, 2006). O Na é necessário para transmitir os impulsos nervosos e estimular a ação muscular, além da manutenção do equilíbrio hídrico e ácido básico (Oh, 1999).

O Mg é o principal cátion intracelular com concentração livre no citosol. Há um aumento no interesse do papel do Mg em estudos clínicos de nutrição e fisiologia, pois este mineral afeta muitas funções celulares, incluindo o transporte de íons K e Ca, além de modular sinais de transdução, de metabolismo de energia e de proliferação celular (Cozzolino, 2007).

O Mn é um elemento essencial envolvido na formação dos ossos e no metabolismo de aminoácidos, de colesterol e de carboidratos. A deficiência em Mn tem sido observada em várias espécies de animais, e os sinais apresentados são prejuízos no crescimento e na função reprodutora, queda na tolerância à glicose e alterações no metabolismo de carboidratos e de lipídeos. Além disso, a deficiência em Mn interfere no desenvolvimento normal do esqueleto de várias espécies animais (Cozzolino, 2007). Os níveis de Mn no leite materno são muito baixos e pouco estudados, porém durante a lactação não é provável o uso adicional de suplementos dietéticos contendo Mn para suprir a demanda do recém-nascido (National Academy Press (U.S.), 1989; Morgano *et al.*, 2005). Alta exposição ao Mn em crianças tem sido associada ao comprometimento do desenvolvimento cognitivo e da coordenação motora (Martínez *et al.*, 2018).

O Cu é essencial em plantas e animais, sua importância está no fato de estar presente em mais de 13 enzimas envolvidas na produção de energia, na prevenção de anemia (transporte do Fe entre os tecidos) e de doenças ósseas, na redução de danos celulares, e também necessário para o desenvolvimento fetal e infantil (Sandström, 2001; De Lima *et al.*, 2014). Os resultados para o Cu obtidos por Do Nascimento da Silva *et al.* (2013), no estudo com diversos alimentos para bebês, revelou uma variação na bioacessibilidade de 19% a 91%. Esta variação é devida a alguns dos alimentos estudados apresentavam grãos e sementes (arroz e o trigo) que são fontes conhecidas de Cu e de que os complexos de Cu-fitato serem mais solúveis em pH gastrointestinal (em contraste

com os complexos de Fe e Zn), enquanto outros alimentos analisados apresentavam inibidores da absorção de Cu como açúcares, proteínas animais, S-aminoácidos e histidina.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

Para a determinação de minerais em alimentos é necessário tornar os analitos disponíveis em solução por meio da mineralização prévia da amostra e posterior dissolução dos resíduos com ácidos minerais. A destruição da matéria orgânica é geralmente considerada como a etapa crítica da análise, podendo levar a erros no resultado final, devido principalmente à contaminação da amostra ou a perda do analito por adsorção ou por volatilização (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Na literatura o procedimento de digestão mais utilizado para fórmula infantil ou para os estudos de bioacessibilidade em alimentos é a digestão assistida por micro-ondas (Bosscher *et al.*, 2003; Lesniewicz *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012; Do Nascimento da Silva *et al.*, 2013; De Lima *et al.*, 2014; Erdogan *et al.*, 2015; Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016; Sager, McCulloch & Schoder, 2018).

O tratamento de amostras mediante o aquecimento com micro-ondas foi um avanço devido ao uso de recipientes fechados de politetrafluoretileno (PTFE) que minimizam a contaminação cruzada das amostras e a perda dos elementos voláteis. A elevada pressão e temperatura alcançadas possibilitam uma diminuição da quantidade de reagentes necessários para converter a amostra em uma solução, tornando-se um processo mais rápido, eficiente e seguro em comparação ao aquecimento convencional (Sun, Waters & Mawhinney, 2000; Krug, 2010; Machado, Bergmann & Pistón, 2016).

Sun, Waters & Mawhinney (2000) compararam cinco métodos de digestão para a determinação de 13 elementos em diferentes matrizes de alimentos: um em forno tipo mufla, um em chapa aquecedora e três usando radiação micro-ondas com diferentes misturas de ácidos, o procedimento de digestão usando radiação micro-ondas com a mistura ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e ácido fluorídrico ($\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2\text{-HF}$) apresentou as melhores recuperações. Entretanto, dependendo dos elementos a serem determinados e de sua concentração, os demais métodos podem apresentar vantagens com resultados confiáveis. As

relações teóricas, que regem a interação da radiação das micro-ondas com a amostra e os reagentes explora a absorção da energia eletromagnética das micro-ondas por um material não transparente e sua conversão em energia térmica (calor), com o consequente aquecimento do meio reacional devido, principalmente, a interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando migração iônica e rotação de dipolos (Krug, 2010).

Os carboidratos são facilmente mineralizados com ácido nítrico a 180°C, enquanto lipídios, proteínas e aminoácidos são digeridos incompletamente devido ao potencial de oxidação relativamente baixo do ácido nítrico a 200°C e requerem a adição de peróxido de hidrogênio para aumentar o poder oxidante do meio (Martínez *et al.*, 2015). O emprego de misturas oxidantes para aumentar o poder oxidante do meio também é utilizado em outras técnicas de digestão, como o aquecimento em chapa elétrica e a digestão por via seca em forno tipo mufla (Roig *et al.*, 1999; Rodríguez Rodríguez, Alaejos & Romero, 2000; Cruz *et al.*, 2009; Bağdat *et al.*, 2013; Fernández-Palacios *et al.*, 2017).

Segundo Sun, Waters & Mawhinney (2000) e Krug (2010), a digestão por via seca em forno tipo mufla é, provavelmente, o método mais simples para a o preparo de amostras biológicas e orgânicas. A vantagem deste procedimento inclui a maior quantidade de amostra que pode ser digerida para obtenção de cinzas contendo os analitos de interesse, as quais quando dissolvidas em um pequeno volume de ácido geram uma relação entre massa e volume final muito flexível. Este é um método adequado quando elementos não voláteis são determinados e suas concentrações são relativamente baixas na amostra.

O método baseia-se na calcinação da matéria orgânica aquecendo a amostra a uma temperatura relativamente alta (entre 450°C e 550°C), com oxigênio atmosférico servindo como agente de oxidação, seguida da solubilização das cinzas resultantes em ácido ou mistura de ácidos. Este procedimento garante a destruição total da matéria orgânica e a solubilização dos elementos, geralmente em formas de carbonato ou de óxido. Devido sua simplicidade, as técnicas de digestão por via seca ainda são umas das principais maneiras de determinar o teor total de minerais nos alimentos. Porém, existem algumas limitações como a conversão de alguns elementos em uma forma volátil (como cloretos e bromatos de Cd, Pb, Zn e Co), ocorrendo a perda parcial ou completa

do elemento, além de potencial de contaminação cruzada com outras amostras durante a calcinação (Sun, Waters & Mawhinney, 2000; Krug, 2010; Martínez *et al.*, 2015; Poitevin, 2016).

A extração assistida por ultrassom (sonicação) vem se destacando como um método alternativo eficiente, simples, rápido e de menor custo, para a etapa de mineralização de alimentos, como leite, fórmula infantil, garapa e frutos do mar, além de ser aplicada em outros tipos de matrizes (Bermejo-Barrera *et al.*, 2001; Cava-Montesinos *et al.*, 2005; Porova *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2015; Machado, Bergmann & Pistón, 2016; Zounr *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018). Em geral, observa-se que a extração assistida por ultrassom depende fortemente da interação dos analitos com a matriz e, embora os métodos assistidos por ultrassom sejam promissores, é recomendável que as variáveis que influenciam a extração dos analitos (tempo de ultrassom, quantidade de ácidos, temperatura) sejam avaliadas em diferentes tipos de amostras antes da utilização deste método. Todavia, em condições ótimas, recuperações quantitativas para todos os metais são alcançadas e os resultados obtidos são comparáveis aos pré-tratamento habituais (Bermejo-Barrera *et al.*, 2001; Krug, 2010).

A extração assistida por ultrassom é baseada na cavitação acústica em meio líquido, ou seja, quando uma onda ultrassônica passa por um líquido, a pressão oscilante da onda pode causar um fenômeno de cavitação que envolve geração, crescimento, oscilações, cisões e implosões de numerosas minúsculas bolhas de gás chamadas bolhas de cavitação (Capelo, Maduro & Vilhena, 2005). A cavitação é a responsável por muitas das características de interesse dos ultrassons para a química. A cavitação depende da tensão superficial, temperatura e dos gases dissolvidos no meio líquido, bem como da frequência e amplitude da onda acústica que se propaga (Krug, 2010).

Cava-Montesinos *et al.* (2005) descreveram uma extração usando banho de ultrassom, em amostras de leite para 45 elementos, como um método alternativo aos métodos por micro-ondas, com excelentes resultados. Já Machado, Bergmann & Pistón (2016) otimizaram e validaram um método de preparo de amostras utilizando um banho ultrassônico para a determinação de Fe e Zn em fórmulas infantis, concluindo que se trata de um método simples, rápido e que está de acordo com os princípios da “Química Verde” por usar apenas ácido

diluído e um banho ultrassônico. A eficiência do método utilizando ácidos diluídos e ultrassom para esta matriz é devida a elevada solubilidade dos sais (Machado, Bergmann & Pistón, 2016).

A Figura 3 apresenta um resumo simplificado das vantagens e limitações das três técnicas de preparo de amostra (micro-ondas, forno tipo mufla e ultrassom) citadas.

		
Radiação Micro-ondas ✓ Mais citado na literatura ✓ Realizado em vasos fechados (minimiza perda de voláteis) ✓ Tempo de digestão menor (pressão e temperatura) ✓ Uso de ácidos e reagentes oxidantes ✗ Elevado custo do equipamento e insumos	Calcinação em Forno Mufla ✓ Mais simples ✓ Maior massa de amostra que pode ser reduzida ✓ A cinza resultante dissolvida em pequeno volume ✗ Determinação de elementos voláteis ✗ Contaminação cruzada	Sonicação por Ultrassom ✓ Método alternativo ao micro-ondas ✓ Rápido, simples e de menor custo ✓ Está de acordo com os princípios da química verde por usar apenas ácido diluído ✗ Limitado a matriz com boa solubilidade em água ✗ Técnica menos empregada

Figura 3. Principais vantagens e limitações das técnicas de preparo de amostras usando radiação micro-ondas, calcinação e sonicação por ultrassom.

4. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)

A quantificação de minerais em alimentos pode ser realizada por diferentes técnicas analíticas. A escolha da técnica depende principalmente do elemento a ser analisado, do nível de sua concentração na amostra, do número de amostras a serem analisadas, da quantidade de amostra disponível, do tipo de preparo da amostra, do custo envolvido, da exatidão e da precisão requeridas (Instituto Adolfo Lutz, 2005). Atualmente, a maioria dos métodos oficiais para a determinação de minerais e elementos traços em fórmulas infantis e leites são multielementares com base nas técnicas de AAS e ICP OES após digestão por via seca ou úmida (principalmente micro-ondas) (Poitevin, 2016).

Na literatura existe predominância na determinação de minerais usando a técnica de espectrometria de ICP OES quando o estudo é multielementar (Cava-Montesinos *et al.*, 2005; Lesniewicz *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012; De Lima *et al.*, 2014; Bağdat *et al.*, 2014; Erdogan *et al.*, 2015; Sager, McCulloch & Schoder, 2018); seguido pela técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (AAS), predominando estudos com um, dois ou três elementos analisados (Roig *et al.*, 1999; Rodríguez Rodríguez, Alaejos & Romero, 2000; Bosscher *et al.*, 2003; Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016; Fernández-Palacios *et al.*, 2017). A técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS) também é usada para quantificar os teores de minerais, sendo uma técnica mais sensível que as anteriores (Pacquette *et al.*, 2012; Pandelova *et al.*, 2012; Do Nascimento da Silva *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015).

O ICP OES é uma ferramenta poderosa para a determinação do conteúdo de elementos em uma grande variedade de amostras de alimentos por ser uma técnica multielementar capaz de determinar rotineiramente mais de 70 elementos, sequencial ou simultaneamente, além de possibilitar a determinação de uma ampla faixa linear de concentração (sem alteração das condições experimentais) e sua baixa susceptibilidade às interferências químicas (Skoog, Holler & Nieman, 2002). Figura 4 apresenta um esquema típico de um ICP OES.

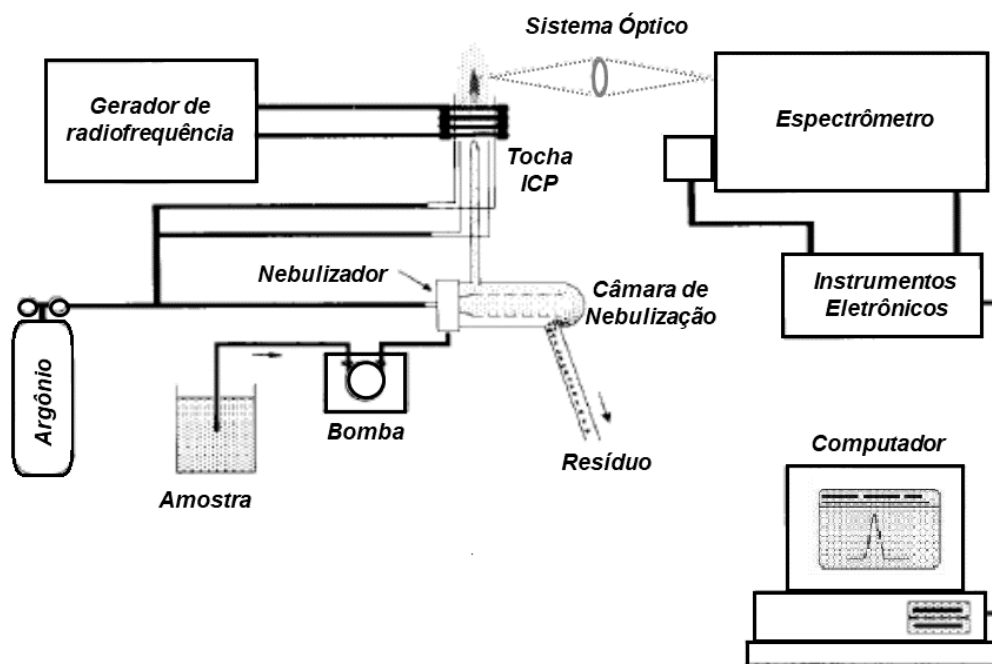


Figura 4. Representação típica de um equipamento de ICP OES (Adaptado de Boss & Fredeen, 2004).

A técnica consiste na emissão de radiação eletromagnética de átomos e íons dos analitos, gerados em um plasma de argônio, onde ocorre a atomização das espécies presentes na amostra. O plasma é uma mistura gasosa condutora de eletricidade, geralmente constituído por gás altamente ionizado que contém uma concentração significativa de íons e elétrons, além de átomos e moléculas neutros, gerados em uma tocha de quartzo, onde ocorre a passagem de um fluxo de argônio. Os íons argônio, uma vez formados em um plasma, são capazes de absorver energia suficiente para manter a temperatura em um nível no qual ionizações adicionais sustentam o plasma (Skoog, Holler & Nieman, 2002).

A transferência de energia oriunda das interações do aerossol da amostra com o plasma, altamente energético, desencadeia os processos de atomização, ionização, excitação e emissão dos elementos metálicos presentes na matriz. A amostra ionizada no plasma e os íons emitem luzes de diferentes extensões que são, em seguida, medidas. O ICP OES é capaz de medir ambas as emissões atômicas e iônicas possibilitando que mais comprimentos de ondas possam ser monitorados, essas medidas são comparadas a padrões para quantificação da concentração dos elementos na amostra (Giné, 1998).

5. BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM FÓRMULA INFANTIL.

O desenvolvimento de modelos de digestão *in vitro* baseia-se em uma extensa compreensão das condições de digestão *in vivo*, de diferentes grupos populacionais, para possibilitar acréscimos relevantes da bioeficácia de produtos. A elaboração de alimentos que atendam às necessidades específicas de diferentes grupos de consumidores melhora o uso sustentável dos recursos naturais, além de melhorar nossa capacidade de explorar o potencial dos alimentos em prevenir doenças e manter a saúde (Shani-Levi *et al.*, 2017; Brodkorb *et al.*, 2019). Este conhecimento é importante, pois após a ingestão, os alimentos passam por processos de biotransformação no trato gastrointestinal e o conteúdo bioacessível de nutrientes para o organismo pode ser inferior ao teor total ingerido devido a um grande número de fatores (Fernández-García, Carvajal-Lérida & Pérez-Gálvez, 2009; Etcheverry, Grusak & Fleige, 2012; De Lima *et al.*, 2014).

O ensaio *in vivo*, usando seres humanos ou animais, ainda é considerado como “padrão ouro” para fornecer resultados mais precisos quanto à bioacessibilidade, biodisponibilidade, absorção, metabolismo e excreção dos alimentos. Entretanto, estes ensaios são demorados, caros, podendo ser difíceis de realizar, inadequados, ou não são justificáveis por razões éticas, como nos estudos com recém-nascidos onde são proibidos ensaios *in vivo* (Hur *et al.*, 2011; Bourlieu *et al.*, 2014; Shani-Levi *et al.*, 2017). Em particular, os modelos *in vivo* envolvendo animais têm certas limitações por existir diferenças entre as necessidades minerais, o metabolismo, a capacidade digestiva e sensibilidade a fatores alimentares diferentes em comparação com os seres humanos. Os ratos, por exemplo, têm um valor limitado para avaliar a absorção de ferro em humanos (Sandberg, 2005).

Consequentemente, ensaios *in vitro* são frequentemente realizados para otimizar a nutrição de alimentos e a administração oral de medicamentos. Os modelos de digestão *in vitro* foram desenvolvidos inicialmente como ferramentas de pesquisa para caracterizar e esclarecer as alterações estruturais e bioquímicas dos componentes dos alimentos em condições fisiológicas causadas por enzimas gastrointestinais, motilidade (capacidade ou facilidade de se mover) e pela

microbiota colônica. Seu uso é viável quando considera as condições anatômicas e fisiológicas mais biorelevantes da boca, estômago, lúmen do intestino delgado e grosso e do revestimento do intestino (Shani-Levi *et al.*, 2017; Brodkorb *et al.*, 2019).

De fato, apesar de suas limitações, os modelos *in vitro* são particularmente adequados para investigar as alterações físico-químicas luminais nos alimentos, questões de bioacessibilidade e alguns aspectos da biodisponibilidade, com as vantagens de serem mais rápidos, menos trabalhosos e apresentarem menores restrições bioéticas. A maioria dos métodos desenvolvidos simula uma sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal humano permitindo estimar qual porcentagem dos nutrientes estarão disponíveis para absorção (conteúdo bioacessível) e disponível para funções fisiológicas (conteúdo biodisponível). Deve-se ter em mente que a biodisponibilidade efetiva, fisiológica ou metabólica, não pode ser medida em sua totalidade por qualquer método *in vitro* (Etcheverry, Grusak & Fleige, 2012; Alegria-Torán, Barbera-Sáez & Cilla-Tatay, 2015).

É importante diferenciar os termos bioacessibilidade e biodisponibilidade, pois há conflitos quanto estes termos na literatura. **Bioacessibilidade** é definida como a fração de um elemento que é liberado da matriz alimentar após ingestão e solubilizado no lúmen intestinal e trato intestinal. A **biodisponibilidade** de um composto depende das propriedades físicas da matriz alimentar, e descreve a fração do elemento solubilizado que é absorvido no trato intestinal e atinge o sistema circulatório. Consequentemente, a própria bioacessibilidade dos elementos não fornece uma medida direta da biodisponibilidade dos elementos, uma vez que nem todas as espécies de elementos solúveis são absorvíveis (Barciela-Alonso & Bermejo-Barrera, 2015).

Os modelos de digestão *in vitro* podem ser estáticos, semi-dinâmicos ou dinâmicos (Ménard *et al.*, 2018), envolvendo condições (temperatura, agitação, pH, enzimas e composição química) semelhantes às encontradas no corpo humano durante a digestão (Dominguez-González & Bermejo-Barrera, 2015). Existem quatro principais tipos de ensaios *in vitro*: solubilidade, dialisabilidade, modelos gastrointestinais dinâmicos (por exemplo, TIM) (para bioacessibilidade) e os modelos com célula Caco-2 (para biodisponibilidade). A Tabela 3 apresenta

um resumo das vantagens e limitações destes métodos, baseada na revisão de Etcheverry, Grusak & Fleige (2012).

Os modelos de digestão *in vitro*, geralmente, consideram três fases principais: (i) fase oral, na boca durante a qual os alimentos sólidos são mastigados e transformados, (ii) fase gástrica e (iii) fase intestinal (duodenal). Recém-nascidos (de zero a seis meses) devem ser alimentados exclusivamente com refeições líquidas à base de leite, o que reduz consideravelmente a fase oral do processo digestivo devido ao rápido contato da refeição líquida com a cavidade oral, fato responsável por a maioria dos estudos envolvendo a matriz fórmula infantil omitirem a etapa simulando a digestão oral (Bourlieu *et al.*, 2014).

Tabela 3. Principais métodos *in vitro* para estudos de solubilidade, dialisabilidade, modelos gastrointestinais dinâmicos e modelos com células Caco-2, baseada na revisão de Etcheverry, Grusak, & Fleige (2012).

Métodos <i>in vitro</i>	Informação obtida	Vantagens	Limitações
Solubilidade	Bioacessibilidade	✓ Simples ✓ Menor custo ✓ Fácil de conduzir, todo laboratório teria o equipamento necessário	• Às vezes não é um indicador confiável de biodisponibilidade • Não é possível avaliar a taxa de absorção ou cinética de transporte • Não é possível medir a concorrência de nutrientes ou componentes alimentares no local de absorção
Dialisabilidade	Bioacessibilidade	✓ Simples ✓ Relativamente barato ✓ Fácil de conduzir	• Não é possível avaliar a taxa de absorção ou cinética de transporte • Não é possível medir a concorrência de nutrientes ou componentes alimentares no local de absorção
Modelo gastrointestinal dinâmicos	Bioacessibilidade. No entanto, quando acoplado às células intestinais, a biodisponibilidade também pode ser medida	✓ Incorpora muitos parâmetros de digestão (peristaltismo, agitação, temperatura corporal, etc.) ✓ Permite a coleta de digestão em qualquer etapa do sistema digestivo	• Alto custo • Poucos estudos validados
Modelo com célula Caco-2	Biodisponibilidade	✓ Permite o estudo da competição de nutrientes ou componentes alimentares no local de absorção	• Requer pessoal treinado com conhecimento dos métodos de cultura celular • Laboratório adequado para cultura celular

A Figura 5 apresenta um esquema representativo das principais etapas de um método de digestão *in vitro*, quanto às etapas gástrica e intestinal, para a determinação da solubilidade (fração solúvel) e dialisabilidade (fração dialisada) de minerais.

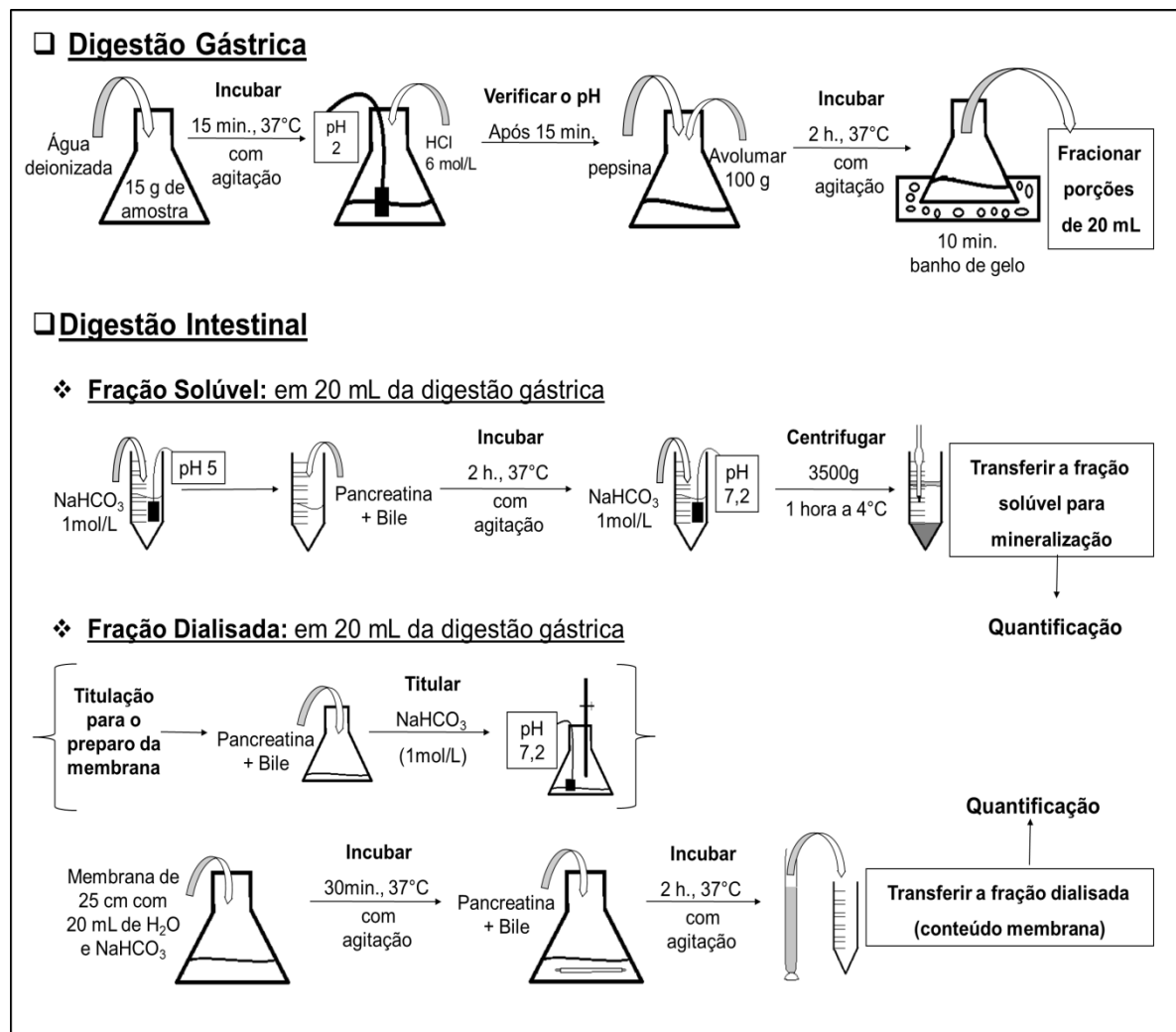


Figura 5. Esquema representativo do procedimento experimental do método de digestão *in vitro* estático.

A fase gástrica é realizada com adição de HCl ou HCl-pepsina em condições fixas de pH e de temperatura, por um período de tempo definido (pH 1–2, a 37°C, de 1 a 3 horas), seguida por uma fase intestinal onde ocorre a neutralização do digerido usando uma base (geralmente NaOH ou NaHCO₃) e incubação com uma solução contendo enzimas pancreáticas e sais biliares (pH 7, a 37°C, de 1 a 5 horas). A quantificação da porcentagem do elemento na fração solúvel é realizada no sobrenadante obtido por centrifugação ou filtração da

digestão gastrointestinal (método de solubilidade) (Alegria-Torán, Barbera-Sáez & Cilla-Tatay, 2015).

Adicionalmente, o método de dialisabilidade é realizado para estabelecer tendências nos valores de bioacessibilidade relativa dos minerais (Jovaní *et al.*, 2001). Os ensaios de dialisabilidade foram introduzidos por Miller *et al.* (1981), como uma nova abordagem para estimar a solubilidade do Fe em alimentos, e consiste em simular a interação dos elementos com a parede do intestino através da adição de uma membrana de diálise de peso molecular de corte definido (MWCO) após a etapa de digestão gástrica, permitindo um aumento gradual do pH antes e durante a digestão pancreática. A premissa básica deste modelo é de que os compostos dialisáveis (que conseguem passar pelos os poros da membrana) estarão disponíveis para absorção no intestino delgado.

A utilização de uma membrana de diálise com um tamanho de poro específico é paralelo aos eventos que ocorrem quando o alimento sai do estômago e entra no duodeno, permitindo a discriminação entre complexos solúveis de alto e baixo peso molecular, além de eliminar os problemas encontrados ao usar a centrifugação como meio de separação dos solúveis e insolúveis (Alegria-Torán, Barbera-Sáez & Cilla-Tatay, 2015). Um exemplo do efeito da centrifugação na bioacessibilidade dos minerais em fórmula infantil é quanto sua influência no conteúdo de Ca solúvel, já que a caseína presente em fórmulas à base de leite forma micelas contendo P de Ca coloidal, que podem levar a uma maior separação do Ca quando alta velocidade de centrifugação é usada (Laparra, Barberá & Farré, 2005).

O peso molecular de corte da membrana de diálise e o método utilizado para a determinação dos elementos obtidos na fração dialisada influenciam diretamente os resultados podendo excluir elementos ligados a moléculas grandes que, em alguns casos, estariam disponíveis para absorção e incluir elementos ligados a moléculas pequenas, que nem sempre estão disponíveis para absorção (Sandberg, 2005). A condição de centrifugação de 3500 g, a 4°C por 1 h, é a mais recorrente para obter a fração solúvel de minerais em fórmula infantil e, para a fração dialisada, o emprego de uma membrana de diálise de 10 – 12kDa MWCO (Tabela 4).

A princípio, os modelos de digestão *in vitro* são uma alternativa útil aos modelos usando animal e humano, analisando rapidamente os ingredientes alimentares, fornecendo resultados precisos em pouco tempo, servindo como uma ferramenta de rápida triagem. Na prática, qualquer método *in vitro* inevitavelmente não corresponde à precisão e alcance dos estudos de alimentos *in vivo* devido à complexidade inerente ao processo digestivo humano (Hur *et al.*, 2011). A natureza altamente complexa do trato gastrointestinal humano limita a capacidade de recriar todas as suas funções em um modelo *in vitro*. No entanto, muitos aspectos da digestão luminal podem ser reproduzidos usando informações confiáveis e detalhadas que podem ser encontradas na literatura científica (Shani-Levi *et al.*, 2017).

Nos últimos 10 anos, o número de estudos disponíveis na literatura para a busca por determinação de minerais na matriz fórmula infantil e estudos de bioacessibilidade de minerais são altos (PubMed: 139 artigos para “mineral in infant formula” e 229 artigos “mineral bioaccessibility”, em 01/12/2019). Porém, ao especificar na busca “estudos de bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade de minerais na matriz fórmula infantil”, o número de estudo encontrado foi significativamente menor (20 artigos). A Tabela 4 apresenta os estudos encontrados e, em geral, os métodos *in vitro* que envolvem uma digestão gastrointestinal simulada com pepsina durante a etapa gástrica, seguida pela etapa intestinal com pancreatina e sais biliares para a determinação das frações solúvel e dialisada de Ca, Cu, Fe e Zn.

Como referência, o estudo de Miller *et al.* (1981) com adaptações, é o mais citado e a maioria das adaptações são referentes ao volume de enzimas e sais biliares adicionados durante a digestão intestinal. Dos 20 estudos apresentados na Tabela 4, envolvendo bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade de minerais em fórmula infantil, apenas dois, Do Nascimento da Silva *et al.* (2013) e Gomez, Perez-Corona & Madrid (2016), descreveram a etapa oral.

Tabela 4. Estudos envolvendo modelos *in vitro* para determinação de minerais em fórmula infantil.

Referencia	Elemento estudado	Método	Método adaptado de	Amostra	Enzimas	Técnica*	MWCO**
Aly <i>et al.</i> , 2016	Fe	Solubilidade e célula Caco-2	Miller <i>et al.</i> , 1981; Bosscher <i>et al.</i> , 2001; Jovaní <i>et al.</i> , 2001; Frontela <i>et al.</i> , 2008; Perales <i>et al.</i> , 2005	Amostras preparadas em laboratório - FI usada como base para as preparações.	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	-
Bermejo <i>et al.</i> , 2002	Fe e Zn	Solubilidade	Lonnerdal <i>et al.</i> , 1993	Leite materno; 12 FI comerciais (0-6 meses)	Pepsina, pancreatina	AAS	-
Bosscher <i>et al.</i> , 2001	Ca, Fe e Zn	Dialisabilidade (dialise em fluxo contínuo)	Bosscher <i>et al.</i> , 1998	Leite materno; IF preparadas em Laboratório (0-6 meses)	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS	Membrana: 1 kDa.
Bosscher <i>et al.</i> , 2003	Ca, Fe e Zn	Dialisabilidade (dialise em fluxo contínuo)	Bosscher <i>et al.</i> , 2000	Leite materno; IF padrão e especiais (com espessante)	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS	Tubo: 10 to 12 kDa; Membrana: 1 kDa
Do Nascimento da Silva <i>et al.</i> , 2013	Cu, Fe, Mn e Zn	Solubilidade	Versantvoortetal <i>et al.</i> , 2005; Versantvoortetal <i>et al.</i> , 2004 (revisão de 1998)	Matrizes variadas (misturas de farinha; comida a base de carne e vegetais); material de referência certificado FI	α -amilase, Pepsina, pancreatina e sal biliar; Ureia; Glucose; mucina; alumina	ICP-MS	-
Domínguez <i>et al.</i> , 2004	Cu, Fe e Zn	Dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981; Lonnerdal <i>et al.</i> , 1993	FI (0-6 meses) modificada em laboratório com diferentes tipos de sais de Fe	Pepsina e pancreatina	ICP OES	Membrana: 1 kDa

Referencia	Elemento estudado	Método	Método adaptado de	Amostra	Enzimas	Técnica*	MWCO**
Drago & Valencia, 2004	Ca, Fe e Zn	Dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981; Wolfgor <i>et al.</i> , 2002	FI preparada em laboratório	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS	Tubo: 6-8 kDa
Frontela <i>et al.</i> , 2008	Ca, Fe e Zn	Solubilidade e dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981	Cereal infantil reconstituído em FI ou água	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS	Membrana: 12 kDa
García <i>et al.</i> , 1998	Fe, Cu e Zn	Dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981; Luten <i>et al.</i> , 1996	6 tipos diferentes de FI comerciais (n=18)	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS; ETAAS; Espectroscopia UV/visível	-
Glahn <i>et al.</i> , 1998	Fe	Célula Caco-2	-	Leite materno; IF padrão	Pepsina, pancreatina e sal biliar	⁵⁹ Fe em um contador gama automático	-
Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016	Zn	Solubilidade e Dialisabilidade	Alzate <i>et al.</i> , 2010; Moreda-Piñeiro <i>et al.</i> , 2012	6 diferentes tipos de FI comercial	α-amilase, Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS; Espectroscopia UV/visível e ICP-MS	Membrana: 12 kDa
Jovaní <i>et al.</i> , 2000	Ca, Cu, Fe e Zn	Dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981; Luten <i>et al.</i> , 1996	8 diferentes FI comercial	Pepsina, pancreatina e sal biliar	FAAS; ETAAS	-
Jovaní <i>et al.</i> , 2001	Ca, Fe e Zn	Solubilidade, dialisabilidade e célula Caco-2	Miller <i>et al.</i> , 1981	3 FI especiais comerciais	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	Membrana: 10-12 kDa
Judprasong <i>et al.</i> , 2005	Ca, Fe, Mg, P e Zn	Dialise em fluxo contínuo (método CPF)	Miller <i>et al.</i> , 1981	Matriz variadas (Leite, couve, arroz, feijão, carne de frango); material de referência certificado FI	Pepsina, pancreatina e sal biliar	ICP OES	Membrana: 12-14 kDa

Referencia	Elemento estudado	Método	Método adaptado de	Amostra	Enzimas	Técnica*	MWCO**
Laparra, Barberá, & Farré, 2005	Ca, Fe e Zn	Solubilidade e célula Caco-2	Jovaní <i>et al.</i> , 2001	FI adaptada em laboratório	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	-
Peña <i>et al.</i> , 2004	Cu	Solubilidade	Lönnnerdal <i>et al.</i> , 1993	Leite materno; 1 FI comercial	Pepsina, pancreatina	ETAAS	-
Perales <i>et al.</i> , 2005	Ca	Solubilidade, dialisabilidade e célula Caco-2	Jovani <i>et al.</i> , 2004; Bosscher <i>et al.</i> , 2001	9 tipos refeições, entre elas 2 FI adaptadas; 2 FI follow-up	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	Membrana: 10-12 kDa
Perales <i>et al.</i> , 2007	Fe	Solubilidade, dialisabilidade e célula Caco-2	Perales <i>et al.</i> , 2005	Amostras modificadas em laboratório, entre elas 2 FI adaptadas; 2 follow-up, 2 toddler	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	Membrana: 10-12 kDa
Roig <i>et al.</i> , 1999	Ca	Solubilidade e dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981; Luten <i>et al.</i> , 1996	Leite materno; leite de vaca integral, 2 FI comercial	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	Membrana: 10-12 kDa
Sarriá & Vaqueiro, 2004	Fe e Zn	Solubilidade e dialisabilidade	Miller <i>et al.</i> , 1981 Pérez-Granados <i>et al.</i> , 2000	FI comercial em pó e líquida	Pepsina, pancreatina e sal biliar	AAS	Membrana: 10-12 kDa

* **AAS e FAAS**: Espectrometria de absorção atômica com chama; **ICP-MS**: Espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo; **ICP OES**: Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente; **ETAAS**: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. ****MWCO**: Membrana de diálise de peso molecular de corte definido, do inglês *Molecular Weight Cut Off*

Todos os estudos presentes na Tabela 4 citam fórmula infantil e método *in vitro*, contudo nem todos realizaram a avaliação da bioacessibilidade dos elementos nesta matriz. Os estudos de Do Nascimento da Silva *et al.* (2013) e Judprasong *et al.* (2005) avaliaram a solubilidade do Cu, Fe Mn e Zn e a dialise em fluxo contínuo do Ca, Fe, Mg, P e Zn, respectivamente, em diferentes matrizes e em materiais de referências certificados de fórmula infantil. Enquanto outros estudos focaram em características específicas avaliando a bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos elementos em amostras modificadas em laboratório (Bosscher *et al.*, 2001; Bosscher *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2004; Drago & Valencia, 2004; Laparra, Barberá & Farré, 2005; Perales *et al.*, 2007; Frontela *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2016).

O Ca, Fe e Zn presente nas fórmulas infantis são os elementos mais estudados quanto sua solubilidade, dialisabilidade em fórmulas infantis (García *et al.*, 1998; Roig *et al.*, 1999; Jovaní *et al.*, 2000; Jovaní *et al.*, 2001; Bermejo *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2004; Sarriá & Vaqueiro, 2004; Perales *et al.*, 2005; Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016). O Cu foi avaliado quanto sua bioacessibilidade nos estudos de García *et al.* (1998) e de Jovaní *et al.* (2000), enquanto Peña *et al.* (2004) desenvolveram um método para determinar sua solubilidade. No melhor do nosso conhecimento, não foram encontrados estudos reportando a bioacessibilidade ou biodisponibilidade dos elementos K, Mn, Mg, P em fórmula infantil.

Dentre os alimentos mais estudados aplicando métodos *in vitro* para avaliação da bioacessibilidade, destacam-se as hortaliças (26%), os laticínios (23%), os produtos de panificação (17%), os produtos cárneos (13%), alimentos marinhos (12%) e os alimentos à base de ovos (7%) (Lucas-González *et al.*, 2018). Estes estudos são importantes para auxiliar na identificação de matrizes alimentares promissoras para a bioacessibilidade e/ou das condições de processamento, colheita de grãos e seu impacto na biodisponibilidade de nutrientes (Etcheverry, Grusak & Fleige, 2012).

Um exemplo da importância de se conhecer o comportamento da matriz e suas variações nos alimentos é o estudo realizado por Gomez, Perez-Corona & Madrid (2016) que compararam a solubilidade e a dialisabilidade do Zn em

diferentes fórmulas infantis comercializadas na Espanha. De acordo com os autores, a fração de Zn solúvel encontrada (de 30 a 70%) são superiores as porcentagens da literatura para o leite de vaca (de 15 a 20%). Isto sugere que tanto a suplementação das fórmulas com sais de Zn quanto os tratamentos tecnológicos utilizados para melhorar a digestibilidade favoreceram a solubilidade do Zn nas amostras estudadas. Porém, a porcentagem de Zn nas frações dialisadas foram baixas (11% ou menos) e semelhantes às outros estudos com mesmo tipo de amostra.

Atualmente, ainda há uma escassez de informações abrangentes sobre a biodisponibilidade mineral dos alimentos em geral, demandando maiores esforços para entendermos a real influência dos diversos ingredientes na absorção dos nutrientes em alimentos voltados para grupos específicos. Um exemplo na evolução dos alimentos é o sucesso demonstrado no desenvolvimento de fórmulas infantis, onde os modelos de digestão *in vitro* ajudaram a proporcionar um significativo avanço tecnológico e ainda apresenta potencial quanto à melhoria do produto conforme as condições gastrointestinais específicas dos lactentes são melhores compreendidas e reproduzidas (Shani-Levi *et al.*, 2017).

Estes avanços tecnológicos ficam evidentes no estudo realizado por Aly *et al.* (2016) que teve como objetivo avaliar a funcionalidade da lactoferrina humana recombinante (rhLf – obtida de arroz transgênico) e Galactooligossacarídeos (GOS) quanto seus efeitos na biodisponibilidade do Fe em fórmula infantil, e determinar uma concentração adequada de ambos os ingredientes funcionais na formação de ferritina. Com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade e células Caco-2, os autores concluíram que o rhLf e o GOS são componentes possivelmente adequados para serem incluídos nas fórmulas infantis, com o objetivo principal de aumentar a biodisponibilidade do Fe (de 5 a 7,5 vezes), o que proporcionará uma melhora no desenvolvimento do lactente e, ao mesmo tempo, trata-se de mais um passo para aproximar a fórmula infantil ao leite materno maduro.

O leite materno fornece nutrientes em formas prontamente biodisponíveis que garantem o crescimento e desenvolvimento ideais da criança, além de conter uma variedade de proteínas bioativas, lipídios e oligossacarídeos que desempenham papéis não nutricionais (Donovan, 2019). A Lactoferrina e

Galactooligossacarídeos são bioativos presentes naturalmente no leite humano e, com a constante evolução da indústria de fórmulas infantis, cada vez mais estas classes de ingredientes estão sendo estudadas e adicionadas as fórmulas devido seu amplo espectro de funcionalidade relacionada ao desenvolvimento e manutenção da saúde da criança, incluindo a melhoria da absorção de minerais. Porém, ainda faz-se necessários mais pesquisas para avaliar o comportamento do rhLf na fórmula e validar estudos *in vivo* (Aly *et al.*, 2016).

Os modelos de digestão *in vitro* simulando o sistema gastrointestinal infantil estão aumentando sua aplicabilidade à pesquisa de alimentos, contudo, devido às variações e discrepâncias encontradas nestes modelos ainda há a necessidade de esforços para definir um modelo estático de digestão simples, harmonizado e de consenso, bem como modelos dinâmicos sofisticados (Brodkorb *et al.*, 2019; Ménard *et al.*, 2018).

Na literatura é relatado que o sistema gastrointestinal de bebês saudáveis a termo não produzem as mesmas enzimas digestivas que uma criança ou um adulto, sendo que a digestão do leite materno é facilitada pela presença de enzimas no próprio leite (amilase e lipase) (Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016). Além de as condições de digestão enzimática (tipo de enzimas e nível de atividade) e não enzimática (dieta à base de leite, frequência de alimentação, concentrações de sal biliar) em lactentes serem significativamente diferentes das condições em adultos, existe a variabilidade interindividual e de desenvolvimento (Bourlieu *et al.*, 2014). A Figura 6 apresenta um resumo da fisiologia digestiva de lactentes em desenvolvimento, apontando as principais diferenças em relação ao sistema adulto, baseado no estudo de Shani-Levi *et al.* (2017).

Conforme Bourlieu *et al.* (2014), em geral, as escolhas dos parâmetros para realização dos modelos *in vitro* do sistema gastrointestinal de lactentes não são suportadas por uma análise exaustiva da literatura e não transcrevem precisamente as condições digestivas de bebês a termo ou pré-termo. Concentrando-se em modelos *in vitro* estáticos para digestão aplicados a proteínas e lipídios, o grupo INFOGEST observa discrepâncias quanto pH gástrico, atividade proteolítica enzimática e variação da duração dos experimentos (Brodkorb *et al.*, 2019).

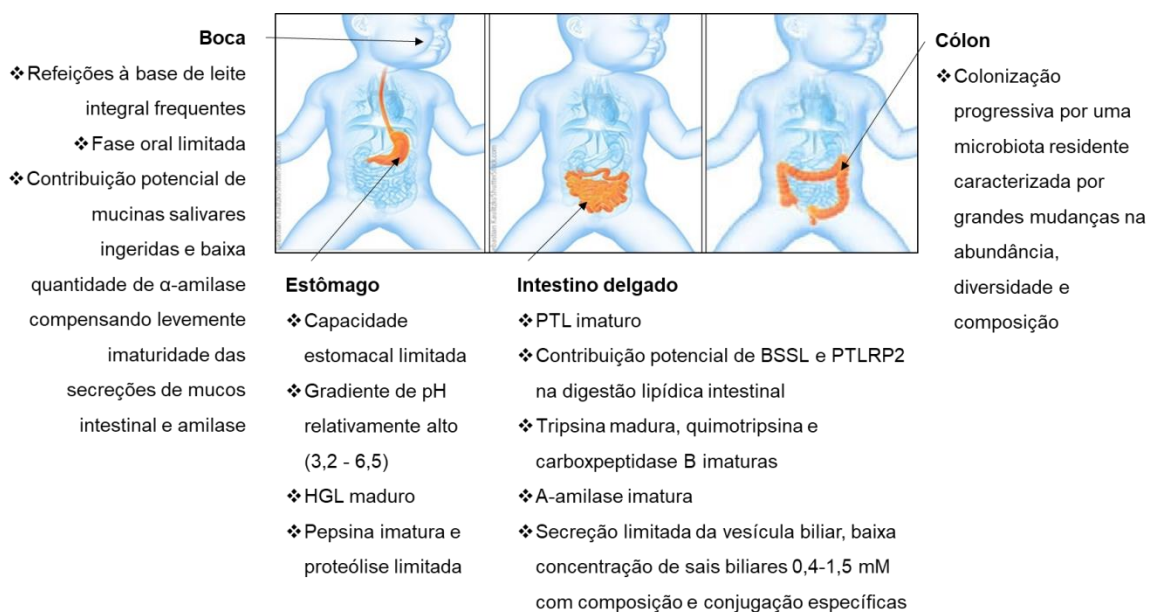


Figura 6. Resumo da fisiologia digestiva em desenvolvimento em Lactente. HGL - Lipase gástrica humana, PTL - lipase de triglicerídeos pancreático, BSSL - lipase estimulada por sais biliares, PTLRP2 - proteína lipase de triglicerídeos pancreático - relacionada a proteína 2, baseada no trabalho de Shani-Levi *et al.* (2017).

Sem a padronização de métodos de digestão, torna-se difícil relacionar e comparar os resultados de diferentes laboratórios. Laparra, Barberá & Farré (2005), evidenciaram a influência que a quantidade de enzima adicionada durante a simulação da digestão pode exercer no resultado da fração solúvel, sendo encontrada uma variação particularmente notória na porcentagem solúvel do Ca (variando de 18,2 a 98,6%) e uma menor influencia para o Zn (56,7% a 98,4%) e para o Fe (70,6% a 98,1%).

O modelo *in vitro* estático padronizado por Minekus *et al.* (2014), revisado em 2019 pela rede INFOGEST, conseguiu estabelecer um consenso internacional para mimetizar a digestão de adultos, tendo como um dos principais resultados um conjunto de parâmetros de digestão adequada para alimentação. O método descrito tem sido utilizado para avaliar a liberação de carotenoides, compostos fenólicos, digestão de proteínas, lipídeos e amidos em alimentos ou ingredientes modificados (Brodkorb *et al.*, 2019). Apesar da recente publicação de Ménard *et al.* (2018), não existe um modelo harmonizado fisiologicamente relevante de digestão *in vitro* para lactentes. Um dos maiores desafios a respeito desta padronização é a clara noção da importância em definir o consumidor alvo, pois

os parâmetros digestivos são altamente afetados pela idade gestacional e pós-natal do lactente (Shani-Levi *et al.*, 2017). Como vários parâmetros digestivos são influenciados pela idade pós-natal, parece razoável afirmar que não existe um único modelo digestivo infantil, mas vários modelos, dependendo da idade pós-natal. Devendo ser desenvolvido com uma lógica semelhante à aplicada pela indústria de fórmula infantil, ou seja, com foco na população alva específica e definida, como estágio 1 de 0-3 meses e estágio 2 de 3-6 meses, etc.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegria-Torán, A., Barbera-Sáez, R., & Cilla-Tatay A. (2015). Bioavailability of minerals in foods. In John Wiley & Sons (Ed.). Handbook of Mineral Elements in Food, chapter 3, 41–67. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1
- Aly, E., López-Nicolás, R., Darwish, A. A., Frontela-Saseta, C., & Ros-Berruezo, G. (2016). Supplementation of infant formula with recombinant human lactoferrin and/or galactooligosaccharides increases iron bioaccessibility as measured by ferritin formed in Caco-2 cell model. Food Research International, 89, 1048–1055. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.030
- Alzate, A., Pérez-Conde, M. C., Gutiérrez, A. M., & Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. International Dairy Journal, 20(11), 761–769. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.05.007.
- Angel de la Fuente M., & Juárez M. (2015). Milk and dairy products. In John Wiley & Sons (Ed.). Handbook of Mineral Elements in Food, chapter 28, 645–668. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Bağdat S., Köse Baran E., & Tokay F. (2013). Element fractionation analysis for infant formula and food additives by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. International Journal of Food Science & Technology, 49(2), 392–398. doi: 10.1111/ijfs.12312
- Barciela-Alonso, M. C, & Bermejo-Barrera, P. (2015). Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In John Wiley & Sons (Ed.).

- Handbook of Mineral Elements in Food, chapter 8, 163–176. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Bermejo, P., Peña, E. M., Domínguez, R., Bermejo, A., Cocho, J. A., & Fraga, J. M. (2002). Iron and zinc in hydrolised fractions of human milk and infant formula using an in vitro method. *Food Chemistry*, 77(3), 361–369. doi: 10.1016/s0308-8146(02)00111-5
- Bermejo-Barrera, P., Muñiz-Naveiro, Ó., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, A. (2001). The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 439(2), 211–227. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01043-1
- Boss, C. B., & Fredeen, K. J. (2004). Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, 3rd ed., 1-120.
- Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, & Deelstra H. (1998). Beschikbaarheid van nutriënten: Optimalisatie in vitro modellen voor kinderen jonger dan drie jaar. *Tijdschr Gastroenterol*, 36, 17–27
- Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Van Dyck K, et al. (2000). Thickening infant formula with digestible and indigestible carbohydrate: availability of calcium, iron, and zinc in vitro. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(4), 373-378 doi: 10.1097/00005176-200004000-00005
- Bosscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., Robberecht, H., Van Dyck, K., Van Cauwenbergh, R., & Deelstra, H. (2001). In Vitro Availability of Calcium, Iron, and Zinc from First-Age Infant Formulae and Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(1), 54–58. doi:10.1097/00005176-200101000-00016
- Bosscher D., Caillie-Bertrand M. V., Cauwenbergh R. V., & Deelstra H. (2003). Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formula is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition*, 19, (7/8), 641–645. doi: 10.1016/S0899-9007(03)00063-7
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2014). Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing Relevant In Vitro Models. *Critical Reviews in Food*

Science and Nutrition, 54(11), 1427–1457. doi: 10.1080/10408398.2011.640757

BRASIL (2009). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. II Pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e distrito federal. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2011a). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2011b). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2011c). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2011d). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2011e). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 46, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.

BRASIL (2015). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estratégia nacional para promoção do aleitamento materno e alimentação

- complementar saudável no sistema único de saúde: manual de implementação. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.
- Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Balance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, Clemente A, et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14:991-1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1
- Capelo, J. L., Maduro, C., & Vilhena, C. (2005). Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(3), 225–232. doi: 10.1016/j.ultsonch.2003.10.010
- Carvalho D. C., Coelho L. M., Acevedo M. S. M. S. F., & Nívia M.M. Coelho N. M. (2015). The oligoelements. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, chapter 5, 109–122. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1
- Cava-Montesinos P., Cervera M. L., Pastor A., & de la Guardia, M. (2005). Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Analytica Chimica Acta*, 531(1), 111–123. doi:10.1016/j.aca.2004.09.093
- Chen D., Zong J., Huang Z., Liu J., & Li Q. (2018). Real-Time Analysis of Potassium in Infant Formula Powder by Data-Driven Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Frontiers in Chemistry*, 6(325), 1-8. doi: 10.3389/fchem.2018.00325
- Cozzolino, S. M. F. (2007). *Biodisponibilidade de Nutrientes*, 2^a ed., Barueri: Manole, SP.
- Cruz, G.C., Din, Z., Feri, C.D., Balaoing, A.M., Gonzales, E.M., Navidad, H.M., Schlaaff, M.M.F., & Winter, J. (2009). Analysis of Toxic Heavy Metals (Arsenic, Lead and Mercury) In Selected Infant Formula Milk Commercially Available In the Philippines by AAS. *E-International Scientific Research Journal*, 1(1), 40-50.
- De Lima A. C. S., Soares D. J., da Silva L. M. R., de Figueiredo R. W., de Sousa P. H. M., & de Abreu Menezes E. (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and

- cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 161, 142–147. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.123
- Do Nascimento da Silva, E., Leme, A. B. P., Cidade, M., & Cadore, S. (2013). Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. *Talanta*, 117, 184–188. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.008
- Domínguez, R., Barreiro, T., Sousa, E., Bermejo, A., Cocho, J. A., Fraga, J. M., & Bermejo, P. (2004). Study of the effect of different iron salts used to fortify infant formulas on the bioavailability of trace elements using ICP-OES. *International Dairy Journal*, 14(12), 1081–1087. doi:10.1016/j.idairyj.2004.03.011
- Dominguez-González, M. R., & Bermejo-Barrera P. (2015). Human milk. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, chapter 33, 725–747. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Donovan, S. M. (2019). Human milk proteins: composition and physiological significance. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 90, 93–101. doi: 10.1159/000490298
- Drago, S. R., & Valencia, M. E. (2004). Influence of Components of Infant Formulas on in Vitro Iron, Zinc, and Calcium Availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3202–3207. doi:10.1021/jf035191e
- Dubascoux S., Andrey D., Vigo M., Kastenmayer P., & Poitevin E. (2018). Validation of a dilute and shoot method for quantification of 12 elements by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry in human milk and in cow milk preparations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 4, 19–26. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.023
- Erdogan, S., Aydin, I., Duz, M. Z., Aydin, F., Çelik, K. S., Akba, O., & Hamamci, C. (2015). Simultaneous Multielement Determination of Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, and Zn in Bulgur Wheat by ICP-OES. *Atomic Spectroscopy*, 36, (5), 210-215.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3 (317), 1-22. doi: 10.3389/fphys.2012.00317

- European Commission (2006). DIRECTIVA 2006/141/CE DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2006, relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição e que altera a Directiva 1999/21/CE. Jornal Oficial da União Europeia, L401, 3–33.
- FAO/WHO (2016). Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. Codex Stan 72 – 1981. Revision: 2007, 2016.
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (1985). Part 107 Infant Formula, Subpart D – 107.100 - Nutrient Requerimentos. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=107.10>. Acesso em: 01/10/2019
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (2014). Guidance for Industry: Demonstration of the Quality Factor Requirements Under 21 CFR 106.96 (i) for “Eligible” Infant Formulas. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. doi: 10.1016/j.nutres.2009.09.016
- Fernández-Palacios, L., Ros-Berruezo, G., Barrientos-Augustinus, E., De Caballero E. J., & Frontela-Saseta C. (2017). Aporte de hierro y zinc bioaccesible a la dieta de niños hondureños menores de 24 meses. *Nutrición hospitalaria*, 34, 290-300. doi: 10.20960/nh.1161
- Freitas, P. C., Carvalho, R. M., Silva, J. S. A., Prado, T., Duarte, E. R. Frescura, V. L. A., & Chaves, E. S. (2015). Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. *Química Nova*, 38(4), 570-574. doi: 10.5935/0100-4042.20150021
- Frontela, C., Haro, J. F., Ros, G., & Martínez, C. (2008). Effect of dephytinization and follow-on formula addition on in vitro iron, calcium, and zinc availability from infant cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3805–3811. doi: 10.1021/jf073424m
- García, R., Alegría, A., Barberá, R., Farre, R., & Lagarda, M. J. (1998). Dialyzability of iron, zinc, and copper of different types of infant formulas marketed in Spain. *Biological Trace Element Research*, 65 (1), 7–17.

- Giné, M. F. (1998). Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente. Piracicaba: CENA. Série Didática, v. 3.
- Glahn, R. P., Lai, C., Hsu, J., Thompson, J. F., Guo, M., & Van Campen, D. R. (1998). Decreased Citrate Improves Iron Availability from Infant Formula: Application of an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *The Journal of Nutrition*, 128(2), 257–264. doi:10.1093/jn/128.2.257
- Gomez, B. G., Perez-Corona, M. T., & Madrid, Y. (2016). Availability of zinc from infant formula by in vitro methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9405–9414. doi: 10.3168/jds.2016-11405
- González-Bermúdez, C. A., Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., Ros-Berruezo, G., & Martínez-Graciá, C. (2014). Effect of adding different thickening agents on the viscosity properties and in vitro mineral availability of infant formula. *Food Chemistry*, 159, 5–11. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.168
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro human digestion models for food applications*. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- Insights - Global Market Insights (2019). Global Baby Food Market Size worth over \$33bn by 2025 <https://www.gminsights.com/pressrelease/baby-food-market>. Acesso em: 20/09/2019
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 1º edição digital. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentos_2008.pdf. Acesso em: 20/09/2019.
- Jovaní, M., Alegría A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M. J., & Clemente G. (2000). Effect of proteins, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. *Nahrung*, 2, 114-117.
- Jovaní, M., Barberá, R., Farré, R., & Martín de Aguilera, E. (2001). Calcium, Iron, and Zinc Uptake from Digests of Infant Formulas by Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3480–3485. doi:10.1021/jf010106t

- Judprasong, K., Ornthai, M., Siripinyanond, A., & Shiowatana, J. (2005). A continuous-flow dialysis system with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for in vitro estimation of bioavailability. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(11), 1191. doi:10.1039/b508639f
- Koletzko, B., Shamir, R., & Ashwell, M. (2012). Quality and safety aspects of infant nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60(3), 179–184. doi: 10.1159/000338803.
- Krug, F. J. (2010). Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1º ed. rev., Piracicaba.
- Laparra, J. M., Barberá, R., & Farré, R. (2005). Effect of Enzyme Amounts Used in Gastrointestinal Digestion Upon Solubility and Caco-2 Cell Uptake Assays of Minerals from Infant Formulas. *Food Science and Technology International*, 11(6), 425–431. doi: 10.1177/1082013205060195
- Lesniewicz, A., Wroz, A., Wojcik, A., & Zyrnicki, W. (2010). Mineral and nutritional analysis of Polish infant formulas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 424–431. doi: 10.1016/j.jfca.2010.02.005
- Lobo, A. S., & Tramonte, V. L. C. (2004). Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Revista de Nutrição*, 17(1), 107-113.
- Lönnerdal, B., Yuen, M., Glazier, C., & Litov, R. E. (1993). Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), 392–397. doi:10.1093/ajcn/58.3.392
- Lönnerdal, B., & Hernell, O. (2016). An opinion on “Staging” of infant formula: A developmental perspective on infant feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(1), 9–21. doi: 10.1097/MPG.0000000000000806
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423–436. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.055

- Luten, J., Crews, H., Flynn, A., Van Dael, P., Kastenmayer, P., Hurrell, R., Deelstra, H., Shen, L., Fairweather-Tait, S., Hickson, K., Farré, R., Schlemmer, U., & Frohlich, W. (1996). Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialyzability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(4), 415-424.
- Machado, I., Bergmann, G., & Pistón, M. (2016). A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chemistry*, 194, 373–376. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.027
- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 1–11. doi: 10.3390/nu8050279
- Martínez, L. D., Gil, R. A., Pacheco, P. H., & Cerutti, S. (2015). Elemental composition analysis of food by FAES and ICP OES. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, chapter 11, 219-238. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1
- Martínez, M. A., Castro, I., Rovira, J., Ares, S., Rodríguez, J. M., Cunha, S. C., Casal, S., Fernandes, J. O., Schuhmacher, M., & Nadal, M. (2018). Early-life intake of major trace elements, bisphenol A, tetrabromobisphenol A and fatty acids: Comparing human milk and commercial infant formulas. *Environmental Research*, 1-37. doi: 10.1016/j.envres.2018.11.017
- Ménard, O., Bourlieu, C., De Oliveira, S. C., Dellarosa, N., Laghi, L., Carrière, F., Capozzi, F., Dupont, D., & Deglaire, A. (2018). A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry*, 240, 338–345. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.145
- Miller, D. D., Schicker, B. R., Rasmussen, R. R., Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34: 2248-2256
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., et al (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5:1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j

- Mir-Marqués, A., Cervera, M. L., & La Guardia, M. (2015). Baby foods. In John Wiley & Sons (Ed.). Handbook of Mineral Elements in Food, chapter 32, 709-723. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1
- Moreda–Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., Romarís-Hortas, V., Moreda-Piñeiro, A., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., & Bermejo-Barrera, P. (2012). Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples. Food Chemistry, 130(3), 552–560. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.071
- Moreira, L.C., Oliveira, E.B., Lopes, L.H., Bauleo, M.E., & Sarno, F. (2019). Introdução de alimentos complementares em lactentes. Einstein (São Paulo), 17(3), 1-6. doi: 10.31744/einstein_journal/2019AO4412
- Morgano, M. A., Souza, L. A., Neto, J. M., & Rondó, P. H. C. (2005). Composição mineral do leite materno de banco de leite. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25(4), 819-824
- National Academy Press (U.S.) (1989). Recommended dietary allowances / Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board, Division of Biological Sciences, Assembly of Life Sciences, 10th rev, Washington. ISBN 0-309-04633-5
- Oh, M. S. U. (1999). Electrolytes, water, and acid-base balance. In: Shils, M.E; Olson, J.A.; Shire, M.; Ross, A.C. Modern Nutrition in health and diseases. 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 105-39, 1999
- Pacquette, L. H., Szabo, A., Thompson, J. J., & Baugh, S. (2012). Application of Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry for the Measurement of Chromium, Selenium, and Molybdenum in Infant Formula and Adult Nutritional Products: First Action 2011.19. Journal of AOAC International, 95(3), 588–598. doi:10.5740/jaoacint.cs2011_19
- Padovani, R. M, Amaya-Farfán, J., Colugnati, F. A. B., & Domene, S. M. A. (2006). Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. Revista de Nutrição, 19 (6), 741-760. doi: 10.1590/S1415-52732006000600010
- Pandelova, M., Lopez, W. L., Michalke, B., & Schramm, K.-W. (2012). Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for

- minerals and trace elements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(2), 120–127. doi:10.1016/j.jfca.2012.04.011
- Peña, E., Domínguez, R., Bermejo, A., Cocho, J. A., Fraga, J. M., & Bermejo, P. (2004). Enzymolysis approach to compare cu availability from human milk and infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4887–4892. doi:10.1021/jf030781y
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. J., & Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3721–3726. doi:10.1021/jf047977y
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. J., & Farré, R. (2007). Availability of iron from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialysability) and uptake and transport by Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 102(4), 1296–1303. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.019
- Pérez-Granados, A. M., Vaquero, M. P., & Navarro, M. P. (2000). Calcium and phosphorus bioavailability in rats consuming oil from either raw sardines or sardines fried in olive oil. *Food Science and Technology International*, 6(5), 387–397. doi:10.1177/108201320000600505
- Poitevin, E. (2016). Official methods for the determination of minerals and trace elements in infant formula and milk products: A review. *Journal of AOAC International*, 99 (1), 42-52. doi: 10.5740/jaoacint.15-0246
- Porova, N., Botvinnikova, V., Krasulya, O., Cherepanov, P., & Potoroko, I. (2014). Effect of ultrasonic treatment on heavy metal decontamination in milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2107–2111. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.03.029
- Quinn, E. A. (2013). Too much of a good thing: Evolutionary perspectives on infant formula fortification in the United States and its effects on infant health. *American Journal of Human Biology*, 26(1), 10–17. doi:10.3389/fnut.2019.00120

- Quintaes, K. D., & Diez-Garcia, R. W. (2015). The importance of minerals in the human diet. In John Wiley & Sons (Ed.). Handbook of Mineral Elements in Food, chapter 1, 01–21. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Rigo J., & Senterre, J. (2006). Nutritional needs of premature infants: Current Issues. The Journal of Pediatrics, 149(5), S80–S88. doi: 10.1016/j.jpeds.2006.06.057
- Rodríguez Rodríguez, E. M., Alaejos, M. S., & Romero, C. D. (2000). Concentrations of iron, copper and zinc in human milk and powdered infant formula. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 51,373–380.
- Roig, M. J., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Lagarda, M.J. (1999). Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas - comparison between dialysis and solubility methods. Food Chemistry, 65, 353-357
- Sager, M., McCulloch, C. R., & Schoder, D. (2018). Heavy metal content and element analysis of infant formula and milk powder samples purchased on the Tanzanian market: International branded versus black market products. Food Chemistry, 255, 365–371. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.058
- Sandberg, A.-S. (2005). Methods and Options for in vitro Dialyzability; Benefits and Limitations. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 75(6), 395–404. doi:10.1024/0300-9831.75.6.395
- Sandström, B. (2001). Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. British Journal of Nutrition, 85(S2), S181-S185. doi:10.1049/bjn2000312
- Sarriá, B., & Vaquero, M. P. (2001). Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. The Journal of Nutritional Biochemistry, 12(5), 266–273. doi: 10.1016/s0955-2863(01)00138-3
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Lesmes, U., *et al.* (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. Trends in Food Science & Technology, 60, 52–63. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.017
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2002). Princípios de análise instrumental. 5º ed. Porto Alegre: Bookman

- Souza, S. O., Costa, S. S. L., Brum, B. C. T., Santos, S. H., Garcia, C. A. B., & Araujo, R. G. O. (2018). Determination of nutrients in sugarcane juice using slurry sampling and detection by ICP OES. Food Chemistry. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.060
- Sun, D.H., Waters, J.K., & Mawhinney, T.P. (2000). Determination of Thirteen Common Elements in Food Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry: Comparison of Five Digestion Methods. Journal of AOAC International, 83(5), 1218-1224
- Vandenplas, Y., De Greef, E., Devreker, T., & Hauser, B. (2010). Soy infant formula: is it that bad? Acta Paediatrica, 100(2), 162-166. doi:10.1111/j.1651-2227.2010.02021.x
- Versantvoort, C. H. M., Van de Kamp, E., & Rompelberg, C. J. M. (2004). RIVM Report 320102002/2004: Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Disponível em: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320102002.pdf>. Acesso em: 01/12/2019
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. Food and Chemical Toxicology, 43(1), 31–40. doi:10.1016/j.fct.2004.08.007
- Vieira da Silva, S., Mattanna, P., Bizzi C. A., Richards, N. S. P. S, & Barin, J. S. (2013). Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. Journal of Dairy Science, 96(6) 3498–3505. doi: 10.3168/jds.2012-6268
- WHO (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva: World Health Organization
- WHO (2014). Comprehensive implementation plan on maternal, infant and young child nutrition. (Disponível em: http://www.who.int/nutrition/publications/CIP_document/en/). Acesso em: 20/09/2019
- Wolfgor, R., Drago, S. R., Rodriguez, V., Pellegrino, N. R., & Valencia, M. E. (2002). In vitro measurement of available iron in fortified foods. Food Research International, 35(1), 85–90. doi:10.1016/s0963-9969(01)00122-3

- Zou, L., Pande, G., & Akoh, C. C. (2016). Infant formula fat analogs and human milk fat: New focus on infant developmental needs. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 139–165. doi: 10.1146/annurev-food-041715-033120
- Zounr, R. A., Tuzen, M., Deligonul, N., & Khuhawar, M. Y. (2018). A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 253, 277–283. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.167

CAPÍTULO 2

Simple and fast ultrasound-assisted method for mineral content and bioaccessibility study in infant formula by ICP OES

Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti^{1,2}, Raquel Fernanda Milani², Esther Lima de Paiva^{2,3}, Marcelo Antônio Morgano^{2*}

1 - Adolfo Lutz Institute, Rua São Carlos, 720, Vila Industrial, Campinas, SP, 13035-420, Brazil

2 - Institute of Food Technology, Av. Brasil 2880, Jd. Chapadão, P.O. Box 139, Campinas, SP, 13070-178, Brazil

3 - School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

O artigo foi submetido à revista ***Food Analytical Methods***

Abstract

Infant formula (IF) constitutes the single source of mineral intake for infants whom are only fed with IF. The assurance of the amount of minerals declared on the label and the minerals levels and their chemical forms presents a major concern in order to provide a good nutrients absorption by these children. Thus, the main objectives of this study were to evaluate a simple and fast ultrasound-assisted method for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn determination in IF by ICP OES and to establish the optimum conditions of an *in vitro* method to study minerals dialyzability. The ultrasound-assisted method was shown to be conforming to “Green Chemistry” principles being simple, fast and presenting low cost comparing with reference methods. The results were within those obtained in reference methods (microwave-assisted acid digestion and dry ashing) with selectivity, sensitivity and linearity ($r^2 > 0.999$). The accuracy and the precision were verified using certified reference materials, with recoveries and coefficients of variation ranging from 91 to 105% and from 1.1 to 5.2%, respectively. For *in vitro* dialyzability assessment, the optimum conditions established in this study allows including an overnight step between gastric and gastrointestinal stages and a reduction in pancreatin-bile solution by six-fold factor (accuracy and precision ranging from 81 to 108% and 0.4 to 6.3%, respectively) – contributing to establish an *in vitro* digestion method concerning the infant gastrointestinal conditions.

Keywords: Infant formula; Minerals; Ultrasound-assisted extraction; *In vitro* digestion; ICP OES

1. Introduction

The first year of life is a critical period in the child development and an adequate nutrition is essential to ensure the healthy growth and its development of children (Mir-Marqués et al., 2015). Minerals deficiency can affect children development, causing dysfunctions that can affect their lives (Vieira da Silva et al., 2013). The nutritional state can be understood as the body condition after using the food nutrients, leading to an equilibrium between offer and assimilation and can be influenced by factors, such as sex and age of the individual (Quintaes and Diez-Garcia, 2015). Codex STAN 72 (2016) defines infant formula (IF) as “substitutes for mother’s milk, specially manufactured to satisfy alone the nutritional needs of babies during their first months of life, until the introduction of appropriate complementary food”. The nutritional safety and adequacy of IF should be scientifically demonstrated to support growth and development of infants (FAO/WHO, 2016).

Mineral and inorganic contaminants determination in IF is usually performed using microwave-assisted digestion and dry ashing (Sun et al., 2000; Machado et al., 2016; de Paiva et al., 2019). Ultrasound-assisted extraction stands out as an efficient alternative method, being simple, fast and with low cost than reference methods. Several studies were reported for milk, baby food, sugarcane juice and seafood analysis using this method (Bermejo-Barrera et al., 2001; Cava-Montesinos et al., 2005; Porova et al., 2014; Machado et al., 2016; Zounr et al., 2018; Souza et al., 2019). Although the mineral content determination in IF is important for the manufacturers and health authorities to guarantee the quality of their products, it is fundamental to evaluate if the levels of these elements are available for absorption for children fed with IF.

In vivo models can be expensive or difficult to undertake due to ethical questions (Brodkorb et al., 2019). Compared to these models, *in vitro* methods present the advantages of being faster, less expensive and with no ethical restrictions (Minekus et al., 2014). Such methods express the quantity of a nutrient freed from the matrix and considered available for absorption, estimating the nutrients percentages available for absorption (bioaccessible content) and for physiological functions (bioavailable content) (Etcheverry et al., 2012).

Nevertheless, more study and refined methods need to be developed for a better understanding of the digestive kinetics (Ménard et al., 2018). The *in vitro* digestion models for adults generally consider three main phases: oral, gastric and duodenal, and fundamentally simulate a set of conditions close to the physiological situation of the population under study. However, to better evaluate digestion in newborn infants (aged zero to six months), the oral phase is usually omitted, since a liquid milk-based meals has a limited residence time between food and oral cavity (Bourlieu et al., 2014). Ever since newborn infants present immature enzymatic and secretory functions during their first months of life, one must decrease the amounts of enzymes as compared to methods involving adults (Ménard et al., 2018; Minekus et al., 2014; Perales et al., 2005; Bourlieu et al., 2014). To the best of our knowledge, there is a lack in recent literature regarding *in vitro* digestion models which consider the amount of infant gastrointestinal enzymes.

Considering the importance of assuring the nutritional quality of the food during the first months of life, the main objectives of this study were to evaluate a simple and fast ultrasound-assisted method for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn determination in IF by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and to study variables for an *in vitro* digestion method to study minerals dialyzability considering infant gastrointestinal conditions.

2. Materials and methods

2.1. Reagents, solutions and samples

The water and nitric acid were purified using an osmosis reverse system (Gehaka, São Paulo, Brazil) with resistivity below 18.2 MΩ cm and by sub-boiling distilled acid (Distillacid, Berghof, Eningen, Germany), respectively. Hydrochloric acid 37% (m/v), hydrogen peroxide 30% (m/v) (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.45 µm filters (PTFE, Agilent Technologies, Brazil) were also employed in assay. Sodium bicarbonate, pepsin porcine gastric mucosa (enzyme activity of 250 U/mg,

catalog n° P7000), pancreatin from porcine pancreas (enzyme activity equivalent to 8 x USP specifications, catalog n° P7545), bile from bovine and ovine (bile acid mixture, catalog n° B8381) and dialysis bag with porosity of 25 Angstroms and cut-off of 12,000Da were all purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA. The following certified reference materials (CRM) were used to validate the proposed method: *Baby Food Composite* (NIST 2383a) and *Infant/ Adult Nutritional Formula* (NIST 1849a).

The analytical curves were prepared by successive dilutions of 100 mg L⁻¹ multielementar standard (Cu, Fe, Mn e Zn); 10,000 mg L⁻¹ P standard solutions (Specsol, Quimlab, Jacareí, Brazil) and 10,000 mg L⁻¹ Ca, Mg, K and Na standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany) in 5% (v/v) HCl.

IF from brands A, B, C & D (n=5) destined for 0 to 6 months children were acquired in local markets from Campinas (Brazil) and Santiago (Chile). Some samples were described as “IF for suckling infants” (BR-A, BR-B & BR-C); “IF with iron for suckling infants” (CH-C) and “soybean based IF for suckling infants” (BR-D).

2.2. Instrumentation

Minerals were determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP OES 5100 VDV, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) under optimized conditions (Table 1). An ultrasonic bath (Easy 180H, Elma, Singen, Germany), a closed microwave system (Start D, Milestone, Sorisole, Italy) and a muffle furnace (Fornitec, São Paulo, Brazil) were used to determine mineral contents in the samples. A shaking water bath (NT 230, Nova Tecnica, Piracicaba, Brazil) and a pH meter with a selective electrode (Starter 3100, Ohaus, Parsippany, USA) were used for the bioaccessibility assay.

Table 1. ICP OES operating conditions

ICP OES conditions			
Radio frequency generator (MHz)	27		
Radio frequency power (kW)	1.2		
Plasma view	Axial (Cu, Fe, Mn, Zn) and Radial (Ca, Na, P, K, Mg)		
Argon flows (plasma/auxiliary/nebulizer) rate (L min ⁻¹)	12 / 1.0 / 0.7 (<i>Seaspray</i>)		
Spray chamber	Quartz, double-pass		
Number of replicates	03		
	Wavelength (nm)	Analytical curves	
Ca (II); Na (I); P (I)	317.933, 589.592, 213.618	0.20 – 5.00	mg per 100mL
Cu (I); Fe (II); Mn (II); Zn (II)	324.754, 259.940, 257.610, 206.200	0.5 – 200	µg per 100mL
K (I)	766.491	0.20 – 10.00	mg per 100mL
Mg (II)	279.553	0.20 – 2.00	mg per 100mL

(I): atomic emission line; (II): ionic emission line

2.3. Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn determination

IF were prepared according to labels instructions (15 g IF was reconstituted in 100 mL purified water) and three sample digestion methods were evaluated: Method 1 (microwave-assisted digestion), Method 2 (ultrasound-assisted extraction) and Method 3 (dry ashing).

Method 1 - Acid digestion in a closed microwave-assisted system (based on Lima et al., 2014): 2 g of prepared IF was weighed in a PTFE vessel, added 8 mL of HNO₃ and allowed to react for approximately 15 minutes. 2 mL of H₂O₂ were added and the vessel was maintained closed overnight. The flasks were then sealed, transferred to the microwave system and 1,000 W power was applied at a maximum temperature of 170°C for 25 minutes. The solutions were transfer to graduated tubes using purified water to 25 mL final volume.

Method 2 - Ultrasound-assisted extraction (based on Cava-Montesinos et al. 2005, Machado et al., 2016 and Bermejo-Barrera et al., 2001): 2 g of prepared IF was weighed in 50 mL graduated tube and added 2 mL HNO₃ and 1 mL H₂O₂. The tube was closed and put into the ultrasonic bath for 30 minutes at 60°C. After cooling, the volume was completed to 25 mL with purified water and filtered.

Method 3 - Dry ashing (based on Cámara et al., 2005): 3.50 g of prepared IF were weighed in a platinum capsule, heated on an electric plate and incinerated in a muffle furnace at 450 °C until the organic matter was destroyed. After cooling, 3 mL of purified water and 1.25 mL of HCl were added and the content was carefully transferred to a graduated tube and completed to 25 mL with purified water.

Ultrasound-assisted method validation: CRM *Infant/Adult Nutritional Formula* (NIST 1849a) and the IF sample “BR-A” were used to validate the proposed method with respect to the merit parameters: accuracy, precision, selectivity (or matrix effect), linearity and limits of detection and quantification, considering the recommended by INMETRO (2018) and AOAC (2016).

2.4. In Vitro Digestion and Method evaluation

For *in vitro* digestion, the dialysis method described by Perales et al. (2005) was applied with modifications:

Gastric digestion: 15 g of prepared IF was weighed into a 250 mL Erlenmeyer, 30 mL of purified water added the flask was incubated at 37 °C for 15 minutes. The pH was adjusted to 2.0 ± 0.2 with 6 mol L⁻¹ (v/v) HCl, and measured after 15 minutes (readjusting, if necessary). An aliquot of 1.87 mL freshly prepared pepsin solution (0.16 g mL⁻¹) was added (0.02 g of pepsin/g of sample). The sample was made up to 100 g with purified water and incubated in a shaking water bath at 37 °C for 2 hours. After incubation, the sample was maintained overnight in a fridge at 8°C (Test A, performed in two different days) or kept in ice bath for 10 minutes (Test B). Five aliquots of 20 g of the gastric digest were then transferred to 250 mL Erlenmeyer. For Test C, similar procedure was considered using 3 g of IF with final solution made up to 20 g. In this case, no aliquots were used and all replicates were performed individually.

Determination of the titratable acidity: 0.75 mL of freshly pancreatin+bile solution (P+B), containing 0.004 g mL⁻¹ of pancreatin and 0.025 g

mL⁻¹ of bile extract (providing 0.00015 g of pancreatin and 0.00094 g of bile salts/g of sample) were added to an Erlenmeyer that containing 20g of the gastric digest. This mixture was titrated with a 1 mol L⁻¹ (v/v) NaHCO₃ to pH 7.2 ± 0.2. The titration volume was used in dialysis bag preparation. For Test “D”, 2.50 mL of freshly P+B solution was used.

Gastrointestinal digestion: In a dialysis bag (25 cm), purified water and the NaHCO₃ volume obtained in the titratable acidity was added to a total volume of 20 mL. The dialysis bag was placed in the gastric digestion solution and flasks were incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 minutes. Freshly P+B solution was added and flasks were incubated for to 2 hours. The dialysis bag content (dialyzed fraction) was transferred to a graduated tube, acidified with HCl to provide a 5% (m/v) solution and the minerals levels were determined by ICP OES.

Evaluation of the in vitro method: the *in vitro* method was analyzed with respect to the following merit parameters: selectivity (matrix effect), accuracy and precision, considering the recommendations and definitions established by INMETRO (2018) and AOAC (2016).

3. Statistical analyses

All the experiments were carried out with a minimum of three replicates and blanks experiments were also performed. The statistical analyses (Tukey's test) were carried out using the XLSTAT software (Addinsoft, France), considering a 95% confidence level.

4. Results and Discussion

4.1. Method evaluation and validation for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn contents in IF

For methods evaluation, CRM Baby Food Composite (NIST 2383a) was analyzed employing Methods 1 (microwave-assisted digestion), 2 (ultrasound-

assisted extraction) and 3 (dry ashing). In Figure 1, the results obtained in methods recovery (ratio, in percentage, between obtained and certified values) are presented. According to INMETRO (2018) and AOAC (2016), the recovery ranges can vary from 90% to 107% for Ca, Mg, Na and P; from 80% to 110% for Cu, Mg, Fe and Zn; and from 95% to 105% for K (according to the minerals levels). Method 2 presented results within these parameters for all the elements (88 to 102%) whereas Methods 1 and 3 presented results below the recovery range for Na ($86 \pm 2\%$) and for Zn ($74 \pm 7\%$), respectively. This behavior was also verified analyzing a real IF sample (Table 2): at the 95% significance, minerals levels did not differ significantly, except for Zn result using Method 3 (dry ashing). The differences found may be related to the variations of the methods themselves.

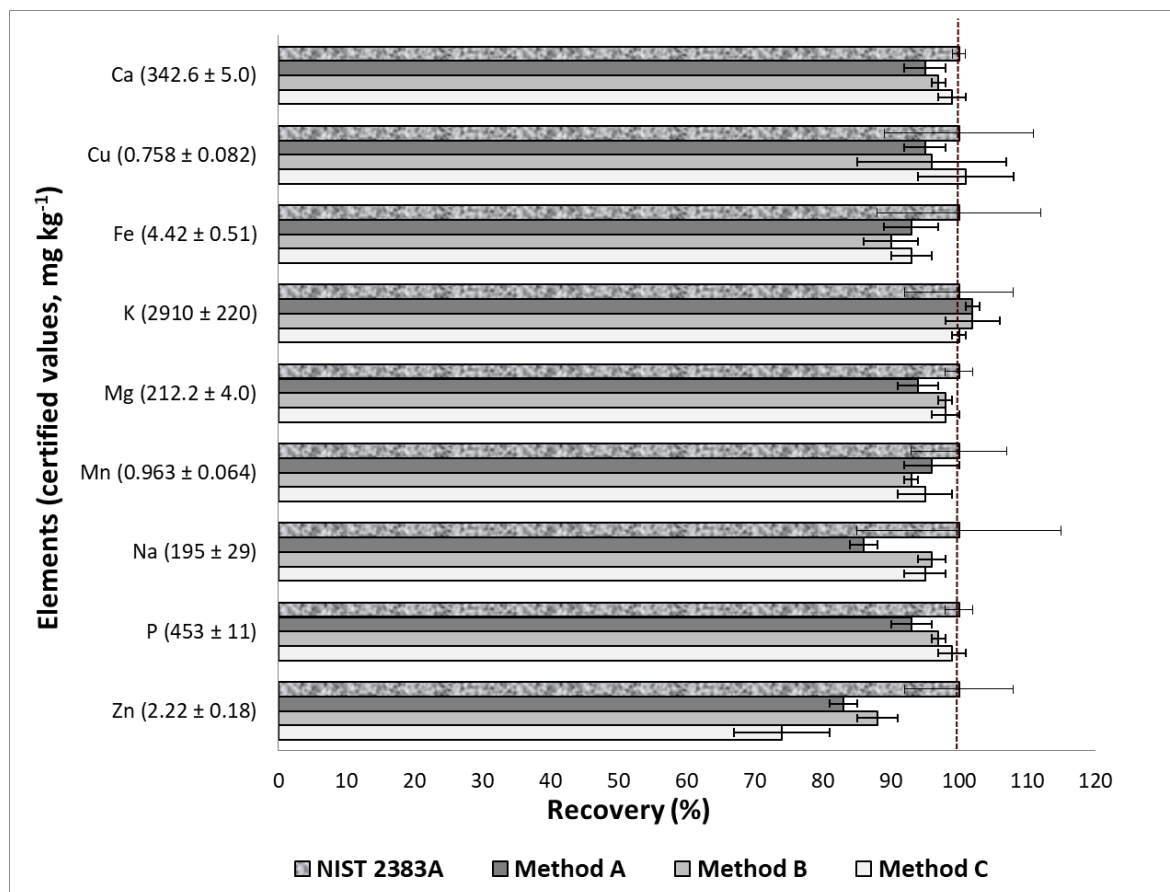


Figure 1. CRM Baby Food Composite (NIST 2383a) evaluation using Method 1 (Microwave-assisted digestion), Method 2 (Ultrasound-assisted extraction) and Method 3 (Dry ashing), n=8.

Table 2. Methods evaluation using a real infant formula sample (mean $\pm$ SD, n = 7).

Elements	Concentration (mg per 100mL)		
	Method 1 (Microwave-assisted digestion)	Method 2 (Ultrasound-assisted extraction)	Method 3 (Dry ashing)
Ca	42.1 $\pm$ 3.3 ^a	44.1 $\pm$ 0.5 ^a	43.5 $\pm$ 1.1 ^a
Cu	0.054 $\pm$ 0.002 ^a	0.055 $\pm$ 0.001 ^a	0.052 $\pm$ 0.004 ^a
Fe	0.73 $\pm$ 0.06 ^a	0.73 $\pm$ 0.01 ^a	0.71 $\pm$ 0.03 ^a
K	65.8 $\pm$ 4.4 ^a	65.4 $\pm$ 2.3 ^a	67.8 $\pm$ 1.7 ^a
Mg	4.5 $\pm$ 0.3 ^a	4.7 $\pm$ 0.1 ^a	4.5 $\pm$ 0.1 ^a
Mn	0.015 $\pm$ 0.001 ^a	0.015 $\pm$ 0.001 ^a	0.016 $\pm$ 0.001 ^a
Na	16.2 $\pm$ 1.0 ^a	15.8 $\pm$ 0.6 ^a	16.7 $\pm$ 0.4 ^a
P	21.7 $\pm$ 1.6 ^a	22.2 $\pm$ 0.4 ^a	22.4 $\pm$ 0.5 ^a
Zn	0.61 $\pm$ 0.03 ^a	0.63 $\pm$ 0.01 ^a	0.71 $\pm$ 0.07 ^b

^{a,b} Mean values between different columns with the same letter are not significantly different at $p > 0.05$, according to Tukey's test.

Although the efficiency of the ultrasound-assisted extraction method could be affected by diverse variables, such as the concentrations and quantities of acid added (Bermejo-Barrera et al., 2001; Krug 2010; Capelo et al., 2005), the results obtained for Method 2 (ultrasound-assisted extraction) were similar to reference methods usually described in literature. The residual carbon was also determined ($0.33 \pm 0.01\%$) and demonstrated that this low cost method can be applied for mineral determination in IF in a short time (less than 1 hour).

Method validation results are shown in Table 3. Accuracy and precision were evaluated using CRM *Infant/ Adult Nutritional Formula* (NIST 1849a) (0.2 mg of CRM and n=7 analytical repetitions). Recovery mean values ranged from $91 \pm 2\%$ (Zn) to $105 \pm 2\%$ (Mg), being within the ranges defined by INMETRO (2018) and AOAC (2016). The limits of detection and quantification were calculated as $LOD = 3.3 * (s/b)$ and $LOQ = 10 * (s/b)$, where s = the standard deviation of the concentration of 10 blank experiments and b = slope (angular coefficient). The LODs and LOQs obtained were adequate for the determinations of the 9 elements in IF, varying from 0.1 μ g per 100mL (Cu, Mn and Zn) to 0.08 mg per 100mL (Ca).

Table 3. Validation results for ultrasound-assisted method (n=7), used CRM Infant/Adult Nutritional Formula (NIST 1849a).

Element	Accuracy and precision (NIST 1849a)						LOD (mg per 100mL)	LOQ (mg per 100mL)
	CRM values (mg kg ⁻¹)	AOAC (2016) thresholds		Ultrasound-assisted method				
		REC (%)	CV (%)	Obtained values (mg kg ⁻¹)	REC (%)	CV (%)		
Ca	5253 ± 51	95 - 105	3.7	5147 ± 72	98 ± 1	1.4	0.03	0.08
Cu	19.78 ± 0.26	80 - 110	7.3	20.58 ± 1.08	104 ± 5	5.2	0.0001	0.0002
Fe	175.6 ± 2.9	90 - 107	5.3	163 ± 5	93 ± 3	3.3	0.0002	0.0005
K	9220 ± 110	95 - 105	3.7	9580 ± 104	104 ± 1	1.1	0.02	0.05
Mg	1648 ± 36	95 - 105	3.7	1727 ± 39	105 ± 2	2.2	0.01	0.04
Mn	49.59 ± 0.97	80 - 110	7.3	45.4 ± 0.5	92 ± 1	1.2	0.0001	0.0002
Na	4265 ± 83	95 - 105	3.7	4279 ± 52	100 ± 1	1.2	0.02	0.07
P	3990 ± 140	95 - 105	3.7	3808 ± 115	95 ± 3	3.0	0.02	0.06
Zn	151.0 ± 5.6	90 - 107	5.3	137 ± 3	91 ± 2	2.1	0.0001	0.0004

REC= Recovery (%), **CV**= Coefficient of variation, **LOD**= Limit of detection, **LOQ**= Limit of quantification, **CRM**= certified reference materials

Selectivity (matrix effect) was verified using two analytical curves: one curve in acid medium (HCl 5% (v/v), blank – group 1) and the other in matrix medium (IF sample - group 2), where the same concentrations were added in at least 5 different levels considering the ranges of each element (n=3). The analytical curves were visually parallel (Figure 2) and the slopes were compared using t-test. For all elements, the values for $t_{\text{calculated}}$ (0.494 to 1.472) were lower than t_{critical} (2.037 to 2.160) indicating an absence of matrix effect (Figure 2). The linearity was evaluated using the correlation coefficient (r^2) and the values (0.999 to 1.000) demonstrated that the method has linearity for the work ranges.

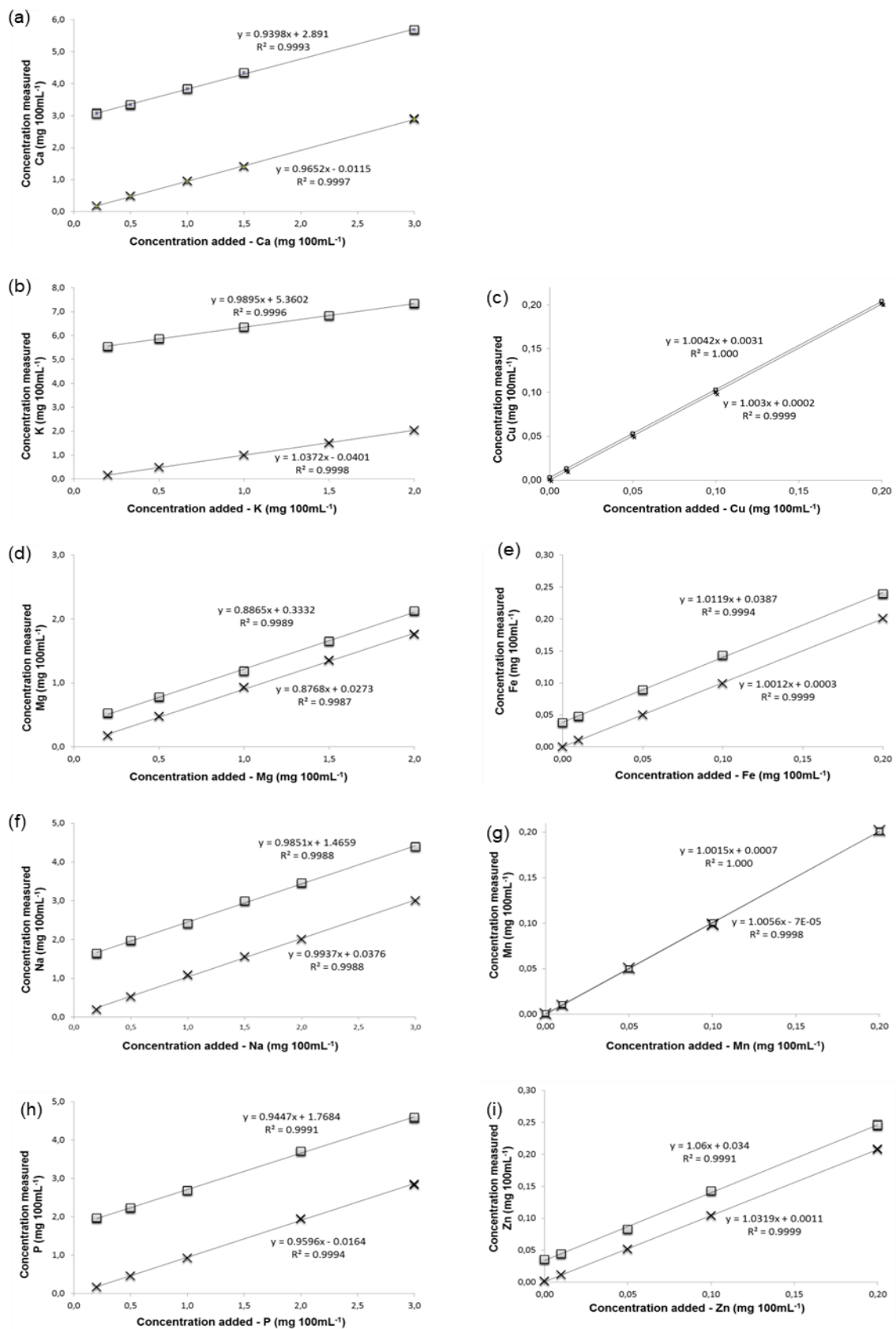


Figure 2. Selectivity evaluation by analytical curves prepared in acid (Group 1) and in matrix medium (Group 2), n=3; Group 1: Blank + Analyte added; Group 2: Sample of IF + Analyte.

4.2. *In vitro* digestion method evaluation for mineral bioaccessibility in infant formulas

The bioaccessibility assays involve numerous steps that can significantly influence the final results (Alegría-Torán, 2015) and, to the best of our knowledge, few studies have dealt with the optimization of these methods under infant gastrointestinal conditions. Hence the present study evaluated some method variables that could contribute to the minerals dialyzed fraction in IF. In order to minimize the errors, some variables were rigorously controlled and verified (such as incubation time, pH, and final volume) and a single sample was evaluated. The tests were: Test A which included an overnight step; Test B which included an ice bath step; Test C considered an alternative IF preparation and Test D considered a higher P+B solution amount. The results observed in these tests are presented in Table 4.

Table 4. Results from *in vitro* digestion method evaluation (mean $\pm$ SD, n=2).

Element	Test A	Method Modification		
		Overnight step / Infant Formula volume		Volume of P+B solution
		Test B	Test C	Test D
Ca (mg per 100mL)	8.52 $\pm$ 0.58 ^b	8.85 $\pm$ 0.74 ^b	7.69 $\pm$ 0.18 ^b	5.42 $\pm$ 2.02 ^a
Cu (μ g per 100mL)	15.98 $\pm$ 2.12 ^a	14.20 $\pm$ 0.28 ^a	16.80 $\pm$ 1.13 ^a	14.30 $\pm$ 0.70 ^a
Fe (μ g per 100mL)	0.13 $\pm$ 0.07 ^a	0.12 $\pm$ 0.00 ^a	0.12 $\pm$ 0.00 ^a	0.11 $\pm$ 0.00 ^a
K (mg per 100 mL)	43.66 $\pm$ 0.93 ^b	45.21 $\pm$ 0.50 ^b	39.80 $\pm$ 1.82 ^a	41.39 $\pm$ 1.09 ^a
Mg (mg per 100mL)	2.53 $\pm$ 0.05 ^b	2.53 $\pm$ 0.03 ^b	2.32 $\pm$ 0.10 ^b	2.16 $\pm$ 0.22 ^a
Mn (μ g per 100mL)	3.00 $\pm$ 0.14 ^a	2.80 $\pm$ 0.42 ^a	2.75 $\pm$ 0.21 ^a	3.30 $\pm$ 0.79 ^a
P (mg per 100mL)	13.78 $\pm$ 0.37 ^{ab}	14.04 $\pm$ 0.24 ^b	12.26 $\pm$ 0.46 ^a	15.31 $\pm$ 0.27 ^c
Zn (mg per 100mL)	0.06 $\pm$ 0.01 ^a	0.06 $\pm$ 0.00 ^a	0.07 $\pm$ 0.01 ^a	0.07 $\pm$ 0.02 ^a

^{a,b,c} same letters for Tests A, B and C and same letters for Tests A and D indicates no significant difference at 95% confidence level ($p < 0.05$); P+B = Pancreatin + Bile extract; **Test A** = overnight step after gastric digestion; **Test B** = ice bath step after gastric step; **Test C** = 3 g of IF with final solution made up to 20 g and **Test D** = 2.50 mL of freshly P+B solution (0.004 g mL⁻¹ pancreatin + 0.025 g mL⁻¹ of bile extract).

In general, the results obtained in Tests A, B and C which involves the gastric digestion step, showed no significant differences at a confidence level of

95%. The results directly indicates that inactivation of pepsin overnight in the fridge (A) or by an ice bath (B) has similar effects in mineral dialyzability in IF. On the other hand, the use of an alternative IF preparation (Test C, 3 g of IF with final solution made up to 20 g), may decrease the K and P dialysis – which presented higher values in Test A (final solution made up to 100 g).

The amount of the P+B solution in the gastrointestinal digestion was evaluated to verify the effect of the decrease by 6-fold (Test A) or 2-fold (Test D) factor in the amount usually reported in *in vitro* digestion studies considering adults (Miller et al., 1981; Perales et al., 2005; Cámara et al., 2007; Luten et al., 1996). These enzymes amount consider that suckling infants have an immature gastrointestinal tract, producing low concentrations of pancreatin and bile salts - being up to 10 times less than that of an adult (Bourlieu et al., 2014). In Test A, higher Ca, K and Mg and lower P dialyzability was observed than Test D, indicating that the levels of these elements, at a 95% level of confidence can be affected by the amount of P+B enzymes. Nevertheless, this difference cannot be attributed only to the amount of P+B added, since various parameters modulate the digestion, such as the quantity of liquids and electrolytes that influence the enzyme activities and more specifically Ca^{2+} (Bourlieu et al., 2014). Thus, on adding a greater amount of P+B enzymes (Test D), there was an increase in Na levels, which could lead to a competition between these ions.

In general, Test A presented advantages over the other conditions: the analytical procedure can be carried out in two days, titratable acidity is determined in the similar conditions to the gastrointestinal digestion and the lower amount of P+B enzymes (0.75 mL of P+B solution) presented the advantage of better simulating the immature gastrointestinal tract of the suckling infants (Bourlieu et al., 2014).

4.3. *In vitro* digestion method validation for mineral bioaccessibility in infant formulas

The selectivity (matrix effect) was verified using two analytical curves: one curve in matrix medium (dialyzed sample solution) and the other in acid medium (dialyzed blank experiment), where the same concentrations of analytes were

added at 3 different concentration levels (considering the minerals levels and analytical curves ranges). The slopes were compared using t-test and, all values for $t_{\text{calculated}}$ were lower than t_{critical} , indicating absence of matrix effect. For linearity, the correlation coefficients (r^2) ranged from 0.993 (K) to 1.000 (P) and it was considered adequate for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P and Zn determination in dialyzable fraction by ICP OES.

Table 5. Evaluation of accuracy (recovery trials) and precision in *in vitro* digestion method

Element	Dialyzed fraction	Spike levels	Dialyzed fraction + spike level	REC (%)	CV (%)
Ca (mg per 100 mL)	3.93 ± 0.01	0.2	4.13±0.01	100	5.0
		1.0	4.94±0.02	101	2.2
		2.0	5.9±0.1	98	3.8
Cu (µg per 100mL)	11.43 ± 0.06	1	12.31±0.04	88	4.0
		10	19.82±0.02	84	0.2
		100	113±2	102	2
Fe (mg per 100 mL)	82.11 ± 0.49	1	83.05±0.03	94	3.1
		10	91.4±0.4	93	3.7
		100	181±2	99	2
K (mg per 100 mL)	31.98 ± 0.31	1.0	32.9±0.1	92	5.1
		2.0	34.1±0.1	106	3.2
		5.0	37.1±0.1	103	1.4
Mg (mg per 100 mL)	2.17 ± 0.01	0.1	2.27±0.01	100	6.3
		1.0	3.16±0.02	99	1.9
		2.0	4.1±0.1	95	3.0
Mn (µg per 100mL)	0.92 ± 0.01	1.0	1.95±0.01	103	0.7
		10	9.0±0.3	81	0.3
		100	87±1	86	1
P (mg per 100 mL)	13.77 ± 0.02	1.0	14.82±0.01	105	0.5
		2.0	15.64±0.03	93	1.3
		5.0	18.32±0.02	91	0.4
Zn (mg per 100 mL)	28.05 ± 0.18	1.0	29.1±0.1	108	5.9
		10	36.4±0.4	84	4.4
		100	119±1	91	1

REC = Recovery; **CV** = coefficient of variation

Accuracy and precision (repeatability) were verified using spiked trials at 3 different levels, in triplicate. Recovery was calculated according to the following equation: $\text{Rec (\%)} = (C_1 - C_2) \times 100 / C_3$, where C_1 was the mineral level in spiked dialyzed solution, C_2 the mineral level in dialyzed solution and C_3 the spike level. According to INMETRO (2018) and AOAC (2016) thresholds (recoveries: 80% to 110% and $\text{CV} < 7.3\%$ for Ca, K, Mg and P and $\text{CV} < 11\%$ for Cu, Fe, Mn and Zn),

from Table 5 one could observe that the results in all spiked experiments were within the recovery and coefficient of variation thresholds established - demonstrating that the proposed method has adequate precision and accuracy for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P and Zn for dialyzability assay in infant formulas.

4.4. Method application in real Sample

Table 6 presents the mineral contents (in mg per 100 mL and mg per 100 kcal) found in the five IF analyzed. The results showed that Na was the only element that did not differ significantly, at a 95% significance level, in the infant formulas analyzed.

Table 6. Mineral content in Infant formulas from Brazil and Chile (n=3)

Elements	Mineral levels in Infant Formula samples				
	BR-A	BR-B	BR-C	CH-C	BR-D
Ca (mg per 100 mL)	57.5±0.7 ^d	46.6±1.3 ^b	40.7±0.7 ^a	46.8±1.1 ^b	49.7±0.4 ^c
Cu (µg per 100mL)	62.7±0.8 ^c	42.8±1.3 ^b	62.7±1.9 ^c	61.3±0.8 ^c	36.0±0.4 ^a
Fe (mg per 100 mL)	0.64±0.02 ^a	0.83±0.02 ^c	0.77±0.02 ^b	0.97±0.01 ^d	0.82±0.01 ^{bc}
K (mg per 100 mL)	81.8±1.3 ^b	97.4±2.9 ^c	77.6±2.1 ^{ab}	115.3±4.5 ^d	72.0±1.3 ^a
Mg (mg per 100 mL)	6.1±0.1 ^b	6.1±0.2 ^b	8.7±0.2 ^d	7.3±0.2 ^c	5.5±0.1 ^a
Mn (µg per 100mL)	21.8±0.3 ^d	4.5±0.1 ^a	14.2±0.3 ^b	15.4±0.1 ^c	33.7±0.4 ^e
Na (mg per 100 mL)	21.0±0.3 ^a	21.3±0.7 ^a	21.0±0.7 ^a	22.6±0.9 ^a	21.5±0.4 ^a
P (mg per 100 mL)	32.2±0.5 ^c	35.8±1.2 ^d	23.6±0.7 ^a	30.0±0.8 ^b	29.7±0.4 ^b
Zn (mg per 100 mL)	0.61±0.01 ^b	0.81±0.03 ^d	0.75±0.01 ^c	0.72±0.01 ^c	0.49±0.01 ^a
Elements	Mineral levels in Infant Formula samples				
	BR-A	BR-B	BR-C	CH-C	BR-D
Ca (mg per 100 kcal)	85.8±1.0	69.6±1.9	60.7±1.1	69.9±1.6	74.2±0.5
Cu (µg per 100kcal)	93.6±1.2	63.9±2.0	93.5±2.9	91.5±1.2	53.7±0.7
Fe (mg per 100 kcal)	0.96±0.02	1.24±0.04	1.16±0.02	1.45±0.01	1.22±0.01
K (mg per 100 kcal)	122±2	145±4	116±3	172±7	108±2
Mg (mg per 100 kcal)	9.1±0.1	9.1±0.2	13.0±0.3	10.9±0.2	8.2±0.1
Mn (µg per 100kcal)	32.5±0.4	6.7±0.1	21.2±0.4	22.9±0.1	50.3±0.6
Na (mg per 100 kcal)	31.4±0.4	31.7±1.0	31.3±1.00	33.7±1.3	32.0±0.6
P (mg per 100 kcal)	48.1±0.7	53.5±1.8	35.2±1.00	44.7±1.2	44.3±0.5
Zn (mg per 100 kcal)	0.92±0.02	1.21±0.04	1.11±0.01	1.08±0.01	0.73±0.01

^{a,b,c,d,e} same letters in different samples - no significant difference at 95% confidence level (p<0.05)

On comparing the results obtained with the Codex Alimentarius (FAO/WHO 2016), all the elements presented values above the minimum and maximum or in agreement with values guidance upper levels (GUL) established.

Different from Codex Alimentarius, Brazilian regulation (Brazil 2011) establishes a maximum value for Fe (1.3 mg per 100 kcal) in IF for 0 to 6-month old infants. The Brazilian IF samples (BR-A, BR-B, BR-C and BR-D) presented results within this limit.

The results observed in the dialyzability assays are summarized in Table 7. In all samples, different mineral contents were observed, being the lowest levels of the mineral dialyzability found in soy-based IF (Sample BR-D). Dialyzed fractions were calculated as the ratio, in percentage, between the dialyzed content and the mineral content in IF prepared samples. For Fe, the highest variation in the amount dialyzed (10 to 34%) was verified, especially in the iron-fortified sample (CH-C). Related studies for the dialyzed fractions from milk based IF presented similar values: 7.24 to 24.1% for Ca (Perales et al., 2005; Bosscher et al., 2001; Jovani et al., 2001), 15.9 to 32.6% for Cu (García et al., 1998), 1.28 to 10.96% for Fe and 6.7 to 9.6% for Zn (Bosscher et al., 2001; García et al., 1998; and Jovani et al., 2001).

The Ca percentages in the dialyzed fractions (2.2% to 10%) were low when compared to the values reported in the literature. Perales et al. (2005) reported that in milk-based IF the composition of the protein fraction affects calcium dialyzability, particularly when casein is the main protein. To Cu (19% to 23%), Fe (10% to 34%) and Zn (5.6% to 11%), the values were within or higher than the ranges reported in the literature. For K, Mg, Mn and P dialyzability in IF, to the best of our knowledge, no studies are reported in literature.

Table 7. Mineral bioaccessibility in infant formulas from Brazil and Chile (n=4)

Elements	Infant Formula samples									
	BR-A	Dialyzed fraction (%)	BR-B	Dialyzed fraction (%)	BR-C	Dialyzed fraction (%)	CH-C	Dialyzed fraction (%)	BR-D	Dialyzed fraction (%)
Ca (mg per 100 mL)	5,97±0,43 ^d	10%	2,16±0,19 ^c	4,6%	0,88±0,01 ^{ab}	2,2%	1,28±0,29 ^b	2,7%	0,58±0,18 ^a	1,2%
Cu (µg per 100mL)	11,78±1,56 ^c	19%	9,69±1,19 ^b	23%	12,42±0,45 ^c	20%	13,23±0,45 ^c	22%	7,30±0,43 ^a	20%
Fe (mg per 100 mL)	0,093±0,005 ^{bc}	15%	0,083±0,007 ^b	10%	0,096±0,001 ^c	12%	0,331±0,009 ^d	34%	0,015±0,001 ^a	1,9%
K (mg per 100 mL)	32,34±0,82 ^c	40%	37,74±0,68 ^d	39%	29,11±0,40 ^b	38%	44,27±0,82 ^e	38%	25,78±0,71 ^a	36%
Mg (mg per 100 mL)	1,83±0,04 ^c	30%	1,34±0,01 ^b	22%	2,88±0,06 ^e	33%	2,57±0,06 ^d	35%	0,80±0,05 ^a	15%
Mn (µg per 100mL)	2,14±0,21 ^c	10%	0,61±0,02 ^b	14%	1,91±0,11 ^c	13%	3,06±0,17 ^d	20%	0,19±0,04 ^a	0,6%
P (mg per 100 mL)	9,39±0,28 ^c	29%	11,34±0,24 ^d	32%	7,26±0,10 ^b	31%	9,75±0,22 ^c	33%	5,55±0,15 ^a	19%
Zn (mg per 100 mL)	0,044±0,003 ^b	7%	0,045±0,002 ^b	5,6%	0,052±0,003 ^c	7%	0,079±0,005 ^d	11%	0,004±0,001 ^a	0,8%

^{a,b,c,d,e} same letters in different samples - no significant difference at 95% confidence level (p<0.05); **BR-A, BR-B, BR-C** = Infant formula for suckling infants; **CH-C** = Infant formula fortified with iron suckling infants; **BR-D** = Soybean based infant formula for suckling infants.

5. Conclusions

The ultrasound-assisted method for minerals determination in IF was shown to be an alternative to reference methods (microwave digestion and dry ashing), being faster, simpler, with low cost, lower amount of chemical reagents and agreeing with the “Green Chemistry” principles. Method validation presented satisfactory results for selectivity, linearity, LOD, LOQ, precision (CV <7.3%) and accuracy (88 to 102%) for all elements. The *in vitro* digestion tests were carried out to determine if some method modifications (such as reduction in the volume used in pancreatin+bile solution for gastrointestinal step and an overnight step between gastric and gastrointestinal digestion) could affect the dialyzed fractions. The results have demonstrated that the modifications did not affect the dialyzed fractions and allows performing the bioaccessibility assay with adequate sensitivity, accuracy and precision. The IF samples studied presented minerals levels within the Brazilian regulation thresholds and the values suggested by Codex Alimentarius. The highest percentages found in the dialyzed fraction were obtained for the minerals K (36-40%), Mg (15-35%) and P (19-33%) and the lowest for Ca (1.2-10%), Zn (0.8-11%) and Mn (0.6-20%). The IF with iron for suckling infants (Sample CH-C) presented levels 3x higher than the other samples to dialyzed fractions, and the soy-based IF (Sample BR-D) presented smaller contents than the others FI for all the elements - demonstrating the need for more studies on the mineral bioaccessibility in the different types of IF.

Acknowledgements: This study was financed in part by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2017/11334-8) and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES, Code 001). M.A. Morgano acknowledges National Council for Scientific and Technological Development fellowship (CNPq, process 303142/2017-0).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti, Raquel Fernanda Milani, Esther Lima de Paiva and Marcelo Antonio Morgano declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed Consent: Not applicable

6. References

- AOAC (2016) International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- Alegría-Torán A, Barbera-Sáez R, Cilla-Tatay A (2015). Bioavailability of minerals in foods. Handbook of Mineral Elements in Food, pp. 41–67. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Bermejo-Barrera P, Muñiz-Naveiro O, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A (2001). The multivariate optimization of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 439: 211-227.
- Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, Van Dyck K, Van Cauwenbergh R, Deelstra H (2001). In Vitro Availability of Calcium, Iron, and Zinc from First-Age Infant Formulae and Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 32(1): 54–58. <https://doi.org/10.1097/00005176-200101000-00016>
- Bourlieu C, Ménard O, Bouzerzour K, Mandalari G, Macierzanka A, Mackie AR, Dupont D (2014). Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing Relevant In Vitro Models. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54(11):1427-1457. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.640757>
- BRAZIL (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. Brasília.
- Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Balance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, Clemente A, et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14:991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Cámara F, Amaro MA, Barberá R, Clemente G (2005). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem.* 92: 481-489.
- Cámara F, Barberá R, Amaro MA, Farré R (2007). Calcium, iron, zinc and copper transport and uptake by Caco-2 cells in school meals: Influence of protein and mineral interactions. *Food Chem* 100(3): 1085-1092. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.010>
- Capelo JL, Maduro C, Vilhena C (2005). Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid–liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrason Sonochem* 12:225-232. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2003.10.010>
- Cava-Montesinos P, Cervera ML, Pastor A, Guardia M (2005). Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Anal Chim Acta.* 531:111-123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.093>
- De Paiva EL, Milani RF, Morgano MA, Ariseto-Bragotto, AP (2019). Aluminum in infant formulas commercialized in Brazil: Occurrence and exposure assessment. *J Food Compos Anal.* 82:103230. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.06.002>
- Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol* 3:371 <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>
- FAO/WHO (2016). Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. Codex Stan 72-1981 (amendment: 1983, 1985, 1987, 2011, 2015 and 2016). Revision 2007.
- García R, Alegría A, Barberá R, Farre R, Lagarda MJ (1998). Dialyzability of Iron, Zinc, and Copper of diferente types of infant formulas marketed in Spain. *Biol Trace Elem Res* 65(1): 7-17. <https://doi.org/10.1007/BF02784110>
- INMETRO (2018). Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008), revision 07:1-28.

- Jovani M, Barberá R, Farré R, Aguilera EM (2001). Calcium, Iron, and Zinc Uptake from Digests of Infant Formulas by Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem.* 49 (7): 3480-3485. <https://doi.org/10.1021/jf010106t>
- Krug FJ (2010). Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1º ed. rev., Piracicaba.
- Lima ACS, Soares DJ, da Silva LMR, Figueiredo RW, Sousa PHM, Menezes,EA (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem* 161:142-147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.123>.
- Luten J, Crews H, Flynn A, Van Dael P, Kastenmayer P, Hurrell R, Deelstra H, Shen LH, Fairweather-Tait S, Hickson K, Farré R, Schlemmer U, Frohlich W (1996). Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *J Sci Food Agric.* 72: 415-424.
- Machado I, Bergmann G, Pistón M (2016). A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chem* 194:373-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.027>
- Ménard O, Bourlieu C, De Oliveira SC, Dellarosa N, Laghi L, Carrière F, Capozzi F, Dupont D, Deglaire A (2018). A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chem* 240:338-345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.145>
- Miller DD, Schicker BR, Rasmussen RR, Van Campen D (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34: 2248-2256.
- Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carriere F, Boutrou R, et al (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct* 5:1113-1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- Mir-Marqués A, Cervera ML, De La Guardia M (2015) Baby Foods. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, pp. 709–723. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.

- Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farré R (2005). Bioavailability of Calcium from Milk-Based Formulas and Fruit Juices Containing Milk and Cereals Estimated by in Vitro Methods (Solubility, Dialyzability, and Uptake and Transport by Caco-2 Cells). *J Agric Food Chem*, 53(9): 3721-3726. <https://doi.org/10.1021/jf047977y>
- Porova N, Botvinnikova V, Krasulya O, Cherepanov P, Potoroko I (2014). Effect of ultrasonic treatment on heavy metal decontamination in milk. *Ultrason Sonochem* 21:2107-2111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.029>
- Quintaes KD, Diez-Garcia RW (2015). The importance of minerals in the human diet. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, pp. 01–21. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1.
- Souza SO, Costa SSL, Brum BCT, Santos SH, Garcia CAB, Araujo RGO (2019). Determination of nutrients in sugarcane juice using slurry sampling and detection by ICP OES. *Food Chem* 273:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.060>.
- Sun DH, Waters JK, Mawhinney TP (2000). Determination of Thirteen Common Elements in Food Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry: Comparison of Five Digestion Methods. *Journal of AOAC International*, 83(5):1218-1224
- Vieira da Silva S, Mattanna P, Bizzi CA, Richards NSPS, Barin JS (2013). Evaluation of the Mineral Content of Infant Formulas Consumed in Brazil. *J. Dairy Sci* 96:3498-3505.
- Zounr RA, Tuzen M, Deligonul N, Khuhawar MY (2018). A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chem* 253:277-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.16>

CAPÍTULO 3

Influência dos diversos ingredientes na bioacessibilidade de minerais em fórmulas infantis e leites

Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti^{1,2}, Raquel Fernanda Milani²,
Esther Lima de Paiva^{2,3}, Marcelo Antônio Morgano²

1 - Adolfo Lutz Institute, Rua São Carlos, 720, Vila Industrial, Campinas, SP, 13035-420, Brazil

2 - Institute of Food Technology, Av. Brasil 2880, Jd. Chapadão, P.O. Box 139, Campinas, SP, 13070-178, Brazil

3 - Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

O artigo será submetido à revista ***International Dairy Journal***.

RESUMO

Foram avaliadas a composição mineral e a fração bioacessível de diferentes tipos de fórmulas infantis e leites integrais. Os resultados obtidos demonstraram que nas fórmulas infantis os teores totais dos minerais são mais elevados que nos leites em 162 x para Fe; 63 x para Cu; 37 x para Mn e 2 x para Zn. A bioacessibilidade dos minerais nos leites foi influenciada principalmente pelo teor total e tipo de processamento (pasteurizado, em pó e UHT). Para as fórmulas a base de leite, a adição de prebiótico em geral, demonstrou melhorar a dialisabilidade do K, Fe, Mg, Cu e Zn, enquanto que a proteína hidrolisada enzimaticamente não apresentou efeito na bioacessibilidade dos elementos, exceto para P. A fórmula infantil com proteína isolada de soja teve resultados de dialisabilidade similares aos das fórmulas com proteína de soro de leite. Os resultados obtidos indicam que a maior absorção dos minerais presentes na FI pode estar relacionada à maior eficiência dos atuais processos tecnológicos.

Palavra-chave: fração bioacessível; micronutrientes; alimento infantil; ICP OES

1. Introdução

O leite materno é considerado a forma ideal de nutrição para bebês até seis meses, sendo fonte de nutrientes balanceados e compostos bioativos para o crescimento e o desenvolvimento adequado da criança. No entanto, quando a amamentação não é adequada, possível ou desejável, a fórmula infantil (FI) é a alternativa nutricional ideal e, sem dúvida, mais adequada do que o consumo de leite de vaca (Vieira da Silva, Mattanna, Bizzi, Richards & Barin, 2013; Zou, Pande & Akoh, 2016). A segurança nutricional e a adequação da FI é importante para o crescimento e o desenvolvimento de lactentes, sendo que sua composição vem evoluindo para se aproximar do leite materno, entretanto, ainda persistem disparidades entre lactentes alimentados com leite materno e com FI (FAO/WHO, 2016; Donovan, 2019).

Para se aproximar do leite materno a composição das FI disponíveis são elaboradas e classificadas de acordo com a faixa etária do lactente, sendo as principais classes de 0-6 meses (5 meses e 29 dias), 6-12 meses (11 meses e 29 dias) e de 0-12 meses (11 meses e 29 dias). Existe também a categoria de FI para necessidades dietoterápicas específicas (European Commission, 2006; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). A determinação do teor total dos nutrientes presentes em FI é fundamental para garantir a qualidade do produto segundo as legislações e normas. Todavia, conhecer a concentração total de nutrientes no alimento não é suficiente para determinar se o alimento provê as necessidades nutricionais adequadas, sendo importante o conhecimento da fração que pode estar efetivamente disponível para absorção no organismo (Do Nascimento da Silva, Leme, Cidade, & Cadore, 2013). Neste sentido, é importante o estudo da bioacessibilidade ou biodisponibilidade dos nutrientes, de forma a avaliar sua real absorção pelo organismo (Minekus *et al.*, 2014).

A Bioacessibilidade é definida como a fração do elemento que é liberado da matriz alimentar após ingestão e solubilizado no lúmen intestinal e trato intestinal podendo ser determinada por ensaios *in vitro* de solubilidade e dialisabilidade (Barciela-Alonso & Bermejo-Barrera, 2015). Entretanto, devido à natureza altamente complexa do trato gastrointestinal humano, a capacidade de recriar todas as suas funções em um modelo *in vitro* é limitada e, apesar da recente publicação de Ménard *et al.* (2018), ainda não existe um modelo harmonizado fisiologicamente relevante para lactentes. Porém, estes estudos

são importantes, pois podem ser realizados utilizando modelos de digestão *in vitro* que são uma alternativa útil, sem restrições éticas e que fornecem resultados precisos em pouco tempo (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011).

Devido à escassez de informações abrangentes sobre a bioacessibilidade e biodisponibilidade de micronutrientes em alimentos infantis, são necessários maiores esforços para a compreensão da real influência dos diversos ingredientes na absorção dos nutrientes em alimentos (Shani-Levi *et al.*, 2017). Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o teor total de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de FI (nacional e internacional) destinadas às faixas etárias de 0-6 meses, de 0-12 meses e de 6-12 meses e em leites integrais (pasteurizado, em pó e UHT), bem como avaliar a influência dos ingredientes na bioacessibilidade dos elementos através das frações solúveis e dialisáveis.

2. Material e métodos

2.1. Equipamentos

Para a determinação dos minerais foi realizada inicialmente uma extração ácida em banho ultrassônico (Easy 180H, Elma, Singen, Alemanha) e a quantificação foi realizada usando um equipamento de espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES 5100VDV, Agilent technologies, Tóquio, Japão), operando em condições otimizadas conforme Tabela 1. Para os ensaios de bioacessibilidade foi utilizado banho-maria tipo Dubnoff (NT 230, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), pHmetro com eletrodo seletivo (Starter 3100, Ohaus, Parsippany, EUA) e centrífuga com refrigeração (5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Toda água utilizada para preparo de soluções e amostras foi purificada em sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Tabela 1

Condições otimizadas de operação do ICP OES

Condições do ICP OES			
Gerador de rádio frequência (MHz)		27	
Potência do plasma (kW)		1,2	
Visão do plasma		Axial (Cu, Fe, Mn, Zn) e Radial (Ca, K, Mg, Na, P)	
Fluxo do Argônio (plasma/auxiliar/nebulizador) (L min ⁻¹)		12 / 1,0 / 0,7 (Seaspray)	
Sistema de nebulização		Nebulizador seaspray e câmara ciclônica de duplo passo	
Números de réplicas		03	
Comprimento de ondas (nm)		Faixa linear	
Ca (II); Na (I); P (I)	317,933; 589,592; 213,618	0,20 – 5,00	mg/ 100mL
Cu (I); Fe (II); Mn (II); Zn (II)	324,754; 259,940; 257,610, 206,200	0,5 – 200	µg /100mL
K (I)	766,491	0,20 – 10,00	mg/ 100mL
Mg (II)	279,553	0,20 – 2,00	mg/ 100mL

(I): linha atômica; (II): linha iônica.

2.2. Reagentes e soluções

Ácido nítrico destilado em sistema subboiling (Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha); peróxido de hidrogênio 30% (v/v); ácido clorídrico 37% (Merck, Darmstadt, Alemanha); bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); pepsina de mucosa gástrica de suínos com atividade enzimática de 250 U/mg, pancreatina de pâncreas suínos com atividade enzimática equivalente a 8 vezes as especificações USP, sais de bile de bovino e aves e saco de diálise com porosidade de 25 Angstrons com cut-off de 12.000Da (todos da marca Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Foram empregadas soluções de enzimas preparadas imediatamente antes do uso.

As curvas analíticas foram preparadas em solução HCl 5% (v/v), por diluição sucessiva dos padrões certificados: solução multielementar (Cu, Fe, Mn e Zn) 1000 mg L⁻¹, solução individual de fósforo 10.000 mg L⁻¹ (Specsol, Quimlab, Jacareí, Brasil); soluções individuais de Ca, Mg, K e Na de 10.000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Filtro de 0,45 µm (PTFE, Agilent Technologies) foi usado para filtrar as amostras mineralizadas em banho ultrassônico.

2.3. Amostras

Um total de 18 amostras de FI destinadas às faixas etárias de 0-6 meses (n=6), 0-12 meses (n=8) e 6-12 meses (n=4) foram adquiridas em estabelecimentos comerciais no Brasil (BR), Chile (CH), Estados Unidos da América (USA), Nova Zelândia (NZ) e Portugal (PT). As amostras de leites integrais pasteurizados (n=3), em pó (n=3) e UHT (n=3) foram adquiridas no comércio de Campinas – Brasil. A Tabela 2 apresenta a identificação das amostras conforme sua codificação, dizeres do painel frontal (rótulo) e ingredientes.

A codificação das amostras foi definida por um conjunto de letras e números, onde a primeira letra (F ou L) representa a matriz (FI e leite integral, respectivamente); a segunda letra a marca (letras diferentes, marcas diferentes); os números as faixas etárias das FI (0-6meses: 1; 0-12meses: 2; 6-12meses: 3); letras após hífen, para FI o país de origem (BR, CH, PT, NZ e USA), para os leites o tipo de tratamento (PAS, PO e UHT); letras após a barra as FI a base de proteína de soja (SOY).

2.4. Determinação do teor total de minerais

Para a determinação do teor total dos minerais Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn presentes nas FI e nos leites em pó as amostras foram inicialmente preparadas conforme descrito nos rótulos: 15 g do pó reconstituído em 100 mL de água purificada. As amostras de leite líquidas (PAS e UHT) foram pesadas diretamente.

Tabela 2

Identificação e informação de rotulagem (painel frontal e principais ingredientes) das amostras de FI (n=18) e leites (n=9).

Faixa etária	Amostra*	Rotulagem	
		Painel frontal	Principais Ingredientes
0-6	FA1-BR	FI para lactentes Prebióticos; DHA e ARA; Nucleotídeos	Soro de leite desmineralizado; Lactose; Leite desnatado; Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); ácido ascórbico
	FA1-CH	FI de início em pó com Fe para lactentes Proteína adequada; Fe; Ômega 3 e 6	Soro de leite, Leite desnatado; Lactose; ácido ascórbico
	FB1-BR	FI para lactentes. Com Luteína; DHA e ARA	Leite em pó desnatado; Lactose; Proteína concentrada do soro de leite; Proteína hidrolisada do soro de leite; ácido ascórbico
	FC1-BR	FI para lactentes – com DHA e ARA	Lactose; Leite em pó desnatado; Proteína concentrada do soro de leite; ácido ascórbico
	FD1-BR/SOY	FI para lactentes a base de soja. Não contem proteínas lácteas	Maltodextrina; Proteína de soja; ácido ascórbico
	FD1-NZ	FI Premium Nutricionalmente completo	Sólidos do leite; Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); ômega em pó; LCPUFAs; ácido ascórbico
0-12	FA2-BR/SOY	FI para lactentes e de seguimento para lactentes à base de soja. Não contem proteínas lácteas; com DHA e ARA	Maltodextrina; Proteína isolada de soja; ácido ascórbico
	FA2-PT	Leite para lactentes. HA; HM-O; Hipoalérgico	Lactose; Proteínas do soro de leite hidrolisadas enzimaticamente; Cultura de Lactobacillus Reuteri (DSM17938); ácido ascórbico
	FA2-NZ	FI Premium de início (starter)	Lactose (leite); Proteínas do soro de leite hidrolisadas enzimaticamente; Cultura (Bifidus); ácido ascórbico
	FB2-BR	FI para lactentes e de seguimento para lactentes Com Luteína	Maltodextrina; Lactose; proteína do soro de leite parcialmente hidrolisada; ácido ascórbico
	FB2-USA	FI com Fe – Base de leite em pó DHA para o cérebro; Luteína para os olhos; Vitamina E para o desenvolvimento	Leite desnatado; Lactose; Proteína concentrada do soro de leite; Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); ácido ascórbico
	FC2-BR	FI para lactentes e de segmento para lactentes destinada a necessidades dietoterápicas específicas composta por proteína parcialmente hidrolisadas e 2,2 g/100kcal de lactoses	Sólido de xarope de milho; Proteína parcialmente hidrolisada do leite desnatado e do soro de leite; ácido ascórbico
	FC2-USA	FI a base de leite em pó com Fe DHA & Colina para ajudar a apoiar o desenvolvimento do cérebro	Leite desnatado; Lactose; Proteína concentrada do soro de leite; Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); ácido ascórbico

Faixa etária	Amostra*	Rotulagem	
		Painel frontal	Principais Ingredientes
6-12	FD2-BR	FI para lactentes e de segmento para lactentes e crianças de primeira infância com proteínas lácteas parcialmente hidrolisadas Prebióticos; DHA e ARA; Nucleotídeos	Concentrado proteico e parcialmente hidrolisado do soro de leite Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); Lactose; ácido ascórbico
	FA3-BR	FI de segmentos para lactentes Prebióticos; DHA e ARA; Nucleotídeos	Soro de leite desmineralizado; Lactose; Leite desnatado; Galacto-oligosacarídeos (prebióticos); ácido ascórbico
	FB3-BR	FI de segmentos para lactentes. Com luteína; DHA e ARA	Leite desnatado; Lactose; Proteína concentrada do soro de leite; ácido ascórbico
	FC3-BR	FI de segmentos para lactentes. Com DHA e ARA	Leite em pó desnatado; Lactose; ácido ascórbico
	FD3-BR/SOY	FI de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância à base de soja. Não contem proteínas lácteas	Maltodextrina; Proteína de soja; ácido ascórbico
_**	LA-PO	Leite em pó integral instantâneo Rico em Fe, Zn e Vitamina C. Vitaminas A, D e E, Ca Fonte de proteínas	Leite integral; Carbonato de cálcio; Pirofosfato férrico; Sulfato de Zinco; Ascorbato de sódio; Acetato de DL-alfa-tocoferila; Acetato de retinila; colecalciferol; Emulsificante lecitina de soja
	LE-PO	Leite em pó integral instantâneo. Rico em vitaminas A, C, D, +Fe	Leite integral; Vitaminas A, C e D; Ferro; Emulsificante lecitina de soja
	LF-PO	Leite em pó integral instantâneo	Leite integral; Emulsificante lecitina de arroz
	LA-UHT	Leite UHT integral Rico em Fe, Zn e vitaminas A, C e D	Leite integral; ácido ascórbico; pirofosfato férrico; Sulfato de Zinco; colecalciferol; acetato de retinila
	LF-UHT	Leite UHT integral	Leite integral, estabilizantes: monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio e citrato de sódio
	LJ-UHT	Leite UHT integral	Leite integral, estabilizantes: trifosfato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e citrato de sódio
	LG-PAS	Leite pasteurizado tipo A integral	-
	LH-PAS	Leite pasteurizado tipo A integral homogeneizado	-
	LI-PAS	Leite pasteurizado tipo A integral	-

* Amostra: primeira letra: FI (F) ou leite (L); segunda letra: marcas; números: faixas etárias das FI; letras após hífen: para FI país de origem (BR, CH, PT, NZ e USA), para leites tipo de tratamento (PAS, PO e UHT); letras após barra (/): FI a base de proteína de soja (SOY).

** A faixa etária recomendada na rotulagem de todos os leites é para criança maior de 1 ano de idade.

Extração assistida por ultrassom - Adaptado dos trabalhos de Cava-Montesinos, Cervera, Pastor & de la Guardia, (2005); Machado, Bergmann & Pistón (2016) e Bermejo-Barrera, Muñiz-Naveiro, Moreda-Piñeiro, & Bermejo-Barrera (2001): 2 g de amostra líquida foram pesados em tubo de 50 mL graduado, adicionados 2 mL HNO_3 e 1 mL de H_2O_2 . O tubo foi fechado e submetido à sonicação em banho ultrassônico a 60°C por 30 minutos. Após resfriamento, a solução resultante foi avolumada para 25 mL com água purificada e filtrada. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

2.5. Determinação do teor bioacessível

Adaptado do trabalho de Perales, Barberá, Lagarda & Farré (2005): - Digestão gástrica: 15 g (pó) ou 40 g (líquido) de amostra foram pesados em erlenmeyer de 250 mL, adicionado 30 mL de água ultrapura e homogeneizado em banho-maria com agitação a 37°C, por 15 minutos. O pH foi ajustado para $2,0 \pm 0,2$ com solução de HCl 6 mol L^{-1} , após 15 minutos o pH foi verificado e, quando necessário, reajustado. Foram adicionados 1,87 mL de solução de pepsina 0,16 g mL^{-1} preparada em HCl 0,1 mol mL^{-1} (0,02 g de pepsina/ g de amostra), adicionado água purificada para completar 100 g de mistura e incubado em banho-maria com agitação a 37°C por 2 horas. Após a incubação, a amostra foi mantida *overnight* em geladeira a 8°C. O digerido gástrico foi fracionado em porções de 20 g em 2 tubos graduados de 50 mL e 2 frascos erlenmeyers de 250 mL, perfazendo um total de 5 frações de 20 g.

Digestão intestinal: Fração solúvel: em uma fração do digerido, o pH foi ajustado para 5 com solução de NaHCO_3 1mol L^{-1} e adicionados 0,75 mL de solução de pancreatina 0,004 g mL^{-1} e extrato de bile 0,025 g mL^{-1} preparada em NaHCO_3 0,5 mol L^{-1} (0,00015 g de pancreatina e 0,00094 g de sais biliares/ g da alíquota). O tubo contendo a amostra, sais e enzimas foi levado ao banho-maria e incubado sob agitação, a 37°C, por 2 horas. Finalizando a etapa de incubação, o pH foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ e a amostra centrifugada a 3500 g por 1 hora a 4°C. A determinação dos minerais presentes nos extratos incubados foram realizadas utilizando 2 mL do sobrenadante conforme descrito no item 2.4.

Fração dialisada: primeiramente, para o preparo da membrana de dialise, em uma fração do digerido gástrico (frasco erlenmeyer) foram adicionados 0,75 mL de solução de pancreatina $0,004 \text{ g mL}^{-1}$ e extrato de bile $0,025 \text{ g mL}^{-1}$ e titulada com solução de NaHCO_3 1 mol L^{-1} até pH $7,2 \pm 0,2$, para determinação da acidez titulável. Após o preparo da membrana de dialise (25 cm de comprimento contendo 20 mL de solução de água purificada mais o volume de NaHCO_3 gasto na acidez titulável), a mesma foi adicionada a uma fração do digerido gástrico (frasco erlenmeyer) e encubado em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 0,75 mL da solução de pancreatina e extrato de bile e prosseguiu-se a incubação por mais 2 horas. Finalizada a incubação, o conteúdo da membrana (fração dialisada) foi transferido para um tubo graduado e determinada a concentração dos minerais usando o ICP OES.

Cálculo do teor bioacessível de minerais: A porcentagem da fração solúvel (S%) foi calculada da seguinte forma: % de solubilidade = $100 \times S/C$, onde S = teor de mineral solúvel (em mg ou μm / 100 mL de amostra reconstituída) e C = teor total do mineral na amostra (em mg ou μm / 100 mL de amostra reconstituída). A porcentagem da fração dialisada (D%) foi calculada da seguinte forma: % de diálise = $100 D/C$, onde D = teor de mineral do dialisado (em mg ou μm / 100 mL de amostra reconstituída) e C = teor total de mineral da amostra (em mg ou μm / 100 mL de amostra reconstituída).

2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ DP de três repetições analíticas. As análises estatísticas (ANOVA) e multivariadas, a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) foram realizadas utilizando os softwares Xlstat (Addinsoft, França), considerando o nível de 95% de confiança e Pirouette (Infometrix, Woodinville, WA, EUA), respectivamente.

3. Resultados

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados dos teores totais, fração solúvel (S%) e dialisada (D%) obtidos para os microminerais (Cu, Fe, Mn e Zn) e macrominerais (Ca, K, Mg, Na e P), respectivamente. Os resultados mostraram uma variação do teor total entre os diferentes tipos de FI, mesmo entre grupos específicos como mesma marca, tipo de proteína e faixa etária. As amostras FA2-PT e FA2-NZ foram às únicas que apresentaram resultados significativamente iguais para os nove elementos estudados. Este fato não foi observado para as demais marcas ou amostras.

Nas Tabelas 3 e 4 é possível observar que as frações solúveis para os minerais apresentaram maiores teores do que os dialisados (em mg ou µg por grama e em porcentagem), exceto para a amostra LF-UHT onde a porcentagem de fração solúvel (S%) e porcentagem de fração dialisada (D%) do Fe (57% e 61%, respectivamente) e do Mn (22,5% e 23,5%, respectivamente) foram iguais, demonstrando que todo o conteúdo de Fe e Mn solúvel nesta amostra foi dialisado. A bioacessibilidade do elemento Na não foi avaliada devido à quantidade de NaHCO₃ adicionado durante a realização dos ensaios. Em relação ao teor total, o Na variou de 17,6 (FC2-USA) a 64,9 mg 100 mL⁻¹ de amostra (LF-UHT), sendo as maiores concentrações encontradas nos leites UHT e em pó reconstituído.

Em geral, o ensaio de solubilidade para os elementos K, Mg e P nas FI e leites foram maiores que 60% em relação ao teor total. Nos leites UHT, o K, Mg, P, Zn apresentaram S% acima de 80%, resultado comparável ao estudo de Sanches, Peixoto & Cadore (2019) onde as S% foram acima de 60% para o Zn e de 70% para Ca, K, Mg, Na e P em leites UHT integrais, semidesnatados e desnatados. A S% do Ca apresentou uma variação maior, de 25% (LF-PO) a 94% (FC2-BR). O Mn de 11% (FA2-BR/SOY) a 120% (LH-PAS) e o Zn de 4% (FD3-BR/SOY) a 111% (FD2-BR). Essas variações provavelmente estão associadas aos teores totais dos elementos, processos tecnológicos e as diferentes composições das amostras. O elemento Cu obteve S% maior que 60% para as FI, exceto para FC3-BR (46%). Para os leites, apenas a S% do LA-PO e LE-PO ficaram acima do limite de quantificação (LOQ) do Cu (40% e 63%, respectivamente).

Tabela 3

Concentração média ($\bar{x} \pm DP$ em $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de amostra, n=3) do total, solúvel e dialisado e porcentagem (%) das frações bioacessíveis para Cu, Fe, Mn e Zn.

Amostra		Cu		Fe		Mn		Zn	
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)
FA1-BR	Total	63 $\pm$ 2		774 $\pm$ 15		14,2 $\pm$ 0,3		746 $\pm$ 10	
	Solúvel	58 $\pm$ 1	93 $\pm$ 2	560 $\pm$ 5	72 $\pm$ 1	12,4 $\pm$ 0,7	87 $\pm$ 5	495 $\pm$ 40	66 $\pm$ 5
	Dialisado	12 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	12,4 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 1	52 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1
FA1-CH	Total	61 $\pm$ 1		968 $\pm$ 9		15,4 $\pm$ 0,1		720 $\pm$ 9	
	Solúvel	62 $\pm$ 2	101 $\pm$ 3	985 $\pm$ 16	102 $\pm$ 2	13,6 $\pm$ 0,2	89 $\pm$ 1	516 $\pm$ 46	72 $\pm$ 6
	Dialisado	13 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	331 $\pm$ 9	34 $\pm$ 1	3,1 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 1	79 $\pm$ 5	11 $\pm$ 1
FB1-BR	Total	63 $\pm$ 1		641 $\pm$ 17		21,8 $\pm$ 0,3		614 $\pm$ 11	
	Solúvel	70 $\pm$ 5	112 $\pm$ 8	968 $\pm$ 9	151 $\pm$ 1	17,0 $\pm$ 0,4	78 $\pm$ 2	326 $\pm$ 14	53 $\pm$ 2
	Dialisado	12 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	93 $\pm$ 5	15 $\pm$ 1	2,1 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 1	44 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1
FC1-BR	Total	43 $\pm$ 1		828 $\pm$ 24		4,5 $\pm$ 0,1		811 $\pm$ 27	
	Solúvel	47,1 $\pm$ 0,2	109,9 $\pm$ 0,4	810 $\pm$ 21	98 $\pm$ 3	4,1 $\pm$ 0,2	92 $\pm$ 5	644 $\pm$ 22	79 $\pm$ 3
	Dialisado	10 $\pm$ 1	23 $\pm$ 3	83 $\pm$ 7	10 $\pm$ 1	0,61 $\pm$ 0,02	13,7 $\pm$ 0,4	45 $\pm$ 2	5,6 $\pm$ 0,2
FD1-BR/SOY	Total	36,0 $\pm$ 0,4		816 $\pm$ 8		33,7 $\pm$ 0,4		492 $\pm$ 7	
	Solúvel	32 $\pm$ 1	88 $\pm$ 3	142 $\pm$ 23	17 $\pm$ 3	9,4 $\pm$ 0,8	28 $\pm$ 2	50 $\pm$ 8	10 $\pm$ 2
	Dialisado	7,3 $\pm$ 0,4	20 $\pm$ 1	15,4 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,1	0,20 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,1	4 $\pm$ 1	0,8 $\pm$ 0,1
FD1-NZ	Total	68 $\pm$ 2		970 $\pm$ 23		6,3 $\pm$ 0,2		564 $\pm$ 15	
	Solúvel	73 $\pm$ 1	108 $\pm$ 2	1073 $\pm$ 22	111 $\pm$ 2	5,5 $\pm$ 0,4	87 $\pm$ 6	439 $\pm$ 10	78 $\pm$ 2
	Dialisado	13,8 $\pm$ 0,4	21 $\pm$ 1	105 $\pm$ 4	11 $\pm$ 1	0,70 $\pm$ 0,03	11 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2	5,4 $\pm$ 0,4
FA2-BR/SOY	Total	75 $\pm$ 2		753 $\pm$ 17		41,8 $\pm$ 0,8		824 $\pm$ 16	
	Solúvel	53 $\pm$ 1	71 $\pm$ 2	785 $\pm$ 14	104 $\pm$ 2	4,6 $\pm$ 0,2	11 $\pm$ 1	512 $\pm$ 17	62 $\pm$ 2
	Dialisado	12 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	124 $\pm$ 4	17 $\pm$ 1	0,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 8	7 $\pm$ 1
FA2-PT	Total	62 $\pm$ 2		782 $\pm$ 25		14,2 $\pm$ 0,9		663 $\pm$ 23	
	Solúvel	61 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	722 $\pm$ 14	92 $\pm$ 2	6,6 $\pm$ 0,3	47 $\pm$ 2	398 $\pm$ 31	60 $\pm$ 5
	Dialisado	14 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	65 $\pm$ 5	8 $\pm$ 1	<LOQ	<LOQ	22 $\pm$ 2	3,3 $\pm$ 0,2
FA2-NZ	Total	63 $\pm$ 1		790 $\pm$ 6		14,0 $\pm$ 0,3		671 $\pm$ 10	
	Solúvel	61 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4	678 $\pm$ 27	86 $\pm$ 3	5,1 $\pm$ 0,5	37 $\pm$ 4	304 $\pm$ 12	45 $\pm$ 2
	Dialisado	13,8 $\pm$ 0,3	22 $\pm$ 1	51 $\pm$ 3	6,5 $\pm$ 0,4	<LOQ	<LOQ	20 $\pm$ 2	3,0 $\pm$ 0,3
FB2-BR	Total	56 $\pm$ 1		473 $\pm$ 3		18,8 $\pm$ 0,2		581 $\pm$ 6	

Amostra		Cu		Fe		Mn		Zn	
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)
FB2-USA	Solúvel	54±2	96±3	454±4	96±1	8,2±1,0	44±5	322±9	55±2
	Dialisado	12,2±0,1	21,6±0,2	51±5	11±1	0,2±0,1	1,3±0,7	13±1	2,2±0,3
	Total	72±1		1129±14		8,4±0,1		630±7	
FC2-BR	Solúvel	74±1	104±2	1479±44	131±4	7,4±0,4	88±5	524±18	83±3
	Dialisado	15±1	21±1	312±11	28±1	0,4±0,04	4±1	13±1	2,0±0,2
	Total	58±1		584±10		20,0±0,7		864±25	
FC2-USA	Solúvel	55±1	95±1	717±13	123±2	17,6±0,9	88±4	762±35	88±4
	Dialisado	11,2±0,4	19±1	71±6	12±1	1,3±0,2	6±1	32±4	4±1
	Total	70±1		1104±6		14,6±0,2		803±6	
FD2-BR	Solúvel	65±1	93±2	1314±44	119±4	14,1±0,3	96±2	665±21	83±3
	Dialisado	15±1	21±1	149±3	13,5±0,3	1,6±0,1	11±1	36±2	4,5±0,2
	Total	43±2		435±11		7,0±0,1		506±13	
FA3-BR	Solúvel	44±1	104±2	472±1	108,5±0,2	4,5±1,6	64±23	564±91	111±18
	Dialisado	11±1	26±1	72±1	16,6±0,3	0,37±0,03	5±1	28±1	5,5±0,3
	Total	57±2		1081±25		4,8±0,2		669±18	
FB3-BR	Solúvel	51±1	91±3	119±8	11±1	1,34±0,01	28,0±0,2	33±5	5±1
	Dialisado	13±1	24±1	17±3	1,6±0,2	0,5±0,1	10±2	6±1	0,9±0,2
	Total	51±1		1047±7		18,1±0,1		535±6	
FC3-BR	Solúvel	50±1	97±2	1059±13	101±1	11,6±0,1	64±1	241±1	45,1±0,3
	Dialisado	11,9±0,1	23,2±0,3	82±4	7,8±0,4	0,6±0,1	3±1	12±1	2,2±0,3
	Total	93±1		1142±10		11,4±0,2		690±2	
FD3-BR/SOY	Solúvel	42±4	46±4	1142±38	100±3	8,7±0,8	77±7	463±37	67±5
	Dialisado	8±2	9±2	80±7	7±1	0,8±0,1	7±1	25±5	4±1
	Total	36,1±0,3		1128±7		31,0±0,5		500±2	
LG-PAS	Solúvel	28±1	78±3	114±21	10±2	6,7±0,6	22±2	18±10	4±2
	Dialisado	7,5±0,4	21±1	12±1	1,1±0,1	0,25±0,03	0,8±0,1	2,7±0,4	0,5±0,1
	Total	4±1		8,9±0,1		2,0±0,9		365±9	
LH-PAS	Solúvel	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,7±0,2	86±11	195±9	53±3
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17±1	4,7±0,4
	Total	1,5±0,1		8±1		1,3±0,1		383±8	
	Solúvel	<LOQ	<LOQ	5±1	64±12	1,7±0,5	120±35	225±19	59±5

Amostra		Cu		Fe		Mn		Zn	
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm$ DP (%)
LI-PAS	Dialisado	<LOQ	<LOQ	4 $\pm$ 1	49 $\pm$ 6	<LOQ	<LOQ	12 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
	Total	3,0 $\pm$ 0,2		7,0 $\pm$ 0,4		1,5 $\pm$ 1,5		364 $\pm$ 4	
	Solúvel	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,7 $\pm$ 0,1	113 $\pm$ 3	198 $\pm$ 17	55 $\pm$ 5
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1
LA-PO	Total	3,6 $\pm$ 0,1		2321 $\pm$ 295		14,5 $\pm$ 1,4		1124 $\pm$ 18	
	Solúvel	1,4 $\pm$ 0,2	40 $\pm$ 6	1000 $\pm$ 30	43 $\pm$ 1	11,6 $\pm$ 0,6	80 $\pm$ 4	938 $\pm$ 48	83 $\pm$ 4
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	12 $\pm$ 2	0,5 $\pm$ 0,1	<LOQ	<LOQ	5 $\pm$ 1	0,4 $\pm$ 0,1
	Total	4,4 $\pm$ 0,1		1327 $\pm$ 186		5,5 $\pm$ 0,7		459 $\pm$ 9	
LE-PO	Solúvel	2,8 $\pm$ 0,5	62 $\pm$ 11	469 $\pm$ 68	35 $\pm$ 5	2,6 $\pm$ 0,1	47 $\pm$ 1	213 $\pm$ 19	46 $\pm$ 4
	Dialisado	0,7 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	0,5 $\pm$ 0,3	<LOQ	<LOQ	3 $\pm$ 2	0,7 $\pm$ 0,5
	Total	3,2 $\pm$ 0,3		17,7 $\pm$ 0,1		3,7 $\pm$ 0,2		423 $\pm$ 5	
	Solúvel	<LOQ	<LOQ	17,4 $\pm$ 0,3	99 $\pm$ 2	1,62 $\pm$ 0,04	44 $\pm$ 1	212 $\pm$ 16	50 $\pm$ 4
LF-PO	Dialisado	<LOQ	<LOQ	3,5 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 1	0,41 $\pm$ 0,01	10,9 $\pm$ 0,1	31 $\pm$ 2	7,3 $\pm$ 0,5
	Total	2,8 $\pm$ 0,3		1177 $\pm$ 121		5,0 $\pm$ 0,2		1269 $\pm$ 21	
	Solúvel	<LOQ	<LOQ	1180 $\pm$ 27	100 $\pm$ 2	2,54 $\pm$ 0,02	50,9 $\pm$ 0,3	1014 $\pm$ 28	80 $\pm$ 2
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	314 $\pm$ 8	27 $\pm$ 1	1,13 $\pm$ 0,01	22,5 $\pm$ 0,3	215 $\pm$ 5	17,0 $\pm$ 0,4
LJ-UHT	Total	2,0 $\pm$ 0,5		27 $\pm$ 4		1,1 $\pm$ 0,2		361 $\pm$ 12	
	Solúvel	<LOQ	<LOQ	23 $\pm$ 3	87 $\pm$ 9	0,88 $\pm$ 0,01	78 $\pm$ 1	318 $\pm$ 17	88 $\pm$ 5
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	13,0 $\pm$ 0,3	48 $\pm$ 1	0,51 $\pm$ 0,01	44,6 $\pm$ 0,1	65 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1
	Total	2,2 $\pm$ 0,6		21 $\pm$ 2		2,2 $\pm$ 0,4		358 $\pm$ 4	
LF-UHT	Solúvel	<LOQ	<LOQ	11,9 $\pm$ 0,3	57 $\pm$ 2	0,49 $\pm$ 0,01	22,5 $\pm$ 0,3	349 $\pm$ 6	97 $\pm$ 2
	Dialisado	<LOQ	<LOQ	12,8 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 1	0,51 $\pm$ 0,01	23,5 $\pm$ 0,2	67 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1

F= Fórmula Infantil; L= leite; A a J= marca; 1 a 3= faixa etária; BR= Brasil; CH=Chile; NZ=Nova Zelândia; PT=Portugal e USA=Estados Unidos da América; PAS= Leite Pasteurizado, PO= Leite em pó; UHT= Leite UHT; SOY=FI de soja; LOQ= limite de quantificação (Cu e Mn= 0,2 μg 100mL⁻¹ de amostra; Fe= 0,5 μg 100mL⁻¹ de amostra). As FI FA1-CH, FB2-USA, FC2-USA e o leite LE-PO são fortificados com Fe; o leite LA-PO e o LA-UHT são fortificados com Fe e Zn.

Tabela 4.

Concentração média ($\bar{x} \pm DP$ em mg 100 mL⁻¹ de amostra, n-3) do total, solúvel e dialisado e porcentagem (%) das frações bioacessíveis para o Ca, K, Mg, P e Na.

Amostra		Ca		K		Mg		P		Na
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$
FA1-BR	Total	40,7±0,8		77,6±2,1		8,7±0,2		23,6±0,7		21,0±0,7
	Solúvel	11,2±1,3	28±3	91,9±0,7	119±1	8,6±0,1	99±1	21,7±0,2	92±1	
	Dialisado	0,7±0,2	1,7±0,5	29,1±0,4	38±1	2,9±0,1	33±1	7,3±0,1	31±0,4	
FA1-CH	Total	46,8±1,1		115,3±4,5		7,3±0,2		30,0±0,8		22,6±0,9
	Solúvel	12,5±0,8	27±2	121,4±3,5	105±3	7,1±0,1	97±1	29,6±0,2	99±0,5	
	Dialisado	1,5±0,5	3±1	44,3±0,8	38±1	2,6±0,1	35±1	9,8±0,2	33±1	
FB1-BR	Total	57,5±0,7		81,8±1,3		6,1±0,1		32,2±0,4		21,0±0,3
	Solúvel	30,1±0,6	52±1	98,5±4,0	120±5	5,8±0,1	96±2	31,3±1,0	97±3	
	Dialisado	6,0±0,4	10±1	32,3±0,8	40±1	1,84±0,04	30±1	9,4±0,3	29±1	
FC1-BR	Total	46,6±1,3		99,1±0,1		6,1±0,2		35,8±1,2		21,3±0,7
	Solúvel	23,5±1,1	50±2	106,4±0,7	107±1	6,1±0,1	100±2	35,9±0,5	100±1	
	Dialisado	1,8±0,4	4±1	37,7±0,7	38±1	1,34±0,01	22±0,1	11,3±0,2	32±1	
FD1-BR/SOY	Total	49,7±0,4		72,0±1,3		5,53±0,04		29,7±0,4		21,5±0,4
	Solúvel	19,4±1,8	39±4	80,6±0,8	112±1	5,1±0,1	93±1	20,2±0,5	68±2	
	Dialisado	0,6±0,2	1,2±0,4	25,8±0,7	36±1	0,8±0,1	15±1	5,6±0,2	19±0,5	
FD1-NZ	Total	56,8±0,9		86,3±1,4		6,3±0,1		36,9±0,7		23,1±0,4
	Solúvel	26,6±4,9	48±9	100,4±1,5	116±2	6,9±0,2	110±3	42,2±0,8	114±2	
	Dialisado	1,7±0,2	3,0±0,3	36,1±0,7	42±1	1,60±0,02	25,3±0,3	13,8±0,3	37±1	
FA2-BR/SOY	Total	67,5±1,6		87,6±1,6		8,1±0,2		46,8±1,0		25,9±0,5
	Solúvel	38,2±1,5	57±2	109,5±0,2	125±0,2	8,3±0,2	104±2	42,2±0,8	90±2	
	Dialisado	5,7±1,4	8±2	35,3±0,8	40±1	2,9±0,1	36±1	14,0±0,2	30±0,5	
FA2-PT	Total	47,9±1,7		81,7±2,6		7,2±0,2		27,9±1,1		28,5±0,9
	Solúvel	26,1±1,5	54±3	81,8±2,0	100±2	6,9±0,2	96±3	25,4±0,8	91±3	
	Dialisado	0,6±0,2	1±0,4	30,8±1,4	38±2	1,2±0,2	16±2	9,1±0,4	33±2	
FA2-NZ	Total	47,6±0,6		79,8±0,7		7,2±0,1		26,7±0,5		27,8±0,8
	Solúvel	19,4±1,5	41±3	78,9±3,4	99±4	6,9±0,4	96±5	23,9±1,2	90±4	
	Dialisado	0,5±0,1	1±0,1	30,1±0,4	38±0,5	1,0±0,1	14±1	8,5±0,3	32±1	
FB2-BR	Total	70,3±0,2		106,7±0,9		6,0±0,04		55,5±0,4		34,1±0,4
	Solúvel	37,3±0,02	53±0,1	108,0±4,1	101±4	3,8±0,02	64±0,4	50,0±3,2	90±6	
	Dialisado	1,1±0,3	2±0,5	40,3±1,0	38±1	0,9±0,1	15±1	15,3±0,5	28±1	
FB2-USA	Total	57,2±0,2		113,2±0,9		5,2±0,04		37,3±0,3		22,3±0,3

Amostra		Ca		K		Mg		P		Na
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$
FC2-BR	Solúvel	46,3±3,9	81±7	129,8±5,3	115±5	5,3±0,1	102±3	39,2±1,2	105±3	24,9±0,5
	Dialisado	0,9±0,2	2±0,3	49,6±0,8	44±1	0,9±0,04	18±1	12,1±0,1	33±0,2	
	Total	67,4±1,0		101,0±1,1		6,5±0,1		36,1±0,5		
	Solúvel	63,5±4,7	94±7	113,1±1,1	112±1	6,4±0,1	99±1	34,9±0,6	97±2	
	Dialisado	0,2±0,2	0,4±0,3	40,1±0,3	40±0,3	1,0±0,1	15±1	10,8±0,1	30±0,3	
FC2-USA	Total	42,5±0,2		81,9±0,9		6,9±0,04		31,9±0,3		17,6±0,3
	Solúvel	37,8±3,6	89±9	88,8±0,8	108±1	6,6±0,2	96±3	31,7±0,4	100±1	
	Dialisado	0,8±0,2	2±0,5	35,2±0,8	43±1	1,3±0,02	20±0,3	9,7±0,2	30±0,5	
FD2-BR	Total	44,4±1,0		74,8±1,7		5,2±0,1		25,4±0,6		19,4±0,5
	Solúvel	40,4±18,0	91±41	84,3±0,5	113±1	5,6±0,9	109±18	21,9±1,4	86±5	
	Dialisado	1,0±0,2	2±0,3	31,3±0,5	42±1	1,0±0,02	19±0,4	7,9±0,2	31±1	
FA3-BR	Total	70,9±2,0		94,1±0,9		8,1±0,3		42,3±1,2		29,1±0,7
	Solúvel	39,0±0,6	55±1	104,7±0,5	111±0,5	7,7±0,04	95±0,5	33,9±0,1	80±0,2	
	Dialisado	1,8±0,4	3±1	30,7±1,6	33±2	1,3±0,03	16±0,3	9,1±0,3	22±1	
FB3-BR	Total	78,7±0,4		80,7±0,4		5,7±0,02		44,8±0,1		20,6±0,1
	Solúvel	36,3±1,3	46±2	92,8±1,3	115±2	5,8±0,04	102±1	45,8±0,9	102±2	
	Dialisado	2,7±0,2	3±0,3	32,8±0,9	41±1	1,1±0,02	20±0,3	14,0±0,5	31±1	
FC3-BR	Total	73,3±0,6		82,5±1,2		6,8±0,02		49,6±0,6		29,9±0,3
	Solúvel	45,4±3,8	62±5	87,8±1,8	106±2	6,9±0,2	101±3	50,4±1,6	102±3	
	Dialisado	3,0±0,2	4±0,2	29,8±0,4	36±0,5	1,3±0,02	19±0,4	14,4±0,2	29±0,4	
FD3-BR/SOY	Total	54,3±1,0		71,0±0,1		5,0±0,05		32,3±0,4		25,7±0,3
	Solúvel	19,8±2,4	36±4	80,2±0,9	113±1	4,5±0,1	91±2	21,0±0,4	65±1	
	Dialisado	1,4±0,1	3±0,2	22,4±1,0	32±1	0,8±0,01	17±0,2	5,4±0,2	17±1	
LG-PAS	Total	105,1±0,2		146,6±0,4		8,5±0,1		77,8±0,3		33,5±0,1
	Solúvel	36,3±2,1	35±2	137,8±5,1	94±3	8,2±0,4	97±4	79,3±3,3	102±4	
	Dialisado	7,8±0,2	8±0,1	60,3±1,5	41±1	2,3±0,02	27±0,3	28,3±0,9	36±1	
LH-PAS	Total	107,5±4,2		167,5±1,5		9,2±0,2		80,8±0,9		34,7±0,9
	Solúvel	59,2±5,4	55±5	153,8±3,3	92±2	9,3±0,2	100±2	80,9±1,9	100±2	
	Dialisado	7,6±0,4	7±0,3	63,0±0,9	38±1	2,5±0,1	27±1	25,8±1,1	32±1	
LI-PAS	Total	103,0±2,7		155,6±2,0		8,8±0,04		77,3±0,7		34,1±0,3
	Solúvel	30,4±0,9	30±1	156,7±0,1	101±0,1	9,2±0,02	104±0,2	82,4±0,6	107±1	
	Dialisado	7,6±1,0	7±1	62,2±0,9	40±1	2,3±0,1	26±1	24,3±2,2	31±3	
LA-PO	Total	184,8±11,2		180,6±2,0		10,6±0,1		98,9±3,2		49,4±0,2
	Solúvel	130,1±2,2	70±1	179,7±6,4	100±4	10,7±0,4	100±3	93,4±3,2	94±3	
	Dialisado	15,5±1,7	8±1	70,3±2,0	39±1	1,6±0,1	15±1	11,9±1,7	12±2	
LE-PO	Total	130,2±1,3		183,8±1,5		11,1±0,2		98,4±0,3		49,3±0,7

Amostra		Ca		K		Mg		P		Na
		$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$	Bioacessibilidade $\pm DP$ (%)	$\bar{x} \pm DP$
LF-PO	Solúvel	61,5 $\pm$ 1,0	47 $\pm$ 1	188,7 $\pm$ 4,7	103 $\pm$ 2,6	11,0 $\pm$ 0,3	99 $\pm$ 2	97,4 $\pm$ 2,7	99 $\pm$ 3	50,5 $\pm$ 0,9
	Dialisado	11,8 $\pm$ 2,8	9 $\pm$ 2	61,1 $\pm$ 2,6	33 $\pm$ 1,4	2,7 $\pm$ 0,2	25 $\pm$ 2	17,6 $\pm$ 2,0	18 $\pm$ 2	
	Total	134,9 $\pm$ 2,4		178,0 $\pm$ 2,4		11,1 $\pm$ 0,2		93,6 $\pm$ 1,4		
	Solúvel	33,4 $\pm$ 3,3	25 $\pm$ 2	153,1 $\pm$ 7,7	86 $\pm$ 4,4	9,5 $\pm$ 0,4	86 $\pm$ 4	73,6 $\pm$ 4,5	79 $\pm$ 5	
	Dialisado	3,3 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,1	56,4 $\pm$ 0,8	32 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,1	29 $\pm$ 0,4	26,7 $\pm$ 0,5	29 $\pm$ 0,5	
LA-UHT	Total	115,3 $\pm$ 1,0		162,5 $\pm$ 0,6		9,9 $\pm$ 0,1		103,2 $\pm$ 3,3		57,4 $\pm$ 1,3
	Solúvel	44,9 $\pm$ 3,6	39 $\pm$ 3	166,3 $\pm$ 5,5	102 $\pm$ 3,4	10,1 $\pm$ 0,2	103 $\pm$ 2	96,3 $\pm$ 2,9	93 $\pm$ 3	
	Dialisado	1,7 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,2	65,5 $\pm$ 1,5	40 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,02	27 $\pm$ 0,2	36,0 $\pm$ 0,8	35 $\pm$ 1	
LJ-UHT	Total	109,6 $\pm$ 2,9		159,8 $\pm$ 3,3		9,5 $\pm$ 0,2		94,4 $\pm$ 7,4		57,9 $\pm$ 1,6
	Solúvel	52,7 $\pm$ 0,0	48 $\pm$ 0,1	163,4 $\pm$ 0,9	102 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 0,3	106 $\pm$ 3	92,8 $\pm$ 3,6	98 $\pm$ 4	
	Dialisado	1,3 $\pm$ 0,3	1 $\pm$ 0,2	67,2 $\pm$ 1,6	42 $\pm$ 1,0	2,6 $\pm$ 0,02	27 $\pm$ 0,2	34,8 $\pm$ 0,9	37 $\pm$ 1	
LF-UHT	Total	110,1 $\pm$ 4,9		153,6 $\pm$ 6,9		9,2 $\pm$ 0,2		89,9 $\pm$ 6,3		64,9 $\pm$ 1,9
	Solúvel	88,1 $\pm$ 5,7	80 $\pm$ 5	150,8 $\pm$ 6,5	98 $\pm$ 4,2	9,1 $\pm$ 0,3	99 $\pm$ 3	83,1 $\pm$ 2,7	93 $\pm$ 3	
	Dialisado	1,4 $\pm$ 0,3	1 $\pm$ 0,3	66,1 $\pm$ 1,9	43 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 0,03	27 $\pm$ 0,4	33,6 $\pm$ 0,8	37 $\pm$ 1	

F= Fórmula Infantil; L= leite; A a J= marca; 1 a 3= faixa etária; BR= Brasil; CH=Chile; NZ=Nova Zelândia; PT=Portugal e USA=Estados Unidos da América; PAS= Leite Pasteurizado, PO= Leite em pó; UHT= Leite UHT; SOY=FI de soja. A fração bioacessível do Na não foi realizada devido ao volume de NaHCO₃ adicionado durante o ensaio. A amostra de leite LA-PO é fortificada com Ca.

Para a avaliação da similaridade da composição dos minerais (Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, K, Mg, P e Na) nas diferentes amostras de FI e leites foi utilizada a análise de componentes principais. Os resultados foram organizados em uma matriz com dimensões 27 x 9, sendo as linhas correspondentes às amostras (FI e leites) e as colunas os valores médios dos teores obtidos para os nove elementos estudados. Na análise de componente principais (PCA) o pré-processamento utilizado foi o auto escalamento e as componentes principais (PC) 1 e 2 foram selecionadas para a classificação das amostras. Os gráficos gerados de scores (amostras) e de loadings (elementos) são apresentados na Fig. 1.

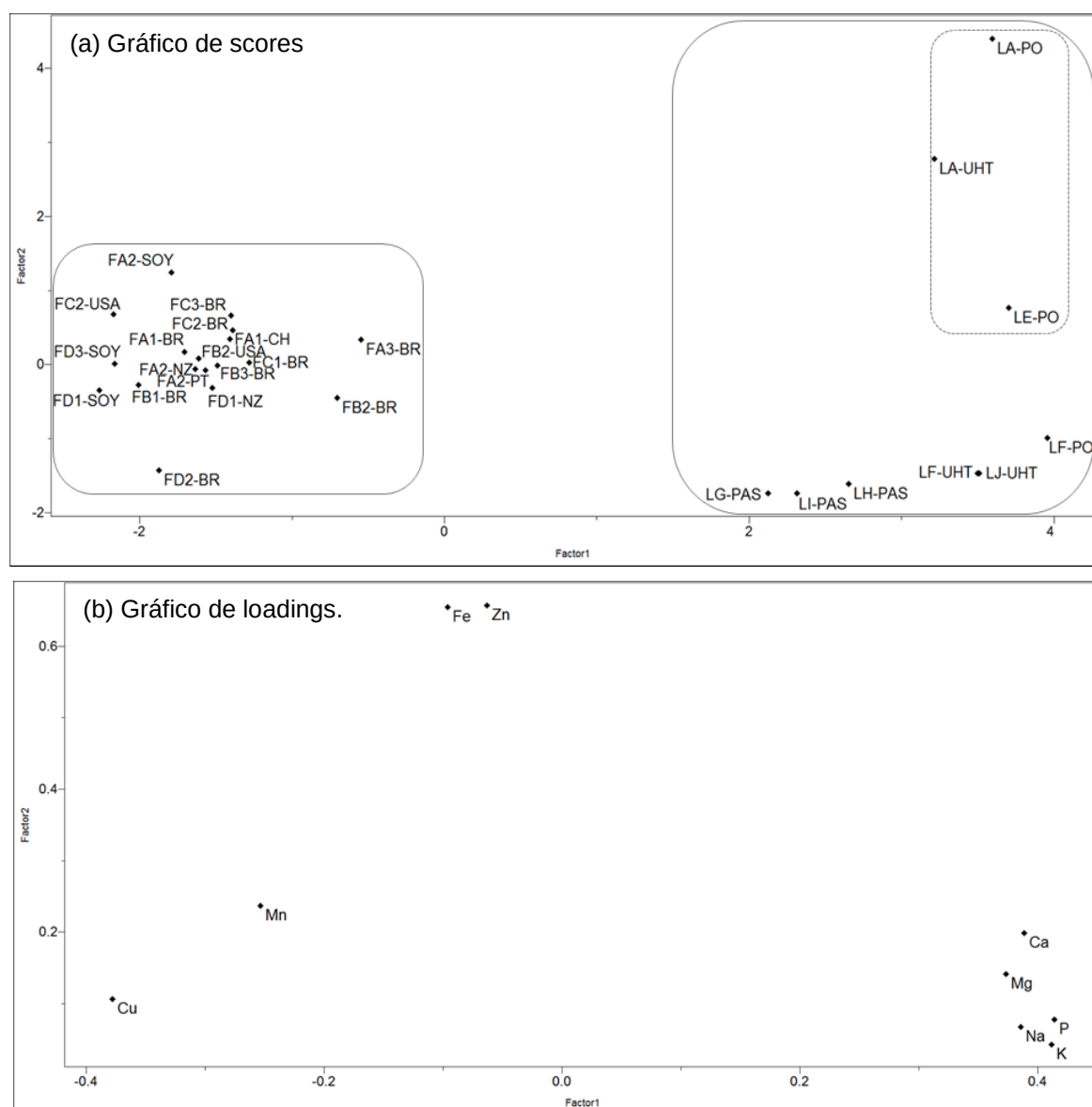


Fig. 1. Análise de componentes principais dos teores de minerais nas amostras de FI e leites. (a) Gráfico de scores e (b) Gráfico de loadings. F= Fórmula Infantil; L= leite; A a J= marca; 1 a 3= faixa etária; BR= Brasil; CH=Chile; NZ=Nova Zelândia; PT=Portugal e USA=Estados Unidos da América; PAS= Leite Pasteurizado, PO= Leite em pó; UHT= Leite UHT; SOY=FI de soja.

A PC 1 e a PC 2 explicaram 61,1% e 20,1%, respectivamente, somando 81,2% da variância total dos dados. A partir dos resultados da PCA foi possível observar a seguinte classificação:

- 1) Grupo formado pelas amostras de FI que apresentaram em sua composição os maiores valores médios de Cu e Mn e menores teores de Ca, Mg, K, Na e P em relação a composição dos leites.
- 2) Grupo das amostras de leites com maiores valores médios de Ca, Mg, K, Na e P e menores teores de Cu e Mn em relação a composição das FI. Sendo possível observar a formação de um subgrupo composto pelas amostras de leites fortificados que apresentaram os maiores teores de Fe (LA-PO, LA-UHT e LE-PO) e Zn (LA-PO e LA-UHT).

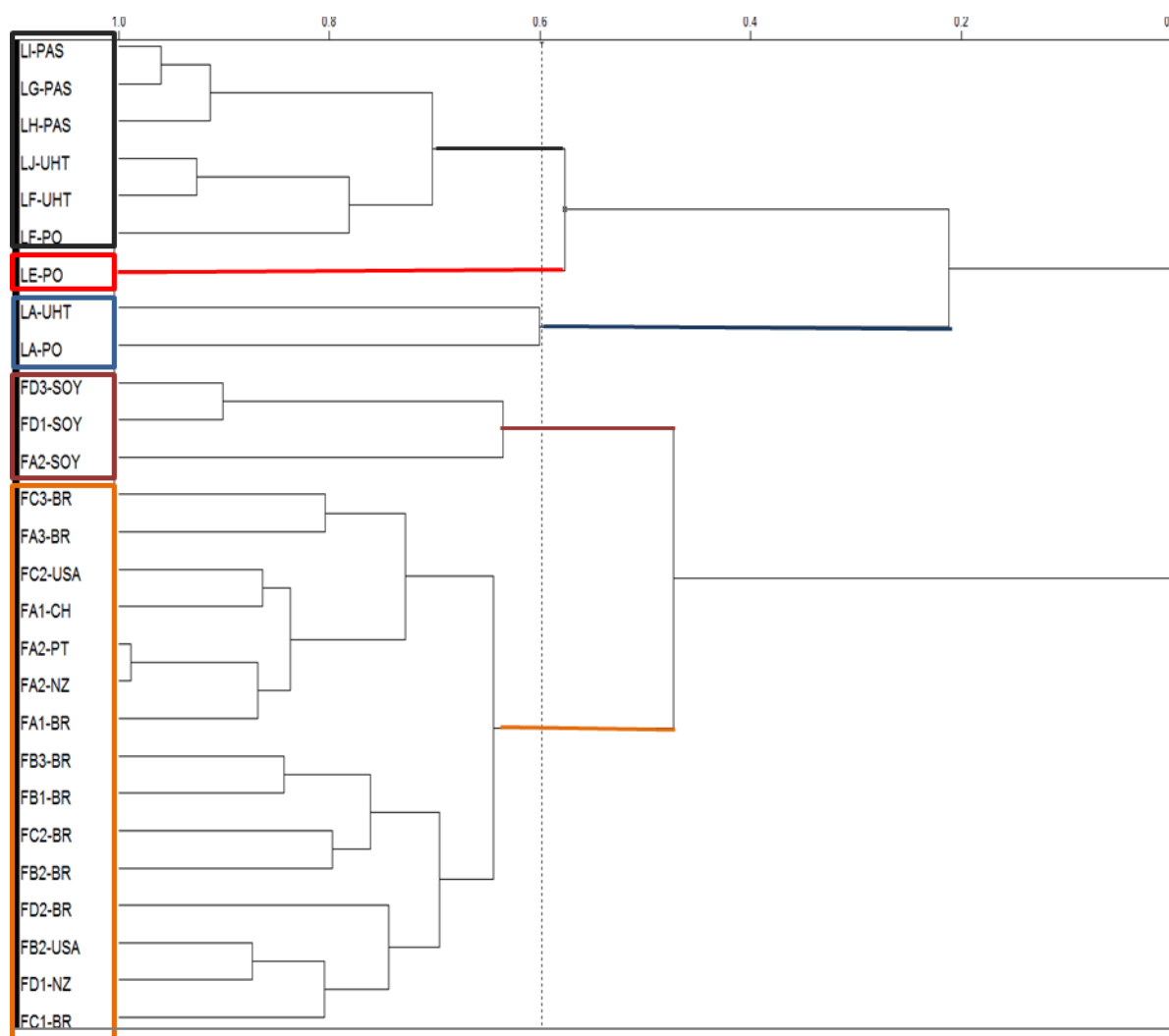


Fig. 2. Dendrograma obtido pela análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) a partir dos teores de minerais das amostras de fórmulas infantis e leites.

A partir da análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA), também foi possível visualizar a similaridade entre as amostras de FI e leites através do dendograma originado (Fig. 2.) sendo que neste caso foi possível classificar as amostras em cinco grupos de acordo com sua composição mineral: 1) amostras de leite não fortificadas; 2) amostras de leite fortificadas da marca E; 3) amostras de leite fortificados da marca A; 4) amostras de FI com proteína de soja em sua composição; 5) amostras de FI com proteína de leite em sua composição.

É interessante destacar que a HCA complementa a PCA permitindo a classificação das FI em relação a sua composição, sendo a principal diferença a fonte proteica do alimento (soja ou leite). Entre as FI a base de soja há uma nítida diferença entre a amostra da marca A (FA2-BR/SOY) e a marca D (FD1-BR/SOY e FD3-BR/SOY).

4. Discussão

Os teores totais encontrados para os 9 elementos nas FI ficaram dentro das faixas recomendadas pelos regulamentos de FI Brasileiros e pelo Codex (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; FAO/WHO, 2016) e também em acordo com as concentrações informadas nos rótulos (± 20 de desvio) (BRASIL, 2003).

Em comparação, os teores totais de Fe, Cu, Mn e Zn encontrados nas FI foram maiores que nos leites não fortificados em 162, 63, 37 e 2 vezes, respectivamente, enquanto que para P-Na, Ca-K e Mg foram até 4, 3 e 2 vezes, respectivamente, maiores nos leites. Estes resultados concordam com o estudo de Sager, McCulloch, & Schoder (2018) e são devido as FI serem elaboradas para se assemelhar a constituição do leite materno, o que permite um melhor equilíbrio da quantidade de nutrientes para o desenvolvimento do lactente, conforme relatado por Vieira da Silva *et al.*, 2013; Lönnerdal & Hernell, 2016; Martin, Ling & Blackburn, 2016; Zou *et al.*, 2016.

Nas amostras de leites fortificadas, os teores totais de Ca, Fe e Zn foram maiores que nas FI e demais leites. Para o Na, em geral, as FI de 0-6 meses apresentaram os menores teores e os leites UHT os maiores. O tipo e a

quantidade de aditivos adicionados aos leites podem ser a causa na concentração de Na, sendo que seu teor aumenta de acordo com o acréscimo de estabilizantes informados nos rótulos (Tabela 2). Estes resultados demonstram que o tipo de leite fornecido à criança pode influenciar em seu estado nutricional, uma vez que o nível no qual o mineral está presente nos produtos lácteos (e nas FI) é resultado de um equilíbrio dinâmico dos minerais entre as fases aquosa e coloidal do leite, do tratamento tecnológico (osmose reversa, ultrafiltração por membrana e pulverização) e da fortificação mineral aplicada durante o processo de fabricação (Martin *et al.*, 2016; Poitevin, 2016). Devido a estes fatores, a OMS observa que o leite de vaca, principalmente quando cru e puro, não deve ser administrado a menores de 1 ano como substituto do leite humano ou FI (WHO, 2014).

O tipo de processamento, estado físico da amostra (sólida ou líquida), bem como a forma que o elemento se liga aos componentes do leite e seus teores totais, também podem influenciar nas frações bioacessíveis dos elementos (Drago & Valencia, 2004; Perales *et al.* 2005). Neste estudo foram evidenciados maiores D% do Mn e Zn nos leites UHT que nos demais leites, porém uma menor D% para o Ca nos leites UHT que nos demais leites. A fração bioacessível desses minerais nos leite UHT pode ser devido à formação de complexos solúveis com açúcares e proteínas do leite (Sanches *et al.*, 2019); com os processamentos térmicos e aos ingredientes adicionados (Drago & Valencia, 2004).

Comparando os leites com as FI, em geral, as D% obtidas para K, Mg e P foram semelhantes entre os leites líquidos e FI. Para Ca, a D% nos leites foi maior e essa diferença pode estar relacionada à razão proteína de soro de leite/caseína que no leite de vaca é de, aproximadamente, 20/80, enquanto na FI a proporção proteína do soro/caseína é semelhante ao leite humano maduro: 60/40 (Donavan, 2019). Os fosfopeptídeos presentes na caseína do leite interagem com o Ca, formando um complexo que permite que o Ca permaneça de forma solúvel no trato gastrointestinal humano, favorecendo a absorção do Ca (Bosscher *et al.*, 2001; Perales *et al.*, 2005, Sanches *et al.*, 2019).

Em relação às faixas etárias das FI (0-6 meses, 0-12 meses e 6-12 meses) diferenças foram encontradas para os teores totais dos elementos estudados, exceto para o Na. Sendo observando uma tendência de maiores teores de Ca, Fe, P e Na nas FI destinadas a faixa de 6-12 meses (Tabelas 3 e 4), concordando

com o trabalho de Martínez *et al.* (2018) que estudou amostras de FI da Espanha. O teor total de Fe nas FI fortificadas procedentes dos USA (FB2-USA e FC2-USA) estão na mesma ordem de grandeza que as amostras destinadas a faixa de 6-12 meses. Essa maior concentração de Fe vem de encontro com o consenso geral de que, lactentes a termo com peso normal nascem com reservas relativamente grandes de Fe, e essas reservas são adequadas para atender aos requisitos de Fe nos primeiros 6 meses de vida. Após o sexto mês, é difícil atender às necessidades de Fe, sendo a fortificação com Fe recomendadas, assim como a introdução de alimentos ricos em Fe (Aly *et al.*, 2016; Lönnerdal & Hernell, 2016).

Para as FI à base de proteína de soja, a marca A (FA2-BR/SOY) que declara fonte de proteína isolada de soja apresentou resultados maiores de teores totais, de D% e de S% do que a marca D (FD1-BR/SOY e FD3-BR/SOY) que declara fonte de proteína de soja. Os resultados encontrados para a bioacessibilidade da amostra FA2-BR/SOY são comparáveis aos das FI a base de leite e concordantes com os resultados de Theodoropoulos, Turatti, Greiner, Macedo, & Pallone (2018) e Devaraju, Thatte, Prakash, & Lakshmi (2016) que avaliaram os efeitos benéficos do uso da enzima fitase e da hidrólise enzimática na bioacessibilidade do Ca, Fe e Zn em produtos de soja, demonstrando que novos processos tecnológicos estão sendo aplicados como alternativas para melhorar a biodisponibilidade dos minerais em bebidas de soja que, de outra forma, seriam inibidores da absorção dos minerais.

Em relação às proteínas de leite de vaca já são bem estabelecidos os benefícios que alguns ingredientes trazem para a absorção dos nutrientes nas FI, como a adição de lactose e ácido ascórbico, a fração proteica, o teor total dos minerais, tamanho das partículas, entre outros (Drago & Valencia, 2004; Peña *et al.*, 2004; Bosscher *et al.*, 2001; Perales *et al.*, 2005; Aly, López-Nicolás, Darwish, Frontela-Saseta, & Ros-Berruezo, 2016; Devaraju *et al.*, 2016; Gomez, Perez-Corona & Madrid, 2016; Brodkorb *et al.*, 2019; Donovan, 2019). No presente estudo, estes benefícios foram constatados com as altas % de frações solúveis obtidas para os minerais nas FI. Conforme observado nas Tabelas 3 e 4, a grande maioria dos elementos apresentou valores de S% acima de 60%.

O efeito que os diferentes ingredientes causam na bioacessibilidade das FI estudadas pode ser avaliado observando as frações dialisadas dos elementos

apresentado nas Fig. 3 e 4 que demonstram a relação dos microminerais e macrominerais, respectivamente, em relação as 2 matrizes estudadas, considerando as faixas etárias das FI e os tipos de processamento dos leites, em relação ao teor total (em ordem decrescente de concentração) e a fração dialisada (tanto em concentração quanto em porcentagem).

Para o Ca, a amostra FC2-BR que declara ser dietoterápica composta por proteína parcialmente hidrolisadas e 2,2 g/100kcal de lactoses, foi encontrada a maior S% (94%) e a menor D% (0,4%); enquanto que para a amostra FD1-NZ, que não declara lactose, apresentou S% de 48% e D% de 3%, valor superior a D% da amostra FC2-BR, este fato provavelmente está relacionado ao emprego de prebióticos (Galacto-oligosacarídeos). O mesmo tipo de prebiótico presente na amostra FD1-NZ foi declarado em outras 5 FI (FA1-BR, FB2-USA, FC2-USA, FD2-BR e FA3-BR), sendo possível fazer uma correlação positiva no emprego deste prebiótico com as frações bioacessíveis dos elementos, como observado na D% para Fe superiores a 11% e K superiores a 38%, exceto a amostra FA3-BR que, entre as contendo prebióticos, apresentando menores D% para Fe, K, Mg, P e Zn, podendo estar associado a sua faixa etária (6-12 meses) e ao tipo de proteína (soro de leite desmineralizado) que provavelmente contribuiu para uma menor D%.

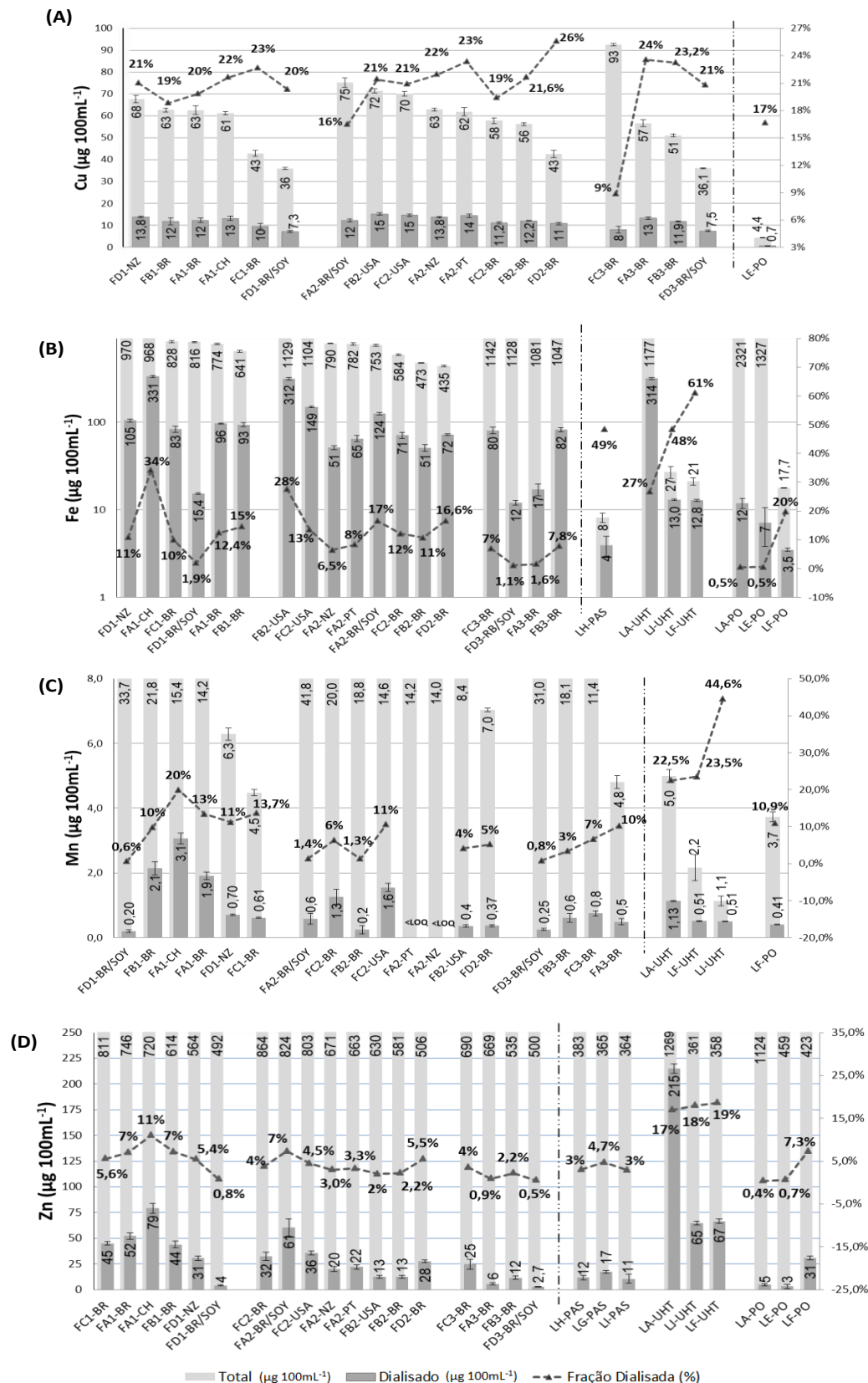


Fig. 3. Comparação do Teor total ($\mu\text{g } 100\text{mL}^{-1}$) e fração dialisada das FI e leites para os microminerais: (A) Cu, (B) Fe, (C) Mn e (D) Zn. Amostras de leite com concentrações de minerais abaixo do LOQ não estão apresentadas.

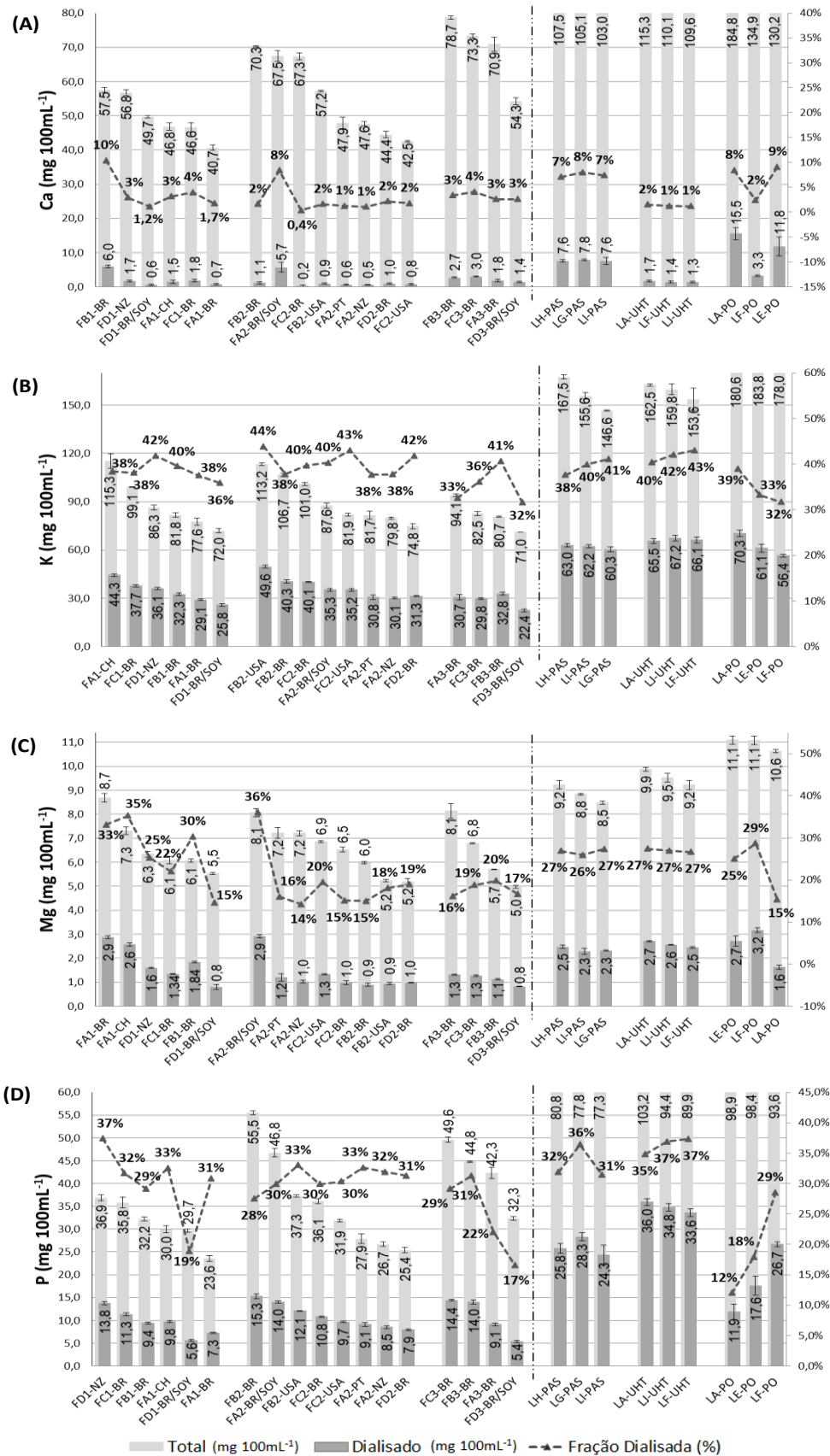


Fig. 4. Comparação do Teor total (mg 100mL⁻¹) e fração dialisada das FI e leites para os macrominerais: (A) Ca, (B) K, (C) Mg e (D) P.

O emprego de prebióticos em FI foi estudado por Aly *et al.* (2016) que avaliaram o efeito da adição de lactoferrina (rhLf) e Galacto-oligosacarídeos (GOS) na solubilidade do Fe em uma FI padrão, obtendo como resultados um aumento da solubilidade de 66% (inicial) até 96% em relação ao teor total. Embora o trabalho de Aly *et al.* (2016) não avalie a dialisabilidade e nem os demais minerais deste estudo, a adição de prebióticos nas FI estudadas apresentaram D% maiores que a amostra contendo apenas leite em pó desnatado e lactose (FC3-BR) e similares ou maiores que as FI com proteína concentrada (FC1-BR e FB3-BR) e a FI com proteína hidrolisada (FB1-BR) para o Cu, Fe, K, P e Zn.

Proteína hidrolisada (química ou enzimática) é empregada nas FI para disponibilizar peptídeos de menor peso molecular que estão associados a uma maior biodisponibilidade e solubilidade dos nutrientes (Devaraju *et al.*, 2016). Os resultados obtidos para a amostra contendo proteína hidrolisada do soro de leite (FB1-BR) apresentou maior D% para Ca, Fe, Mg, Mn e Zn do que as amostras hidrolisadas enzimaticamente (FA2-PT: cultura *Lactobacillus Reuteri* e FA2-NZ: cultura de *Bifidus*) e as parcialmente hidrolisadas (FB2-BR e FC2-BR). É interessante observar que, as duas amostras com proteínas hidrolisadas enzimaticamente, além de apresentarem teores totais iguais para os 9 elementos, também apresentaram fração dialisada para o Mn abaixo do LOQ e são as únicas com D% significativamente iguais ($p < 0,05$) para os elementos, exceto para o Fe.

Por fim, o emprego de prebiótico parece favorecer mais a dialisabilidade dos elementos estudados do que as hidrolisadas enzimaticamente e a combinação de prebióticos e proteína parcialmente hidrolisada, declarada no rótulo da amostra FD2-BR, não apresentou diferenças para as D% em relação às demais FI com prebióticos.

A avaliação dos teores totais e bioacessíveis (S% e D%) para os minerais estudados nas diferentes amostras de FI e leites integrais permitiram observar que a bioacessibilidade dos elementos pode ser afetada por diversos fatores, como ingredientes, teor total, tamanho de partícula, entre outros.

5. Conclusão

Neste estudo foi possível observar que para os leites integrais pasteurizados, em pó reconstituído e UHT, a bioacessibilidade dos minerais é afetada principalmente pelo teor total e o tratamento que é aplicado durante o processamento dos leites (térmico, secagem, fortificação e/ou adição de estabilizantes). As maiores frações bioacessíveis foram obtidas para os leites UHT.

As amostras de FI procedentes de diferentes países e diferentes marcas apresentaram resultados concordantes com os recomendados pelo Codex Alimentarium, confirmando a qualidade das FI, sendo encontrados teores totais mais elevados dos elementos nas amostras de FI para a faixa etária de 6-12 meses.

Os resultados mostraram que a bioacessibilidade dos minerais nas FI pode ser afetada pelo tipo de proteína, presença de prebióticos, fortificação com Fe e as concentrações dos minerais. A proteína isolada de soja melhora a bioacessibilidade das FI de soja ao nível das FI com proteína de soro de leite. A adição de prebiótico e proteína concentrada do soro de leite demonstrou melhorar a bioacessibilidade dos minerais, enquanto que a proteína hidrolisada enzimaticamente não apresentou efeito na bioacessibilidade dos elementos estudados.

Para os leites e as FI estudadas, todos comerciais e sem alteração em laboratório, o método de bioacessibilidade *in vitro* empregado neste estudo permitiu uma estimativa das frações de minerais disponíveis para absorção de um modo simples, rápido e barato.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Código de Financiamento 001), da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo, processo 2017/11334-8), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 303142/2017-0) e do Instituto Adolfo Lutz.

6. Referências bibliográficas

- Aly, E., López-Nicolás, R., Darwish, A. A., Frontela-Saseta, C., & Ros-Berruezo, G. (2016). Supplementation of infant formula with recombinant human lactoferrin and/or galactooligosaccharides increases iron bioaccessibility as measured by ferritin formed in Caco-2 cell model. *Food Research International*, 89, 1048–1055. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.030
- Barciela-Alonso, M. C, & Bermejo-Barrera, P. (2015). Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In John Wiley & Sons (Ed.). *Handbook of Mineral Elements in Food*, chapter 8, 163–176. Valencia, Spain: ISBN 978-1-118-65436-1
- Bermejo-Barrera, P., Muñiz-Naveiro, Ó., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, A. (2001). The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 439(2), 211–227. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01043-1
- Bosscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., Robberecht, H., Van Dyck, K., Van Cauwenbergh, R., & Deelstra, H. (2001). In Vitro Availability of Calcium, Iron, and Zinc from First-Age Infant Formulae and Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(1), 54–58. doi:10.1097/00005176-200101000-00016
- BRASIL (2003). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003: Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional (Retificação republicada pelo DOU nº 143, de 26 de julho de 2013). Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30/03/2020.
- BRASIL (2011a). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. Disponível em: <https://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/09/2019.
- BRASIL (2011b). ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011: Dispõe sobre o regulamento técnico

- para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: https://portal.anvisa.gov.br_ Acesso em: 20/09/2019.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14:991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Cava-Montesinos, P., Cervera, M. L., Pastor, A., & de la Guardia, M. (2005). Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Analytica Chimica Acta*, 531(1), 111–123. doi:10.1016/j.aca.2004.09.093
- Devaraju, S. K., Thatte, P., Prakash, J., & Lakshmi, J. A. (2016). Bioaccessible Iron and Zinc in Native and Fortified Enzyme Hydrolyzed Casein and Soya Protein Matrices. *Food Biotechnology*, 30(4), 233–248. doi:10.1080/08905436.2016.1233887
- Do Nascimento da Silva, E., Leme, A. B. P., Cidade, M., & Cadore, S. (2013). Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. *Talanta*, 117, 184–188. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.008
- Donovan, S. M. (2019). Human milk proteins: composition and physiological significance. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 90, 93–101. doi: 10.1159/000490298
- Drago, S. R., & Valencia, M. E. (2004). Influence of Components of Infant Formulas on in Vitro Iron, Zinc, and Calcium Availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3202–3207. doi:10.1021/jf035191e
- European Commission (2006). DIRECTIVA 2006/141/CE DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2006, relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição e que altera a Directiva 1999/21/CE. *Jornal Oficial da União Europeia*, L401, 3–33.
- FAO/WHO (2016). Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. *Codex Stan 72 – 1981*. Revision: 2007, 2016.
- Gomez, B. G., Perez-Corona, M. T., & Madrid, Y. (2016). Availability of zinc from infant formula by in vitro methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass

- spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9405–9414. doi: 10.3168/jds.2016-11405
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- Lönnerdal, B., & Hernell, O. (2016). An opinion on “Staging” of infant formula: A developmental perspective on infant feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(1), 9–21. doi: 10.1097/MPG.0000000000000806
- Machado, I., Bergmann, G., & Pistón, M. (2016). A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chemistry*, 194, 373–376. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.027
- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 1–11. doi: 10.3390/nu8050279
- Martínez, M. A., Castro, I., Rovira, J., Ares, S., Rodríguez, J. M., Cunha, S. C., Casal, S., Fernandes, J. O., Schuhmacher, M., & Nadal, M. (2018). Early-life intake of major trace elements, bisphenol A, tetrabromobisphenol A and fatty acids: Comparing human milk and commercial infant formulas. *Environmental Research*, 1-37. doi: 10.1016/j.envres.2018.11.017
- Ménard, O., Bourlieu, C., De Oliveira, S. C., Dellarosa, N., Laghi, L., Carrière, F., Capozzi, F., Dupont, D., & Deglaire, A. (2018). A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry*, 240, 338–345. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.145
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., et al (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5:1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j
- Peña, E., Domínguez, R., Bermejo, A., Cocho, J. A., Fraga, J. M., & Bermejo, P. (2004). Enzymolysis approach to compare cu availability from human milk and infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4887–4892. doi:10.1021/jf030781y

- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. J., & Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3721–3726. doi:10.1021/jf047977y
- Poitevin, E. (2016). Official methods for the determination of minerals and trace elements in infant formula and milk products: A review. *Journal of AOAC International*, 99 (1), 42-52. doi: 10.5740/jaoacint.15-0246
- Sager, M., McCulloch, C. R., & Schoder, D. (2018). Heavy metal content and element analysis of infant formula and milk powder samples purchased on the Tanzanian market: International branded versus black market products. *Food Chemistry*, 255, 365–371. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.058
- Sanches, V. L., Peixoto, R. R. A., & Cadore, S. (2019). Phosphorus and zinc are less bioaccessible in soy-based beverages in comparison to bovine milk. *Journal of Functional Foods*, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103728>
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Lesmes, U., *et al.* (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 52–63. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.017
- Theodoropoulos, V. C. T., Turatti, M. A., Greiner, R., Macedo, G. A., & Pallone, J. A. L. (2018). Effect of enzymatic treatment on phytate content and mineral bioaccessability in soy drink. *Food Research International*, 108, 68–73. doi:10.1016/j.foodres.2018.03.018
- Vieira da Silva S, Mattanna P, Bizzi CA, Richards NSPS, & Barin JS (2013). Evaluation of the Mineral Content of Infant Formulas Consumed in Brazil. *J. Dairy Sci* 96:3498-3505.
- WHO (2014). Comprehensive implementation plan on maternal, infant and young child nutrition. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/CIP>. Acesso em: 20/09/2019
- Zou, L., Pande, G., & Akoh, C. C. (2016). Infant formula fat analogs and human milk fat: New focus on infant developmental needs. *Annual Review of Food*

Science and Technology, 7(1), 139–165. doi: 10.1146/annurev-food-041715-033120

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram estudados o teor total, a fração bioacessível (solúvel e dialisada) e os fatores que podem influenciar a bioacessibilidade de minerais presentes em amostras de fórmulas infantis destinadas as faixas etárias de 0-6 meses, 0-12 meses e 6-12 meses adquiridas em estabelecimentos comerciais no Brasil, Chile, Estados Unidos da América, Nova Zelândia e Portugal, bem como amostras de leites integrais pasteurizados, em pó e UHT adquiridos no comércio de Campinas – Brasil.

Para o estudo do teor total dos minerais foram comparados métodos de preparo de amostras que utilizam reduzida quantidade de reagentes químicos sendo que, o método de extração assistida por ultrassom mostrou ser um método alternativo em acordo com os princípios da “Química Verde”, ou seja, menor custo, rápido e simples quando comparado com os métodos tradicionais (mineralização em micro-ondas e calcinação em forno mufla). O método foi validado para análise por ICP OES obtendo-se valores satisfatórios para as figuras de mérito seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão e recuperação.

Os testes realizados para o ensaio de bioacessibilidade *in vitro* durante este estudo demonstrou a possibilidade de ser adicionada uma etapa de *overnight* entre as digestões gástrica e intestinal, permitindo uma realização mais cautelosa da análise devido ao tempo da análise com sensibilidade, exatidão e precisão adequadas. A redução do volume da solução de enzima pancreatina e sais biliares adicionados, 6 vezes menores em relação ao volume de solução envolvendo condições para o sistema digestivo de adultos, possibilita uma melhor reprodução das condições intestinais imaturas dos lactantes. A execução do método *in vitro*, frações solúvel e dialisada, é complexa, relativamente demorada, que exige uma série de cuidados e muita cautela, porém uma forma eficiente para analisar as diferenças entre os leites e as FI estudadas, todos comerciais e sem alteração em laboratório, de um modo mais simples, rápido e barato que os métodos *in vivo*.

Entre os leites, os resultados demonstram uma possível correlação entre a fração bioacessível dos elementos com o teor total e o tipo de processamento (térmico, fortificação e adição de estabilizantes), sendo as maiores porcentagens bioacessíveis obtidas nos leites UHT. A bioacessibilidade dos minerais nas FI foi afetada pelo tipo de tratamento dado a proteína, a adição de prebióticos (galacto-oligosacarídeos), fortificação com Fe e as concentrações dos minerais. A adição de prebiótico demonstrou uma melhora efetiva na absorção dos elementos presentes nas FI, enquanto que a proteína hidrolisada enzimaticamente não apresenta efeito significativo na bioacessibilidade dos elementos estudados. O uso de proteína isolada de soja melhorou a solubilidade e a dialisabilidade dos minerais, aproximando sua absorção as FI a base de leite de vaca.

Ao comparar os teores totais dos elementos encontradas nos leites com os encontrados nas FI, diferenças significativas foram evidenciadas, reforçando a recomendação de que FI é o substituto eficaz do leite materno, mais adequado para lactentes do que o leite de vaca, sendo elaborado para se assemelhar a constituição do leite materno e possibilitar um melhor equilíbrio da quantidade de nutrientes nas diferentes fases do desenvolvimento, como por exemplo, menores quantidades de ferro durante os seis primeiros meses e maior após os sexto mês.

Os resultados das diferentes FI estudadas demonstraram que, exceto para o Na, há uma significativa variação nas concentrações dos elementos, tanto para o valor total quanto para os ensaios de bioacessibilidade. Ao comparar os resultados encontrados (mg ou µg /100kcal) com os valores sugeridos pelo *Codex alimentarius* e regulamentos da ANVISA, todos os elementos apresentaram valores dentro do estabelecido, independente do país de origem e a marca, confirmando a boa qualidade e preocupação dos fabricantes em atender as exigentes normas deste alimento infantil.

Em relação às diferentes faixas etárias estudadas, para a faixa de 6-12 meses foi observada uma tendência de maiores concentrações dos elementos, principalmente para Fe, Ca e P, que nas FI para menores de 6 meses. Estas diferenças na composição permitem uma ingestão mais equilibrada de nutrientes nas diferentes fases do lactente, semelhante às mudanças de composição que ocorrem naturalmente no leite materno. Portanto, FI com faixas etárias definidas é um avanço nutricional para a alimentação no início da vida.

Ciente que a composição da FI é frequentemente sujeita a alterações e melhorias, incluindo o aumento das concentrações dos elementos estudados, faz-se necessário um contínuo controle desta matriz. Por fim, deve-se lembrar de que a bioacessibilidade *in vitro* é a estimativa das frações de minerais disponíveis para absorção sendo necessário investigar a biodisponibilidade dos minerais para melhor correlacionar os efeitos dos diferentes componentes.

ANEXO

Food Analytical Methods

Simple and fast ultrasound-assisted method for mineral content and bioaccessibility study in infant formula by ICP OES –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	FANM-D-19-01127	
Full Title:	Simple and fast ultrasound-assisted method for mineral content and bioaccessibility study in infant formula by ICP OES	
Article Type:	Original Research	
Keywords:	Infant formula; Minerals; Ultrasound-assisted extraction; In vitro digestion; ICP OES	
Corresponding Author:	Marcelo Antonio Morgano, Ph.D Instituto de Tecnologia de Alimentos Campinas, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Instituto de Tecnologia de Alimentos	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Maria Isabel Andrekowsk Fioravanti	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Maria Isabel Andrekowsk Fioravanti	
	Raquel Fernanda Milani	
	Esther Lima de Paiva	
	Marcelo Antonio Morgano, Ph.D	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (2017/11334-8)	Dr. Marcelo Antonio Morgano
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Dr. Marcelo Antonio Morgano
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303142/2017-0)	Dr. Marcelo Antonio Morgano
Abstract:	Infant formula (IF) constitutes the single source of mineral intake for infants whom are only fed with IF. The assurance of the amount of minerals declared on the label and the minerals levels and their chemical forms presents a major concern in order to provide a good nutrients absorption by these children. Thus, the main objectives of this study were to evaluate a simple and fast ultrasound-assisted method for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn determination in IF by ICP OES and to establish the optimum conditions of an in vitro method to study minerals dialyzability. The ultrasound-assisted method was shown to be conforming to 'green chemistry principles' being simple, fast and presenting low cost comparing with reference methods. The results were within those obtained in reference methods (microwave-assisted acid digestion and dry ashing) with selectivity, sensitivity and linearity ($r^2 > 0.999$). The accuracy and the precision were verified using certified reference materials, with recoveries and coefficients of variation ranging from 91 to 105% and from 1.1 to 5.2%, respectively. For in vitro dialyzability assessment, the optimum conditions established in this study allows including an overnight step between gastric and gastrointestinal stages and a reduction in pancreatin-bile solution by six-fold factor (accuracy and precision ranging from 81 to 108% and 0.4 to 6.3%, respectively) – contributing to establish an in vitro digestion method concerning the infant gastrointestinal conditions.	