



Departamento de Ciências Químicas

Laboratório de Química Aplicada

APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE CRÓMIO(III) E CRÓMIO(VI) EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Dissertação do 2.º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de
Qualidade

Flávia Teixeira Mendes

Orientador:

Professor Doutor Agostinho Almiro de Almeida

(Laboratório de Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)

Coorientador:

Professor Doutor Edgar Augusto Costa Pinto

(Laboratório de Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)

outubro 2018

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA
EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

(assinatura do autor)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Agostinho Almeida por toda a orientação, por todos os conhecimentos que me transmitiu, e por toda a ajuda indispensável na elaboração deste projeto.

Ao Professor Doutor Edgar Augusto Costa Pinto por todo o apoio, ajuda, paciência e por ter sempre procurado ajudar-me a ultrapassar as minhas dificuldades.

Aos meus pais, por serem os verdadeiros responsáveis por tudo isto. Por terem feito tudo quanto lhes foi possível para me proporcionar a oportunidade de estudar e lutar por uma vida melhor. Espero ter-vos deixado orgulhosos.

Ao meu padrinho, à minha madrinha e às minhas primas Francisca e Catarina, por serem literalmente a minha segunda casa. Mesmo quando tudo corre mal, os meus dias acabam sempre bem graças a vocês.

À Diana por ter sido o meu grande suporte ao longo destes 2 anos. És a pessoa a quem mais devo o facto de ter chegado até aqui. Por nunca me teres deixado desistir, por nunca me teres largado a mão, mesmo nos piores dias (e foram tantos). Por tudo aquilo que aprendemos, crescemos e superamos juntas. Fizemos este caminho juntas, e sei que a partir de agora será sempre assim.

Ao Tiago, por ser o melhor amigo que o mundo me podia ter dado, o porto de abrigo mais seguro de todos, em todas as ocasiões.

À Maria João, porque não há anos que passem capazes de mudar aquilo que somos uma para a outra. Por ser a irmã que nunca tive.

À Raquel, por estar sempre à distância de um telefonema. Tenho um orgulho imenso naquilo que somos e na amizade que construímos. Aquela que não passa com o tempo, com a distância. Segue sempre igual, sem cobranças.

À Margarida, por toda a compreensão. Por em tantos momentos ser a pessoa que sei que me vai compreender a 100%, porque vemos o mundo com os mesmos olhos. Tenho um orgulho enorme em ti, em tudo o que conquistaste e que sei que ainda vais conquistar.

Ao Orfeão Universitário do Porto e a todos aqueles com quem me cruzei ao longo destes últimos 5 anos. Obrigada por terem dado um verdadeiro significado à minha vida académica, por me terem feito descobrir a pessoa que realmente sou e quero continuar a ser. Um obrigado especial à Diana, à Rafaela, à Cláudia, à Clara, à Nóbrega, e ao Bazenga, pelo companheirismo, pela amizade, por tudo.

Ao Jefferson, à Monika e à Tânia, por terem tornado os meus dias mais fáceis e mais leves. Porque muito mais do que colegas de trabalho são grandes amigos que vou guardar para sempre com muito carinho e admiração. Preparem-se, quando derem por isso eu já vou estar aí, a bater-vos à porta.

À Marisa, pelo companheirismo e pelo apoio indispensável ao longo deste último ano. Acho que posso afirmar que a nossa amizade foi para ambas uma boa surpresa. E que continue assim.

Aos LéGatto, por termos tido a coragem e força de tornar isto real. Porque me orgulho todos os dias deste projeto, do pouco que já construímos e do muito que sei que ainda vamos construir.

Ao Grupo Recreativo e Cultural do Loureiro, por todos os ensinamentos, por me ajudarem a crescer mais um bocadinho todos os dias. Por me mostrarem o quão bonito e enriquecedor pode ser o convívio entre gerações tão diferentes, mas com tanto para dar umas às outras.

Obrigada!

ABSTRACT

Chromium (Cr) is an element of ubiquitous presence in nature, usually found in two oxidation states: Cr(VI) and Cr(III). Cr(VI) is a strong oxidizing agent, presenting toxic effects in humans and animals. On the other hand, Cr(III) is an essential micronutrient for humans, being involved in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. Given this important role in metabolism, Cr is one of the minerals commonly found in the composition of food supplements.

According to Regulation (EC) n.º 1170/2009, of 30 november 2009 that establishes the vitamins and minerals as well as the respective forms in which they may be added to foods, including food supplements, Cr can only be added in five forms of Cr(III) and Cr(III) enriched yeasts.

The objective of this work was to develop a simple and prompt methodology that can be used to discriminate between Cr(III) and Cr(VI) in food supplements. For this, solid-phase extraction was applied as a technique for the separation of the species, using Metalfix-Chelamine resin, a pentamine chelating resin, for the selective retention of Cr(III), with subsequent quantification by ICP-MS.

Initially, the study of the factors susceptible to conditioning the retention of Cr by the resin (pH, composition of the buffer system, contact time of the solutions with the resin, concentration of Cr and coexistence of other minerals) was carried out through *batch* essays. Subsequently, it was also studied the accomplishment of this methodology using the resin as filler of small columns. In both cases, an almost complete discrimination between the two species was obtained. Specifically, in the column tests, in the case of Cr(III) solutions a Cr retention of $97,44 \pm 0,46\%$ was obtained, and in the case of Cr(VI) solutions a Cr retention of $0,41 \pm 0,03\%$.

It has been proved that this methodology may be applicable to all food supplements in which Cr has been added under one of the authorized forms, except in the case of chromium picolinate, a compound which has been shown not to be retained in the resin.

Keywords: *chromium; discrimination; supplements; ICP-MS.*

RESUMO

O crómio (Cr) é um elemento de presença ubíqua na natureza, sendo normalmente encontrado em dois estados de oxidação: Cr(VI) e Cr(III). O Cr(VI) é um forte agente oxidante, apresentando efeitos tóxicos em humanos e animais. Por outro lado, o Cr(III) é um micronutriente essencial para os humanos, estando envolvido no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Tendo em conta o seu importante papel no metabolismo, o Cr é um dos minerais comumente encontrados na composição de suplementos alimentares.

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1170/2009, de 30 de novembro de 2009, que estabelece as vitaminas e minerais bem como as respetivas formas em que podem ser adicionados aos alimentos, incluindo suplementos alimentares, o Cr apenas pode ser incorporado sob a forma de cinco compostos de Cr(III) ou leveduras enriquecidas em Cr(III). O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia simples e expedita suscetível de ser utilizada na discriminação entre Cr(III) e Cr(VI) em suplementos alimentares. Para tal, aplicou-se a extração em fase sólida como técnica de separação das espécies, utilizando a resina Metalfix-Chelamine, uma resina quelante do tipo pentamina, para a retenção seletiva do Cr(III), com posterior quantificação por ICP-MS.

Inicialmente, o estudo dos fatores suscetíveis de condicionar a retenção de Cr por parte da resina (pH, composição do sistema tampão, tempo de contacto das soluções com a resina, concentração de Cr e coexistência de outros minerais) foi efetuado através de ensaios em *batch*. Posteriormente, foi também estudada a realização desta metodologia usando a resina como material de enchimento de pequenas colunas. Em ambos os casos obteve-se uma discriminação praticamente completa entre as duas espécies. Especificamente nos ensaios em coluna, no caso de soluções de Cr(III) obteve-se uma retenção de Cr de $97,44 \pm 0,46\%$, e no caso de soluções de Cr(VI) uma retenção de Cr de $0,41 \pm 0,03\%$. Comprovou-se que esta metodologia pode ser aplicável a todos os suplementos alimentares em que o Cr tenha sido adicionado sob uma das formas autorizadas, exceto no caso do picolinato de crómio, composto que mostrou não ser retido na resina.

Palavras-chave: *crómio; discriminação; suplementos; ICP-MS.*

ÍNDICE

ABSTRACT	v
RESUMO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Crómio – presença no ambiente e principais aplicações.....	2
1.2. Crómio – química geral.....	4
1.2.1. Influência do pH	7
1.2.2. Reações de oxidação e redução.....	8
1.3. Cr(III) <i>vs</i> Cr(VI)	8
1.3.1. Cr(III) – o crómio essencial.....	9
1.3.2. Cr(VI) – o crómio tóxico	11
1.4. Suplementos alimentares – enquadramento legal europeu	12
1.5. Crómio nos suplementos alimentares.....	15
1.6. Discriminação entre Cr(III) e Cr(VI) – procedimentos analíticos	16
1.7. Extração em fase sólida aplicada à especificação de crómio	17
1.8. Resina Metalfix-Chelamine	19
1.9. Espetrometria de massa com plasma de acoplamento indutivo	23
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Reagentes e materiais	26
2.1.1. Metalfix-Chelamine.....	26
2.1.2. Preparação de soluções	27
2.2. Instrumentação	29
2.3. Ensaio em <i>batch</i>	30
2.4. Ensaio em coluna.....	31
2.5. Pré-tratamento de amostras reais.....	32

2.5.1. Dissolução em água.....	32
2.6. Cálculo da percentagem de retenção	34
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1. Efeito do pH.....	37
3.2. Efeito da composição do tampão	38
3.2.1 Tampão HCl/KCl	38
3.2.3. Tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COONa.....	42
3.3. Efeito da concentração de Cr	44
3.4. Efeito da coexistência de Cr(III) e Cr(VI)	45
3.5. Efeito da coexistência de outros minerais.....	46
3.6. Efeito do tempo de contacto	48
3.7. Ensaio em coluna.....	50
3.8. Pré-tratamento de amostras reais.....	54
3.8.1. Dissolução em água	55
3.8.2. Solubilização ácida	58
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES FINAIS	60
ANEXOS	63
ANEXO 1 – Diretivas e Regulamentos Europeus aplicáveis aos suplementos alimentares	64
ANEXO 2 – Alterações à Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de junho de 2002.....	65
Anexo 3 - Vitaminas e minerais que podem ser utilizados no fabrico de suplementos alimentares.....	66
ANEXO 4 – Preparados vitamínicos e substâncias minerais que podem ser utilizados no fabrico de suplementos alimentares	68
ANEXO 5 – Vitaminas e sais minerais que podem ser declarados e respetivos valores de referência do nutriente (VRN) [64].	76
REFERÊNCIAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes estados de oxidação do Cr.	6
Figura 2 – Diagrama de Pourbaix para o Cr. Espécies de Cr(III) e Cr(VI) em função do pH e do potencial eletroquímico (E), em soluções aquosas arejadas e em que H ₂ O e OH ⁻ sejam os únicos agentes complexantes (adaptado de [19]).	6
Figura 3 – Mecanismo de ação do Cr(III) como micronutriente essencial. 1 – Apocromodulina na sua forma inativa, enquanto os níveis de glicose no sangue aumentam; 2 – A insulina liga-se os respetivos recetores, o complexo transferrina-Cr(III) é internalizado e o Cr(III) é libertado; 3 – Quatro átomos de Cr(III) ligam-se à cromodulina e originam o complexo Cr(III) ₄ -cromodulina, a forma ativa; 4 – O complexo Cr(III) ₄ -cromodulina liga-se à subunidade β do recetor da insulina e estimula a ação da insulina, promovendo a entrada de mais glucose na célula.	10
Figura 4 – Processo de redução intracelular do Cr(VI) a Cr(III) e reações de Fenton catalisadas pelos intermediários instáveis Cr(V) e Cr(IV) [49].	12
Figura 5 – Estrutura química da tetraetilenopentamina, grupo funcional da resina Metalfix-Chelamine [104].	20
Figura 6 – Tabela periódica em que estão assinalados os elementos autorizados a ser introduzidos nos suplementos alimentares.	22
Figura 7 – Esquema simplificado de um equipamento ICP-MS (adaptado de [108]).	24
Figura 8 – Preparação das soluções de trabalho de Cr(III) e Cr(VI).	27
Figura 9 – Ensaio em <i>batch</i> . Tubos falcon com 0,5 g de resina e 9 ml da solução teste no agitador.	31
Figura 10 – Construção das colunas utilizando dois formatos distintos de seringa.	32
Figura 11 – Esquema representativo das solubilizações ácidas realizadas.	34
Figura 12 – Efeito do pH na retenção de Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em <i>batch</i> , soluções de Cr(III) 400 µg L ⁻¹ , pH ajustado com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M. Soluções mantidas em contacto com a resina e sob agitação durante 60 minutos (n=2)...	37
Figura 13 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em <i>batch</i> , com soluções de 400 µg L ⁻¹ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com HCl/KCl e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).	39

Figura 14 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , com soluções de 400 µg L ⁻¹ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com HCl/KHP e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).	41
Figura 15 – Complexo Cr(III)-ácido ftálico (adaptado de [112]).	41
Figura 16 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , com soluções de 400 µg L ⁻¹ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).	43
Figura 17 – Estruturas químicas do KHP, do acetato de sódio e do ácido acético.	44
Figura 18 – Efeito da coexistência dos restantes minerais (autorizados a ser introduzidos nos suplementos alimentares) na percentagem de retenção do Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , soluções tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa a pH 4,60, e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).	47
Figura 19 – Efeito do tempo de contacto na percentagem de retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , soluções tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa a pH 4,6 e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 5, 15 ou 30 minutos (n=2).	49
Figura 20 – Efeito do tempo de contacto na percentagem de retenção do Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine para a solução MIX (solução contendo todos os minerais autorizados nos suplementos alimentares). Ensaios em <i>batch</i> , soluções tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa a pH 4,6 e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 5, 15 ou 30 minutos (n=2).	50
Figura 21 – Formatos de seringa utilizados para a construção das colunas.	51
Figura 22 – Procedimento final para a realização dos ensaios em coluna.	53
Figura 23 – Aspeto da coluna (formato 2) após lavagem com ácido (esquerda) e após condicionamento com tampão (direita).	54
Figura 24 – Estrutura química do picolinato de crómio.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes de Cr no meio ambiente.	2
Tabela 2 – Concentração média de Cr total na água [12].....	3
Tabela 3 – Concentração média de Cr total no ar da UE [16].....	4
Tabela 4 – Dados físico-químicos sobre o Cr (adaptado de [17]).	5
Tabela 5 – Isótopos de Cr, respetiva massa atómica e abundância relativa natural (adaptado de [17]).....	5
Tabela 6 – Espécies de Cr(VI) presentes em solução em função do pH e da concentração total de Cr(VI).....	8
Tabela 7 – Aplicação da resina Metalfix-Chelamine na pré-concentração de metais.....	21
Tabela 8 – Reagentes utilizados para a preparação das soluções stock dos minerais autorizados a ser utilizados na produção de suplementos alimentares.	28
Tabela 9 – Condições típicas de operação do equipamento ICP-MS.....	30
Tabela 10 – Composição mineral dos dois suplementos alimentares, de acordo com os respetivos rótulos.....	33
Tabela 11 – Efeito da concentração na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , soluções tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).	44
Tabela 12 – Efeito da coexistência de Cr(III) e Cr(VI) na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em <i>batch</i> , soluções tamponadas com CH ₃ COOH/CH ₃ COONa e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).....	45
Tabela 13 – Valores médios das percentagens de retenção obtidas nos ensaios em coluna com os dois formatos de seringa (n=2).	51
Tabela 14 – Concentração de Cr total obtida após dissolução em água de duas amostras de suplementos alimentares (n=2).....	55
Tabela 15 – Compostos de Cr(III) autorizados a ser utilizados na produção de suplementos alimentares e respetivas solubilidades.....	56
Tabela 16 – Concentração de Cr total obtida após a solubilização ácida de duas amostras de suplementos alimentares (n=2).....	58
Tabela 17 – Valores médios das percentagens de retenção obtidas nos ensaios com amido e <i>spike</i> de Cr(III) ou Cr(VI) (n=4).	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS - *American Chemical Society*

ANS - *Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*

DDR - Dose Diária de Referência

DSB - *Double-strand breaks*

E - Potencial eletroquímico

EFSA - *European Food Safety Authority*

GSH - Glutathiona

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IDMS - *Isotope Dilution Mass Spectrometry*

LUCAS - *Land Use/Cover Area Frame Statistical Survey*

OMS - Organização Mundial da Saúde

SIDMS - *Speciated isotope dilution mass spectrometry*

SSB - *Single-strand breaks*

UE - União Europeia

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

VRN - Valor de Referência do Nutriente

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. Crómio – presença no ambiente e principais aplicações

O crómio (Cr) é um elemento de presença ubíqua no ambiente. É o 7.º elemento e o 21.º metal mais abundante na crosta terrestre, ocorrendo principalmente como constituinte do mineral cromita (FeCr_2O_4) [1]. Os recursos mundiais de cromita são superiores a 12 mil milhões de toneladas, estando 95% dos mesmos concentrados no Cazaquistão e África do Sul [2]. Em 2014, a Europa foi responsável por 19,4% da extração mundial de rochas ou minerais contendo Cr, sendo a Turquia, a Finlândia e a Albânia os principais produtores. No mesmo ano, Portugal importou cerca de 2529 toneladas desses minerais [3].

O afloramento, a erosão e a lixiviação de rochas contendo Cr, a poeira e os gases libertados durante as erupções vulcânicas e os incêndios florestais são as principais fontes naturais de Cr. Atualmente, porém, a maior parte do Cr presente no meio ambiente provém de fontes antropogénicas, devido ao seu uso intensivo numa ampla variedade de indústrias e na agricultura (tabela 1).

Tabela 1 – Fontes de Cr no meio ambiente.

Fontes naturais	Fontes antropogénicas
	Indústria metalúrgica
	Curtimento de couro
Afloramento rochoso	Fabrico de ligas metálicas
Erosão de rochas	Galvanização
Lixiviação de rochas	Conservação de madeira
Erupções vulcânicas	Corantes
Incêndios florestais	Indústria têxtil
	Produção de papel
	Agricultura (fertilizantes, pesticidas, fungicidas)

O Cr pode existir em vários estados de oxidação. No entanto, Cr(III) e Cr(VI) são as formas mais estáveis no ambiente [4]. Os teores de Cr encontrados nos diferentes subsistemas são muito variáveis. Nas rochas podem variar entre 5 e 3400 mg L⁻¹, dependendo da composição mineral das mesmas [5, 6]. Nos solos, os valores podem variar

entre 1 e 3000 mg kg⁻¹, dependendo da composição das rochas e sedimentos que os originaram, bem como da eventual deposição proveniente de fontes antropogénicas [5, 7].

Relativamente aos solos da União Europeia (UE), com base nos dados obtidos no âmbito do inventário LUCAS (*Land Use/Cover Area Frame Statistical Survey*)¹ para as campanhas realizadas em 2009 e 2012, Tóth e seus colaboradores reportaram uma concentração mínima de 1,57 mg kg⁻¹, máxima de 273,94 mg kg⁻¹ e média de 21,72 ± 15,7 mg kg⁻¹ [9].

Os processos de lixiviação das rochas e dos solos pela água da chuva, e a ocorrência de descargas industriais, contribuem para a entrada de Cr nas águas superficiais, podendo este ser também transportado para os lençóis freáticos [10]. Na tabela 2 constam os valores médios da concentração de Cr na água reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Nas águas superficiais da Europa, foram reportados valores entre <0,01 e 43,3 µg L⁻¹, com um valor médio de 0,38 µg L⁻¹ [11].

Tabela 2 – Concentração média de Cr total na água [12].

Concentração média de Cr total (µg L ⁻¹)	
Água superficial	0,5 – 2
Água da chuva	0,2 – 1
Água do mar	0,04 – 0,5
Água subterrânea	< 1

Relativamente à qualidade da água para consumo humano, a concentração de Cr é um dos parâmetros que têm de ser avaliados. Segundo a OMS, embora os efeitos na saúde sejam claramente determinados pelo estado de oxidação, a informação existente sobre a especiação de Cr na água é inconsistente, não fornecendo suporte suficiente para que se definam diferentes valores limite para Cr(III) e Cr(VI) [12]. Assim, a OMS estabeleceu em 0,05 mg L⁻¹ o limite para a concentração total de Cr (somatório de todas espécies de Cr) que pode estar presente na água potável. A Diretiva (UE) 2015/1787 da Comissão, de 6 de

¹ LUCAS (acrónimo de *Land Use/Cover Area Frame Statistical Survey*) é um inventário sobre o uso e cobertura dos solos europeus, iniciado em 2006 pelo Eurostat, sendo realizando a cada 3 anos. São efetuadas recolhas de dados em pontos correspondentes a todos os tipos de utilização do solo: áreas de cultivo, pastagem, floresta, zonas urbanas, entre outros. Entre outra informação, é recolhida uma amostra da camada superficial do solo (~500 g) em 1 de cada 10 pontos, que é posteriormente analisada em laboratório para uma série de parâmetros físico-químicos, incluindo os elementos de maior potencial tóxico (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Sb, Co e Ni) [8].

outubro de 2015, que altera os Anexos II e III da Diretiva 98/83/CE do Conselho relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, transposta para a ordem jurídica interna portuguesa pelo Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro, também estabelece o mesmo valor paramétrico para a concentração total de Cr na água destinada ao consumo humano [13].

A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) fixou em $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a concentração máxima de Cr total que pode chegar aos consumidores através dos sistemas públicos de abastecimento de água [14].

O Cr atinge a atmosfera em consequência da atividade vulcânica, de incêndios florestais, da libertação de fontes biogénicas e das atividades industriais [15]. Está presente principalmente como constituinte de pequenas partículas sólidas suspensas na atmosfera (aerossóis), eventualmente acabando por se depositar no solo e nas águas superficiais. A informação existente sobre a concentração de Cr na atmosfera é escassa. Contudo, os níveis atmosféricos de Cr no espaço da UE, reportados pela OMS, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Concentração média de Cr total no ar da UE [16].

Concentração de Cr total (ng m^{-3})	
Áreas remotas	0 - 3
Áreas urbanas	4 - 70
Áreas industriais	5 - 200

1.2. Crómio – química geral

O Cr foi descoberto em 1798 por Nicholas Louis Vauquelin como componente do mineral crocoíte (PbCrO_4). O seu nome deriva do vocábulo grego “*chrōma*”, que significa “cor”, o que está relacionado com a sua capacidade para originar compostos de cores muito intensas e variadas quando em solução. Na Tabela Periódica, localiza-se na primeira série dos metais de transição, com o número atómico 24, massa atómica relativa de $51,996 \text{ g mol}^{-1}$ (tabela 4) e possui 4 isótopos, sendo o isótopo ^{52}Cr o mais abundante (tabela 5).

Tabela 4 – Dados físico-químicos sobre o Cr (adaptado de [17]).

Grupo	6
Período	4
Bloco	d
Número atômico	24
Estado a 20 °C	Sólido
Configuração eletrônica	[Ar] 3d ⁵ 4s ¹
Ponto de fusão	1907 °C
Ponto de ebulição	2671 °C
Densidade	7,15 g cm ⁻³
Massa atômica relativa	51,996

Tabela 5 – Isótopos de Cr, respetiva massa atômica e abundância relativa natural (adaptado de [17]).

Isótopo	Massa atômica	Abundância relativa natural (%)
50Cr	49,946	4,345
52Cr	51,941	83,798
53Cr	52,941	9,501
54Cr	53,939	2,365

Embora possa ocorrer em vários estados de oxidação, desde Cr(0) a Cr(VI), apenas o Cr(III) e o Cr(VI) são estáveis no meio ambiente (figura 1) [4], sendo o Cr(III) a espécie mais abundante. Por sua vez, o Cr(VI) é um forte agente oxidante [18]. O Cr(0) corresponde à forma metálica, utilizada na indústria e encontrada em ligas e objetos cromados. As espécies Cr(II), Cr(IV) e Cr(V) são intermediários instáveis que resultam de reações redox do Cr(III) e do Cr(VI).

Crômio (Cr)	Cr^0	Forma metálica
	Cr^{1+}	Intermediário instável
	Cr^{2+}	Intermediário instável
	Cr^{3+}	Forma mais estável encontrada no ambiente
	Cr^{4+}	Intermediário instável
	Cr^{5+}	Intermediário instável
	Cr^{6+}	Segunda forma mais estável encontrada no ambiente

Figura 1 – Diferentes estados de oxidação do Cr.

Em meio aquoso, a presença relativa das diferentes espécies de Cr(III) e Cr(VI) depende sobretudo do potencial redox e do pH. O diagrama de Pourbaix (figura 2) indica as condições de pH e de potencial eletroquímico (E) para as quais as espécies são termodinamicamente estáveis. Em meio ácido, o Cr(III) é estabilizado em função do elevado potencial redox do par Cr(VI)/Cr(III). Em condições alcalinas, a diminuição do potencial redox leva à estabilização das espécies de Cr(VI).

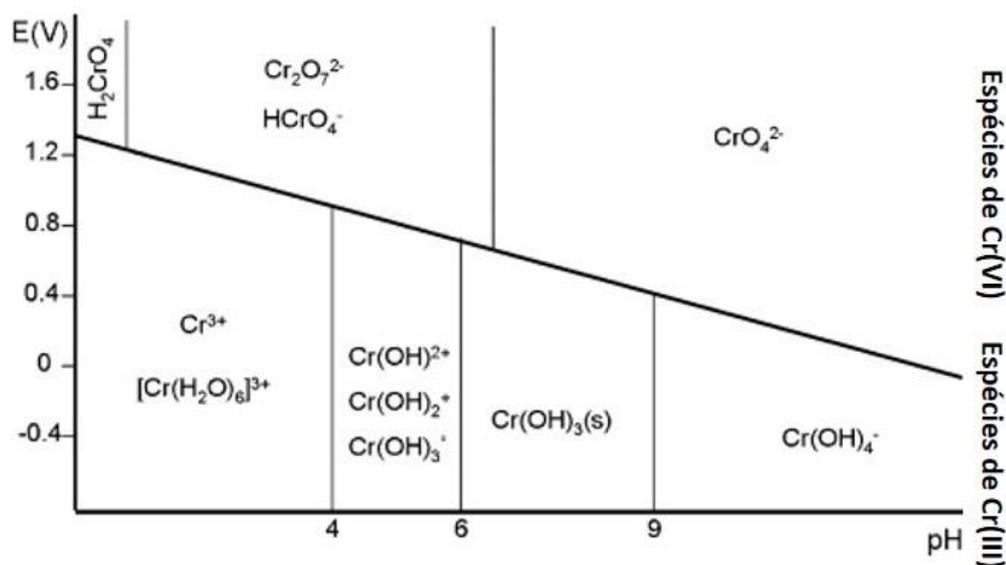
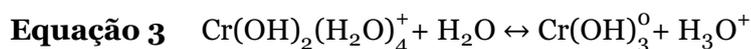
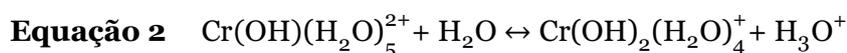
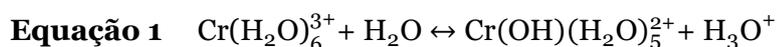


Figura 2 – Diagrama de Pourbaix para o Cr. Espécies de Cr(III) e Cr(VI) em função do pH e do potencial eletroquímico (E), em soluções aquosas arejadas e em que H_2O e OH^- sejam os únicos agentes complexantes (adaptado de [19]).

1.2.1. Influência do pH

Entre pH 0 e 4, o Cr(III) tende a formar complexos hexacoordenados octaédricos. O complexo hexa-aquacrômio (III) $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}]$ é o mais abundante em soluções de sais inorgânicos sob condições ácidas [20]. Contudo, o Cr(III) pode também formar complexos com outros agentes: amônia, sulfato, ureia e alguns ácidos orgânicos [4, 19]. Quando o pH sobe para 4-6, os compostos de coordenação sofrem hidrólise originando os produtos indicados nas equações seguintes [21].



Entre pH 6 e 9, o Cr(III) precipita sob a forma de hidróxido de crômio(III) $[\text{Cr}(\text{OH})_3(s)]$, o qual é convertido na forma solúvel $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ para pH superior a 9 [4, 21]. Na maioria dos sistemas naturais (por exemplo, águas naturais e águas de abastecimento público), devido às condições de pH neutro e ausência de agentes complexantes, o Cr(III) encontra-se na forma insolúvel $\text{Cr}(\text{OH})_3(s)$, o que limita a sua mobilidade ambiental [4, 20].

Em solução, o Cr(VI) pode originar várias espécies dependendo do pH e da concentração total de Cr(VI) (tabela 6). A pH inferior a 1, o Cr(VI) existe sob a forma de ácido crômico (H_2CrO_4). Os iões cromato (CrO_4^{2-}), dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) e hidrogenocromato (HCrO_4^-) são as formas mais abundantes em solução. As formas $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ e HCrO_4^- são prevalentes em meio ácido, enquanto o CrO_4^{2-} predomina em meio básico. Os compostos de Cr(VI) são muito solúveis e por isso possuem maior mobilidade no ambiente do que os compostos de Cr(III).

Tabela 6 – Espécies de Cr(VI) presentes em solução em função do pH e da concentração total de Cr(VI).

pH	Concentração total de Cr(VI)	Espécie
< 1	Independente	H_2CrO_4
1 – 6,5	< 0,01 mol L ⁻¹	HCrO_4^-
	> 0,01 mol L ⁻¹	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$
> 6,5	Independente	CrO_4^{2-}

1.2.2. Reações de oxidação e redução

Apesar da oxidação do Cr(III) a Cr(VI) poder ser realizada por outros agentes, no ambiente natural apenas os óxidos de manganês existem em concentração suficientemente elevada para promover essa conversão [21]. Neste processo, os óxidos de manganês funcionam como transportadores de elétrons entre o Cr(III) e o oxigênio dissolvido [22].

Por outro lado, o Cr(VI) pode ser mais facilmente reduzido a Cr(III) na presença de Fe^{2+} , S^{2-} , PO_4^{3-} , matéria orgânica (por exemplo, ácido húmico), compostos orgânicos (ácidos carboxílicos, aldeídos e fenóis) e pela ação de alguns microrganismos [15, 23]. Embora seja termodinamicamente menos favorecida, esta redução ocorre facilmente devido às elevadas concentrações destes agentes redutores presentes no ambiente [21]. É mais frequente em meio ácido, visto que, em condições básicas o Cr(VI) é estabilizado e tende a permanecer nessa forma.

1.3. Cr(III) vs Cr(VI)

O estado de oxidação do Cr determina grandes diferenças em termos da sua solubilidade, mobilidade no ambiente e toxicidade.

O Cr(III) é considerado um elemento essencial para humanos, estando envolvido no metabolismo dos hidratos de carbono, dos lipídios e das proteínas. Pode também aumentar a utilização da glicose e a sua conversão em lipídios, aumenta o colesterol HDL, diminui o colesterol total, o colesterol LDL e os triacilgliceróis, e melhora a captação de aminoácidos pelas células musculares.

Por outro lado, o Cr(VI) é classificado como um agente carcinogénico para os humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e pela USEPA. A sua toxicidade é bem conhecida e encontra-se bem documentada.

As funções essenciais desempenhadas pelo Cr(III) no organismo humano e os efeitos negativos do Cr(VI) são apresentados em maior detalhe nos pontos seguintes.

1.3.1. Cr(III) – o crómio essencial

In 1977, Jeejeebhoy e seus colaboradores, foram os primeiros a indicar o Cr(III) como um elemento vestigial essencial para os humanos [24]. Nos anos que se seguiram, este facto foi confirmado por outros autores que demonstraram o papel do Cr no metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas [25].

O organismo humano pode obter Cr a partir de uma grande variedade de alimentos. Carne, brócolos, batatas e especiarias constituem boas fontes deste elemento, enquanto a maioria dos frutos possui teores baixos [26]. Após a sua absorção no intestino, o Cr(III) entra na corrente sanguínea onde é transportado pela transferrina, a mesma glicoproteína que transporta o ferro [27]. Como não é um substrato dos sistemas de transporte de aniões, o Cr(III) não pode difundir-se facilmente através da membrana celular. Existem algumas evidências de que sua internalização ocorre por pinocitose [28].

Uma vez dentro da célula, o Cr(III) atua aumentando a eficiência da insulina, e embora o mecanismo de ação ainda não seja totalmente compreendido, têm vindo a ser propostas algumas teorias [29]. A mais amplamente aceite é a existência de um oligopeptídeo designado cromodulina, encontrado no fígado de ratos e bovinos e considerado a forma biologicamente ativa do Cr [30]. A cromodulina é um pequeno peptídeo, capaz de ligar quatro átomos de Cr, com uma massa de 1.500 kDa e constituído por dez aminoácidos: duas glicinas, duas cisteínas, quatro ácidos glutâmicos e dois ácidos aspárticos [31, 32]. Existe no citoplasma e no núcleo das células na sua forma inativa designada apocromodulina. Quando o nível de glicose no sangue aumenta, a insulina liga-se aos seus recetores. O complexo transferrina-Cr(III) é internalizado e é ativada uma bomba de prótons dependente de ATP. O Cr é libertado da transferrina e liga-se à apocromodulina. Após a ligação de quatro átomos de Cr, a cromodulina liga-se à subunidade beta do recetor da insulina e ativa o recetor tirosina quinase que amplifica o sinal de insulina (figura 3). Esta amplificação do sinal ocorre através da mobilização de proteínas GLUT4 (principal transportador de glicose) para a membrana celular. Outras teorias baseiam-se na ativação direta dos recetores da insulina ou dos estrogénios, e na

capacidade do Cr para influenciar a fluidez da membrana celular, regulando a captação de glicose pelas células [29, 33-35].

O aumento da eficiência da insulina possui um impacto no metabolismo dos hidratos de carbono, lipídios e proteínas. O Cr(III) pode aumentar a utilização de glicose e a sua conversão em lipídios, aumentar o colesterol HDL, diminuir o colesterol total, o colesterol LDL e os triacilgliceróis, e melhorar a captação de aminoácidos pelas células musculares [25]. Mais recentemente, alguns estudos com bactérias, ratinhos e leveduras mostraram que o Cr(III) também pode ser genotóxico, uma vez que aumenta as deleções, clivagem e mutações do ADN, e pode formar aductos Cr(III)-ADN que bloqueiam a replicação do mesmo [36-38]. No entanto, a sua toxicidade é 10 a 100 vezes menor do que a do Cr(VI), principalmente devido à impermeabilidade das membranas celulares aos seus compostos.

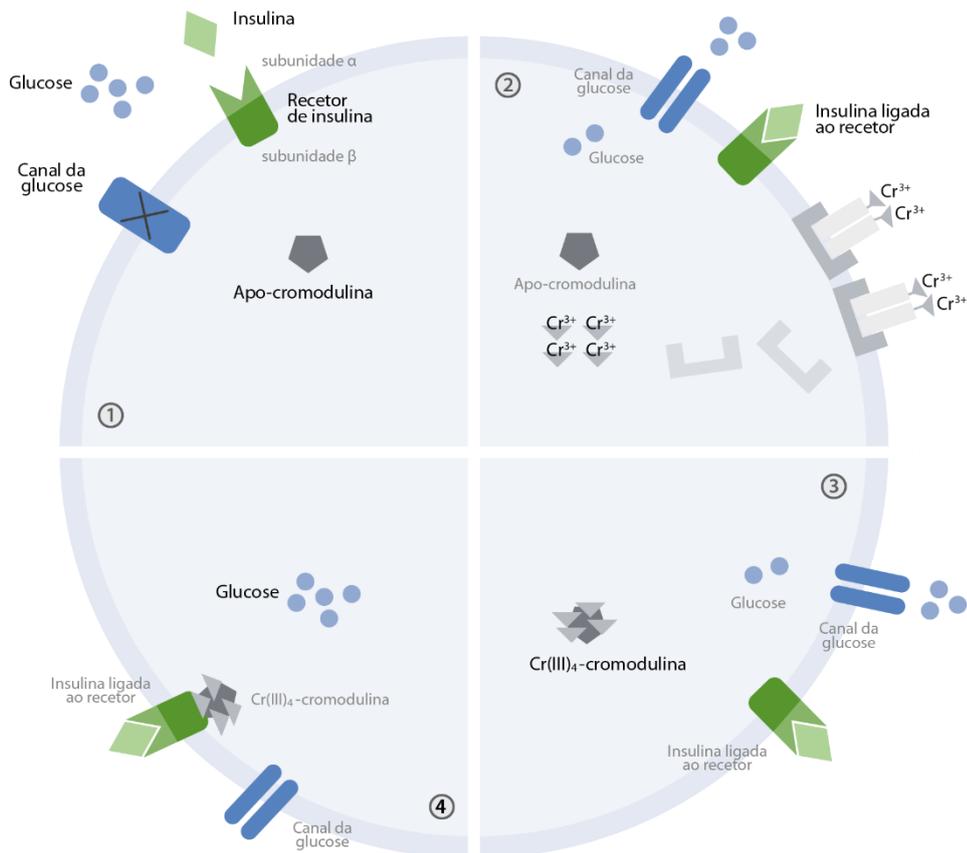


Figura 3 – Mecanismo de ação do Cr(III) como micronutriente essencial. 1 – Apo-cromodulina na sua forma inativa, enquanto os níveis de glicose no sangue aumentam; 2 – A insulina liga-se aos respetivos recetores, o complexo transferrina-Cr(III) é internalizado e o Cr(III) é libertado; 3 – Quatro átomos de Cr(III) ligam-se à cromodulina e originam o complexo Cr(III)₄-cromodulina, a forma ativa; 4 – O complexo Cr(III)₄-cromodulina liga-se à subunidade β do recetor da insulina e estimula a ação da insulina, promovendo a entrada de mais glicose na célula.

1.3.2. Cr(VI) – o crómio tóxico

No estado de oxidação +6, o Cr está classificado como um agente carcinogénico para os humanos pela IARC e pela USEPA [39, 40]. Como já se referiu, em solução aquosa, o Cr(VI) existe sob a forma de espécies oxianiónicas, agentes fortemente oxidantes [40].

A exposição prolongada a compostos de Cr(VI) está associada ao desenvolvimento de cancro (principalmente no sistema respiratório), dermatite e outras lesões cutâneas, irritação e/ou obstrução das vias aéreas, asma, bronquite crónica e problemas no desenvolvimento fetal [18, 41, 42]. Estes efeitos são particularmente frequentes em trabalhadores industriais expostos por inalação ou contato direto com produtos contendo Cr. Para a população em geral, a exposição ocorre maioritariamente através da ingestão de alimentos e/ou água contendo Cr. Esta exposição oral crónica pode também provocar danos no trato respiratório, fígado, rins, sistema gastrointestinal e sistema imunológico [43].

Uma vez no organismo, o Cr(VI) tende a ser reduzido a Cr(III). Esta redução pode ser realizada no estômago pelo suco gástrico [44], nos pulmões pelos fluídos do epitélio de revestimento [45] ou no interior das células por agentes redutores como o ascorbato – o mais poderoso redutor biológico do Cr(VI) – mas também pela glutathione (GSH) e pela cisteína [46-48]. Na mitocôndria o NAD(P)H parece ser o principal redutor [49].

Ao contrário do Cr(III), o Cr(VI) é facilmente captado pelas células através dos canais de troca aniónica, uma vez que a estrutura do cromato (CrO_4^{2-}) é semelhante à estrutura de outros aniões, como SO_4^{2-} e PO_4^{3-} [21]. A toxicidade e a mutagenicidade do Cr(VI) são provocadas principalmente pelos produtos que resultam da sua redução: intermediários instáveis [Cr(IV) e Cr(V)], espécies reativas de oxigénio (ROS) e Cr(III) [50].

A interação do Cr(VI) com os componentes celulares pode levar a um aumento na produção de ROS e conseqüentemente ao stresse oxidativo, que pode provocar a oxidação das bases do ADN e dos lipídios [51, 52]. Durante o processo de redução intracelular, são formados os intermediários Cr(V) e Cr(IV), capazes de catalisar reações de Fenton, que possuem o poderoso oxidante radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) como um dos produtos finais (figura 4) [49, 53].

O Cr(III) é, portanto, o produto final da redução do Cr(VI). Apesar de ser considerado um micronutriente essencial, também possui atividade genotóxica. Dentro da célula, liga-se mais eficientemente que o Cr(VI) ao grupo fosfato das moléculas de ADN,

formando adutos que podem bloquear a sua replicação [54]. Estes adutos são os danos mais frequentemente encontrados em mamíferos. Juntamente com a oxidação das bases azotadas e a formação de adutos, as células expostas ao Cr(VI) apresentam também outros tipos de danos no ADN: quebras de cadeia simples (SSB – *single-strand breaks*) [55], quebras de cadeia dupla (DSB – *double-strand breaks*) [56], locais abásicos [46], quebra de cromossomas e formação de micronúcleos [57, 58]. Todos esses danos podem culminar na transformação maligna das células.

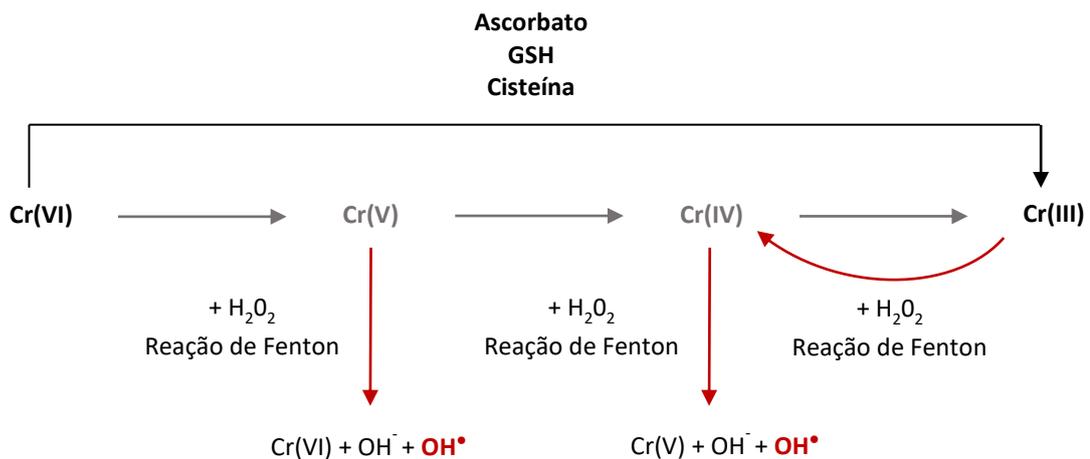


Figura 4 – Processo de redução intracelular do Cr(VI) a Cr(III) e reações de Fenton catalisadas pelos intermediários instáveis Cr(V) e Cr(IV) [49].

1.4. Suplementos alimentares – enquadramento legal europeu

Em 10 de junho de 2002, foi publicada a Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares [59], transposta para a ordem jurídica interna portuguesa pelo Decreto-Lei n.º 136/2003. Esta foi a primeira diretiva europeia direcionada para estes produtos. Até então, cada Estado-Membro aplicava as suas próprias leis nacionais. Os principais objetivos eram facilitar a livre circulação dos suplementos alimentares no mercado europeu, evitar condições de concorrência desiguais e proteger os consumidores, assegurando que os produtos são seguros e se encontram adequadamente rotulados. Como os suplementos alimentares são considerados géneros alimentícios, também estão sujeitos às leis gerais dos alimentos. O anexo 1 deste documento compila todos os regulamentos e diretivas

européias aplicáveis aos suplementos alimentares e o anexo 2 resume as alterações que a Diretiva 2002/46/CE sofreu ao longo dos anos.

De acordo com a Diretiva 2002/46/CE, suplementos alimentares são “géneros alimentícios que se destinam a complementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinados nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinados, comercializados em forma doseada, ou seja, as formas de apresentação como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida” [59]. A Diretiva alerta também para o facto de que “um regime alimentar adequado e variado pode, em circunstâncias normais, fornecer a um ser humano todos os nutrientes necessários ao seu bom desenvolvimento e à sua manutenção num bom estado de saúde”, pelo que os suplementos alimentares só devem ser usados para complementar e/ou suplementar uma dieta normal nos casos em que “esta situação ideal não está a ser alcançada”.

Em termos qualitativos, os suplementos alimentares podem conter um variado leque de ingredientes como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras, várias plantas e extratos de ervas [60]. Contudo, apenas as vitaminas e os minerais estão harmonizados nos Anexos I e II da Diretiva 2002/46/CE. Assim, o Anexo I define a lista de vitaminas e minerais que podem ser incorporados nos suplementos alimentares e o Anexo II lista as respetivas formas químicas (compostos) que podem ser utilizados no respetivo fabrico. Os anexos 3 e 4 deste documento apresentam a versão consolidada das referidas listas. Outros ingredientes podem ser incorporados desde que cumpram com o Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de novembro de 2015, relativo a novos alimentos [61]. Por conseguinte, deve ser possível estabelecer uma história de consumo alimentar significativo na União Europeia anterior a 15 de maio de 1997. Caso contrário, a *European Food Safety Authority* (EFSA) deve efetuar uma avaliação de segurança, para posterior aprovação pela Comissão Europeia, para que o ingrediente possa começar a ser utilizado na UE. De acordo com Regulamento (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006, sempre que um Estado-Membro possua motivos sérios para considerar que uma determinada substância pode ter efeitos nocivos para a saúde humana, pode pedir a sua inclusão numa lista de substâncias não-autorizadas [62].

Em termos quantitativos, a Diretiva 2002/46/CE estabelece que cabe ao fabricante fixar a quantidade de vitaminas e minerais presentes nos suplementos alimentares e a

posologia (dose diária) recomendada, tendo em conta as doses diárias de referência (DDR) e os limites superiores de segurança estabelecidos para essas vitaminas e minerais, e a quantidade ingerida através de outras fontes alimentares. Em 2006, a EFSA publicou um conjunto de diretrizes relacionadas com os níveis máximos de ingestão toleráveis para algumas vitaminas e minerais que devem ser considerados na elaboração de um suplemento alimentar [63].

No que diz respeito à rotulagem dos suplementos alimentares, esta deve seguir as regras estabelecidas nos seguintes regulamentos:

- Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios [64];
- Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos [65].

Para evitar a natureza enganosa da informação transmitida ao consumidor, o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 estabelece a lista de todas as alegações nutricionais que estão autorizadas a serem incluídas no rótulo de alimentos, e o site da Comissão Europeia fornece uma lista comunitária das alegações nutricionais e de saúde autorizadas e não autorizadas, a quais substâncias podem ser associadas e quais são suas condições ou restrições de uso [66]. A Diretiva 2002/46/CE estabelece também alguns aspetos específicos que devem ser incluídos no rótulo dos suplementos alimentares:

- A designação das categorias de nutrientes ou substâncias que caracterizam o produto ou uma referência específica à natureza desses nutrientes ou substâncias;
- A dose diária recomendada do produto;
- Uma advertência de que não deve ser excedida a dose diária indicada;
- A indicação de que os suplementos alimentares não devem ser utilizados como substitutos de um regime alimentar variado;
- Uma advertência de que os produtos devem ser guardados fora do alcance das crianças de tenra idade.

Em cada Estado-Membro, a autoridade competente responsável pela definição, aplicação e avaliação das políticas de segurança dos suplementos alimentares pode exigir que o fabricante ou a pessoa responsável pela colocação do produto no mercado envie uma notificação de comercialização. No entanto, não é exigida qualquer licença ou autorização antes da comercialização. Se a autoridade competente considerar necessário, também

pode solicitar ao operador que tenha efetuado a notificação a apresentação de estudos de qualidade e segurança dos produtos [59]. No entanto, os resultados destes estudos não têm de ser fornecidos na notificação de comercialização e não existe qualquer regulamentação ou diretriz sobre como devem ser realizados.

1.5. Crómio nos suplementos alimentares

Tendo em conta o papel do Cr(III) no metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos, tem-se afirmado que este pode contribuir para a redução da massa gorda e aumento da massa magra [67]. Embora os estudos existentes sobre os efeitos benéficos da suplementação com Cr sejam contraditórios, este tem sido amplamente utilizado como suplemento alimentar, componente de formulações multivitamínicas, alimentos enriquecidos, bebidas energéticas e como terapia adjuvante para pacientes que sofrem de diabetes tipo 2 e obesidade [29, 68, 69].

De acordo com a lista comunitária das alegações nutricionais e de saúde [66], para o Cr apenas estão autorizadas as seguintes:

- Contribui para o normal metabolismo dos macronutrientes;
- Contribui para a manutenção de níveis normais de glicose no sangue.

De acordo com a legislação Europeia, o Cr pode ser incorporado nos suplementos alimentares em seis formas de Cr(III): cloreto de crómio (III), lactato de crómio (III) tri-hidratado, nitrato de crómio, picolinato de crómio, sulfato de crómio (III) e leveduras enriquecidas em crómio. A sua biodisponibilidade depende da forma ingerida. Por exemplo, para uma dose de 1,000 µg/dia, a absorção de Cr a partir do cloreto de crómio (III) é de aproximadamente 0,4%, enquanto a partir do picolinato de crómio pode atingir os 2,8% [70, 71]. Estudos realizados em ratos demonstraram que o picolinato de crómio é absorvido de forma ligeiramente mais eficiente (2-5%) do que o crómio obtido através da dieta (0,5-2%) [72, 73]. No que diz respeito aos humanos, os dados sobre a absorção de Cr são escassos, não permitindo estabelecer qual a forma que garante uma maior absorção [68].

A 13 de dezembro de 2010, na sequência de um pedido da Comissão Europeia, o *Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food* (ANS pertencente à EFSA), publicou uma Opinião Científica sobre a segurança do picolinato de crómio como fonte de Cr adicionada para fins nutricionais a géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial e para alimentos destinados à população em geral. Uma vez que o picolinato de crómio é obtido sinteticamente, as especificações devem assegurar que os níveis de Cr(VI)

sejam os mais baixos possíveis ou que, pelo menos, resultem numa adequada margem de segurança [74].

A DDR (para adultos) de algumas vitaminas e minerais encontra-se estabelecida no Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios (anexo 5) [64]. Para o Cr, o respetivo valor de referência do nutriente (VRN) encontra-se fixado em 40 µg, mas a dosagem dos suplementos alimentares geralmente varia entre 50 e 200 µg [68]. O ANS concluiu também que, apesar dos danos que podem ser provocados no ADN pela ingestão de elevadas concentrações de picolinato de crómio, o seu consumo através de suplementos alimentares não é motivo de preocupação, desde que a quantidade de Cr total não exceda 250 µg dia⁻¹ [74]. Este é também o valor máximo para o consumo suplementar de Cr estabelecido pela OMS [75].

1.6. Discriminação entre Cr(III) e Cr(VI) – procedimentos analíticos

No fabrico de suplementos alimentares, está exclusivamente autorizada a utilização de Cr(III). No que diz respeito ao controlo de qualidade destes produtos, deve atender-se à possibilidade da sua adulteração, inadvertida ou intencional, com compostos de Cr(VI). Além disso, durante o processo de fabrico dos produtos, as condições de pH, potencial redox e a presença de compostos oxidantes, podem causar a sua oxidação a Cr(VI) [76]. Assim sendo, a quantificação do Cr total, que tem sido o principal objetivo da análise dos suplementos alimentares [77-81], não fornece toda a informação necessária. Para a avaliação da qualidade e segurança destes produtos, torna-se necessário desenvolver procedimentos analíticos que permitam a discriminação entre Cr(III) e Cr(VI), garantindo que apenas as formas de Cr(III) autorizadas estejam presentes e de acordo com os valores rotulados.

A especificação elementar consiste na discriminação das diferentes espécies químicas de um dado elemento presentes numa amostra. Para tal, são necessárias duas etapas:

1. Extração seletiva, retenção de uma das espécies, ou separação cromatográfica;
2. Deteção e quantificação.

Ao longo dos anos, uma grande variedade de técnicas têm sido utilizadas na especificação de Cr. Existem várias revisões abrangentes da literatura que resumem a sua aplicação a diferentes matrizes: alimentos, água, solos, entre outras [6, 19, 82, 83].

Contudo, tanto quanto nos foi possível apurar, apenas se encontram publicados dois procedimentos para especiação de Cr em suplementos alimentares. Martone e seus colaboradores, aplicaram o Método EPA 3060A na extração seletiva de Cr(VI) e a técnica de ICP-MS para a quantificação [76]. O Método EPA 3060A consiste numa digestão alcalina (utilizando a mistura NaOH-Na₂CO₃), desenvolvida para a extração de formas solúveis, adsorvidas e precipitadas de compostos Cr(VI) em solos, lamas, sedimentos e outros materiais residuais [84]. O Cr(VI) é extraído para a solução alcalina, enquanto o Cr(III) forma um precipitado que é posteriormente digerido antes da quantificação. A chamada espectrometria de massa com diluição isotópica “especiada” (*Speciated isotope dilution mass spectrometry* - SIDMS) e a espectrometria de massa com diluição isotópica (*Isotope Dilution Mass Spectrometry* - IDMS) foram utilizadas para corrigir as interconversões entre as espécies, que podem ocorrer devido às fortes condições básicas utilizadas.

Como alternativa mais simples, Unceta e seus colaboradores, usaram o acoplamento da cromatografia líquida a ICP-MS após pré-tratamento com EDTA [85]. As amostras de suplementos alimentares foram dissolvidas numa solução de EDTA aquecida a 95 °C em placa de aquecimento. Para além de tornar o pré-tratamento das amostras mais simples, a formação de complexos Cr(EDTA)⁻ previne a oxidação do Cr(III) a Cr(VI) e torna possível a sua separação por cromatografia aniônica. No caso específico da análise de suplementos comercializados como suplementos contendo Cr(III), a quantificação por calibração externa, sem recorrer a SIDMS ou IDMS, forneceu resultados precisos.

A especiação do Cr em suplementos alimentares não se encontra tão bem explorada como em outras matrizes, abrindo a possibilidade para o desenvolvimento de procedimentos novos, mais simples e expeditos.

1.7. Extração em fase sólida aplicada à especiação de crómio

No que diz respeito ao Cr, têm sido aplicados vários métodos para a separação das suas espécies em várias matrizes: métodos cromatográficos (cromatografia iónica e cromatografia líquida de alta eficiência), extração em fase sólida, extração líquido-líquido, métodos de microextração, extração em “ponto de nuvem”, entre outros [6, 19, 82, 83].

A extração em fase sólida é a técnica mais aplicada para a especiação de Cr em amostras ambientais, principalmente na análise de águas [6, 83], apresentando uma série de vantagens [83]:

- Condições de operação simples;
- Processo facilmente automatizável;
- Utilização de pequenos volumes de reagentes e amostras;
- Elevada taxa de transferência, ou seja, elevada quantidade de amostra capaz de passar pelo sistema;
- Elevado fator de pré-concentração.

A separação das espécies é possível devido à seletividade dos materiais utilizados para determinadas formas químicas ou estados de oxidação de um elemento. Um material pode ser capaz de reter (através de mecanismos de troca iônica, complexação, entre outros) uma determinada forma química ou estado de oxidação e não reter os restantes. Essa seletividade é dependente das condições do meio. Por exemplo, no caso do Cr, existem materiais capazes de reter apenas Cr(III) ou apenas Cr(VI), e outros capazes de reter ambos, mas em condições de pH diferentes [83].

Encontram-se descritos vários materiais que foram utilizados como adsorventes para o Cr. Os primeiros a ser aplicados na pré-concentração e especiação de Cr foram materiais porosos como o gel de sílica após modificação da sua superfície com agentes complexantes [86] ou óxidos metálicos para aumentar a sua seletividade [87], o carvão ativado [88] e as resinas de troca iônica ou resinas quelantes [6, 83]. Mais recentemente, a investigação científica tem-se focado no desenvolvimento de novos polímeros sintéticos recorrendo à impressão molecular [89], à utilização de nanomateriais [90] e à biossorção, utilizando algas, fungos e bactérias [91, 92].

Nos artigos publicados por Laura Trzonkowska e seus colaboradores [83], e Rupali Rakhunde e seus colaboradores [6], podemos encontrar uma excelente revisão dos trabalhos em que resinas de troca iônica e resinas quelantes foram aplicadas na especiação de Cr em matrizes ambientais e em águas, respetivamente. Na maioria dos casos, as resinas são utilizadas como enchimento de colunas de modo a facilitar a automatização dos processos. A automatização da extração em fase sólida e posterior ligação direta aos detetores através de sistemas de injeção sequencial ou *lab-on-valve* (LOV) tem vindo a ser amplamente utilizada, assegurando a diminuição do volume de amostras necessário para a análise e a menor manipulação das mesmas.

No que diz respeito a matrizes alimentares, o artigo publicado por Hamilton e seus colaboradores [82], faz também uma revisão das principais técnicas de extração utilizadas

para a análise de Cr. De acordo com esta revisão, a aplicação de extração em fase sólida a este tipo de matrizes apenas foi reportada por Shizhong Chen e colaboradores [93], tendo sido utilizados nanotubos de dióxido de titânio como enchimento de microcolunas para a especiação de Cr em folhas de chá.

No caso específico dos suplementos alimentares, não há qualquer relato da aplicação da extração em fase sólida para especiação quer de Cr, quer de outros elementos. Tal como já foi referido, no que se refere a suplementos alimentares, apenas foram descritos dois procedimentos para a especiação de Cr, um baseado na extração de Cr(VI) através do método EPA 3060A, e outro na separação de Cr(III) e Cr(VI) por cromatografia líquida. Tendo em conta as vantagens apresentadas pela extração em fase sólida, optou-se neste trabalho por testar a aplicação desta técnica na especiação de Cr em suplementos alimentares, na tentativa de desenvolver um método mais expedito e com condições de operação mais simples.

1.8. Resina Metalfix-Chelamine

As resinas quelantes possuem grupos funcionais que contêm normalmente átomos de oxigénio (O), azoto (N), enxofre (S) ou fósforo (P), com pares de eletrões desemparelhados, capazes de atuar como dadores desses eletrões, e conseqüentemente complexar iões metálicos. A complexação é condicionada por uma série de fatores como o grau de protonação dos grupos funcionais, a carga dos iões, a força iónica do meio, o tempo de contacto, entre outros.

Neste trabalho foi utilizada a resina Metalfix-Chelamine, uma resina quelante disponível sob a forma de partículas de 40 a 80 µm de diâmetro, que apresenta como grupo funcional um ligando do tipo pentamina, a tetraetilenopentamina, imobilizada num polímero orgânico, a poliacrilamida reticulada. A estrutura da tetraetilenopentamina encontra-se representada na figura 5. Este grupo funcional é seletivo para os metais de transição, apresentando uma elevada afinidade para os mesmos e, simultaneamente, não possuindo afinidade para os metais alcalinos e alcalino terrosos. Esta seletividade é apontada como uma das principais vantagens para a utilização da resina Metalfix-Chelamine na pré-concentração de metais vestigiais [94-103].

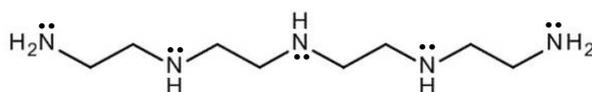


Figura 5 – Estrutura química da tetraetileno-pentamina, grupo funcional da resina Metalfix-Chelamine [104].

As publicações científicas em que esta resina foi utilizada na pré-concentração de metais encontram-se sumariadas na tabela 7, tendo em alguns casos a resina sido aplicada no enchimento de colunas, que apresentaram bom desempenho hidrodinâmico e boa estabilidade ao longo de sucessivas utilizações [96, 97].

Tanto quanto nos foi possível apurar, a resina Metalfix-Chelamine nunca foi utilizada para efeitos de especiação e apenas num dos trabalhos foi realizado o estudo da retenção de Cr [96]. Em solução, no intervalo de pH 0-6, o Cr(III) apresenta-se sob a forma de espécies carregadas positivamente [$\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$], que podem ser complexadas pela resina através da ligação formada com os elétrons desemparelhados dos átomos de N do grupo tetraetileno-pentamina. Por outro lado, o Cr(VI) apresenta-se sob a forma de espécies carregadas negativamente [CrO_4^{2-} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, HCrO_4^-], não existindo a possibilidade de complexação, tornando possível a separação dos dois estados de oxidação.

Na tabela periódica apresentada na figura 6 encontram-se destacados os elementos autorizados a ser introduzidos nos suplementos alimentares. No caso específico deste tipo de produtos, a seletividade da resina Metalfix-Chelamine para os metais de transição representa uma enorme vantagem quando se pretende realizar a especiação de Cr. O Cr(III) é um metal de transição e possui uma DDR baixa (40 μg) em comparação com outros minerais como o potássio (2000 mg), o cálcio (800 mg) ou o magnésio (375 mg). O K é um metal alcalino e o Ca e o Mg são metais alcalinoterrosos. Isto significa que, apesar de poderem existir nos suplementos alimentares em quantidades muito superiores ao Cr(III), teoricamente não irão provocar interferências na sua retenção.

De acordo com as especificações do fabricante, esta resina apresenta uma capacidade estática superior a 1,0 mmol g^{-1} (massa seca) para o Zn. A sua densidade é de aproximadamente 0,8 quando hidratada (aproximadamente 150% do seu peso em água) e é utilizável no intervalo de pH 1-12 [96].

Tendo em conta todas as características e vantagens já referidas, a resina Metalfix-Chelamine configurou uma boa opção para a realização deste trabalho.

Tabela 7 – Aplicação da resina Metalfix-Chelamine na pré-concentração de metais.

Metais	Matrizes a que foi aplicada	Técnica de quantificação	Referência
Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn	Água do mar	EAA/AE	[95]
Cd, Cu, Pb, Mn e Ni	Urina	ICP-AES	[98]
Au, Pt, Pd, Ir e Rh	Minérios, silicatos e rochas	ICP-MS	[102]
Cu, Pb, Cd e Hg	Água do mar	EAA/chama	[103]
Ni, Pb e Cd	Madeira de abeto	ICP-AES	[94]
Cu	Urina	EAA/chama	[97]
Pd	Soluções de lixiviação provenientes da indústria metalúrgica	EAA	[105]
Cd, Cu, Pb, Zn, Sc, La, Ce, Nd e Yb	Água do mar	ICP-MS	[106]
Be, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sb, Ba, Ti, Pb, Th, U	Águas engarrafadas	ICP-MS	[96]
Pd	-	EAA/chama	[105]
Cd, Co, Cu, Ni e Zn	-	ICP-MS	[107]
Au, Ir, Pd, Pt, Rh e Ru	-	ICP-AES	[100]
Pd(II) e Pt(IV)	-	ICP-OES	[101]

1												18					
1 H 1,01											2 He 4,00						
3 Li 6,94	4 Be 9,01	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> Número atômico Elemento Massa atômica relativa </div>										5 B 10,81	6 C 12,01	7 N 14,01	8 O 16,00	9 F 19,00	10 Ne 20,18
11 Na 22,99	12 Mg 24,31	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 Al 26,98	14 Si 28,09	15 P 30,97	16 S 32,07	17 Cl 35,45	18 Ar 39,95
19 K 39,10	20 Ca 40,08	21 Sc 44,96	22 Ti 47,87	23 V 50,94	24 Cr 52,00	25 Mn 54,94	26 Fe 55,85	27 Co 58,93	28 Ni 58,69	29 Cu 63,55	30 Zn 65,41	31 Ga 69,72	32 Ge 72,64	33 As 74,92	34 Se 78,96	35 Br 79,90	36 Kr 83,80
37 Rb 85,47	38 Sr 87,62	39 Y 88,91	40 Zr 91,22	41 Nb 92,91	42 Mo 95,94	43 Tc 97,91	44 Ru 101,07	45 Rh 102,91	46 Pd 106,42	47 Ag 107,87	48 Cd 112,41	49 In 114,82	50 Sn 118,71	51 Sb 121,76	52 Te 127,60	53 I 126,99	54 Xe 131,29
55 Cs 132,91	56 Ba 137,33	57-71 Lantanídeos	72 Hf 178,49	73 Ta 180,95	74 W 183,84	75 Re 186,21	76 Os 190,23	77 Ir 192,22	78 Pt 195,08	79 Au 196,97	80 Hg 200,59	81 Tl 204,38	82 Pb 207,21	83 Bi 208,98	84 Po [208,98]	85 At [209,99]	86 Rn [222,02]
87 Fr [223]	88 Ra [226]	89-103 Actinídeos	104 Rf [261]	105 Db [262]	106 Sg [266]	107 Bh [264]	108 Hs [277]	109 Mt [268]	110 Ds [271]	111 Rg [272]							
		57 La 138,91	58 Ce 140,12	59 Pr 140,91	60 Nd 144,24	61 Pm [145]	62 Sm 150,36	63 Eu 151,96	64 Gd 157,25	65 Tb 158,92	66 Dy 162,50	67 Ho 164,93	68 Er 167,26	69 Tm 168,93	70 Yb 173,04	71 Lu 174,98	
		89 Ac [227]	90 Th 232,04	91 Pa 231,04	92 U 238,03	93 Np [237]	94 Pu [244]	95 Am [243]	96 Cm [247]	97 Bk [247]	98 Cf [251]	99 Es [252]	100 Fm [257]	101 Md [258]	102 No [259]	103 Lr [262]	

Figura 6 – Tabela periódica em que estão assinalados os elementos autorizados a ser introduzidos nos suplementos alimentares.

1.9. Espectrometria de massa com plasma de acoplamento indutivo

A espectrometria de massa com plasma de acoplamento indutivo (comumente referida pela abreviatura da sua designação em inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP-MS) é uma técnica analítica aplicável a um grande número de elementos (metais e não metais) e que permite uma análise multielementar bastante rápida (determinar a grande maioria dos elementos da tabela periódica em poucos minutos). É uma das poucas técnicas que permite realizar análise isotópica e a mais sensível (com menores limites de deteção, tipicamente inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$) de que se dispõe nos laboratórios de análise.

A base de funcionamento desta técnica consiste na produção de iões por ação do plasma (meio a altas temperaturas) que são posteriormente separados e quantificados num espectrómetro de massa.

Os equipamentos são constituídos por quatro componentes principais (figura 7):

- Sistema de introdução da amostra: *autosampler*, bomba peristáltica, nebulizador e câmara de nebulização;
- Sistema de ionização (fonte de iões): tocha, gerador de radiofrequência e gás plasmogénico (normalmente árgon), para produzir o plasma;
- Espectrómetro de massa;
- Sistema de processamento e registo de dados.

As amostras são aspiradas e propulsionadas, com auxílio de uma bomba peristáltica, por um tubo capilar até ao nebulizador. No nebulizador são convertidas num aerossol de pequenas gotículas. Apenas as gotículas mais pequenas (com tamanho inferior a $5 \mu\text{m}$) são arrastadas para a tocha, o componente (de vidro) que confina o plasma. O plasma é um gás, normalmente árgon, que, após uma ionização inicial provocada por uma descarga elétrica (faísca), sob ação de um forte campo magnético (produzido pelo gerador de radiofrequência), se mantém ionizado, atingindo temperaturas muito elevadas (4000-10000 K). No plasma, as elevadas temperaturas fornecem energia suficiente para que as espécies elementares percam eletrões e sejam convertidas em iões carregados positivamente (maioritariamente monovalentes). Estes iões passam para um espectrómetro de massa onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z).

A técnica de ICP-MS é uma das técnicas de detecção mais utilizada em procedimentos de especificação, incluindo os que se encontram descritos para a especificação de Cr, sendo facilmente acoplada às técnicas utilizadas para a separação das espécies [6, 82, 83]. O ^{52}Cr é o isótopo mais abundante, e por isso é preferencialmente utilizado para as determinações de Cr por ICP-MS.

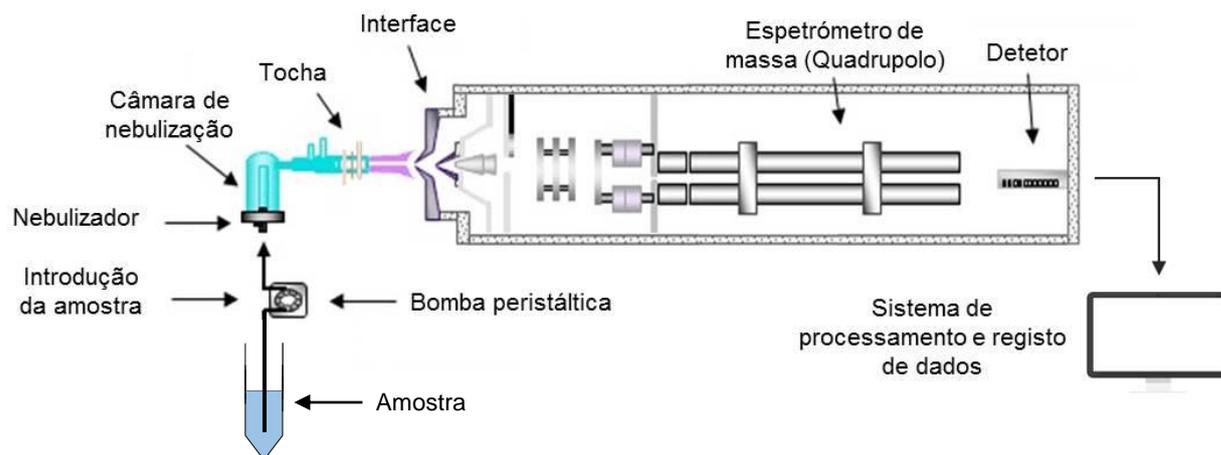


Figura 7 – Esquema simplificado de um equipamento ICP-MS (adaptado de [108]).

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e materiais

Em todo o trabalho foi utilizada água ultrapura (resistividade > 18,2 MΩ.cm a 25°C) obtida a partir de um sistema de purificação de água Arium®Pro (Sartorius, Goettingen, Alemanha).

As pesagens foram realizadas numa balança analítica KERN®, modelo AES (Balingen, Alemanha) e o pH das soluções foi determinado por potenciometria através de um medidor de pH Crison®, modelo GLP 22 (Barcelona, Espanha). Utilizou-se também um agitador Lab. Special Mixer (Digisystem Laboratory Instruments Inc, New Taipei City, Taiwan) e uma centrífuga da marca Beckman Coulter, modelo Allegra® X-15R (Atlanta, GA). Na solubilização ácida das amostras utilizou-se uma mufla Carbolite® Gero (Hope Valley, Reino Unido) e uma placa de aquecimento Heidolph 3001 series (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para a quantificação de Cr por ICP-MS, foram preparados padrões de calibração através da diluição adequada da solução padrão multielementar PlasmaCAL SCP-33-MS 100 µg L⁻¹ (SCP Science, Baie-d'Urfé, Quebec, Canadá), e como padrão interno utilizou-se ICP-MS-200.8-IS-1 (Internal Standard solution; Bi, In, Sc, Tb and Y, 100mg/L, AccuStandard, New Haven, CT).

Todo o material de laboratório era feito de polietileno e foi sempre descontaminado por imersão durante, pelo menos, 24 h numa solução de HNO₃ 10% (v/v) e posterior lavagem, por três vezes, com água ultrapura, antes de ser utilizado.

2.1.1. Metalfix-Chelamine

Foi utilizada a resina Metalfix-Chelamine (Fluka, Espanha), sob a forma de partículas de 40 a 80 µm de diâmetro. Antes da sua utilização, aproximadamente 6 g de resina eram lavadas de acordo com a seguinte sequência: H₂O ultrapura (20 mL; 5 minutos), HNO₃ 2% (5 mL; 5 minutos) e H₂O ultrapura (20 mL; 5 minutos).

Sendo que o efeito da quantidade (massa) de resina não foi estudado, a massa utilizada nos ensaios individuais foi escolhida de modo a assegurar que a sua capacidade (saturação) não era ultrapassada. Para o Zn, a resina apresenta uma capacidade superior a 1,0 mmol g⁻¹ de massa seca, ou seja, 0,5 g de resina serão teoricamente suficientes para reter no mínimo 32,7 mg de Zn, um valor significativamente superior ao somatório das quantidades de metais de transição que podem comumente estar presentes num suplemento alimentar. Por exemplo, se considerarmos um suplemento que contenha, por unidade de dosagem (comprimido, cápsula, entre outros), todos os metais de transição em

quantidades correspondentes a 100% das suas DDR, ao todo teremos cerca de 27,1 mg de metais de transição. Assim, optou-se por utilizar uma massa de 0,5 g em todos os ensaios realizados.

2.1.2. Preparação de soluções

Soluções stock com $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou Cr(VI) foram preparadas pela dissolução dos sais $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a., Merck), respetivamente. A partir destas soluções foram preparadas, por diluição com água ultrapura ou com a solução tampão em estudo, soluções de trabalho de Cr(III) $400 \mu\text{g L}^{-1}$, Cr(III) $40 \mu\text{g L}^{-1}$, Cr(VI) $400 \mu\text{g L}^{-1}$, Cr(VI) $40 \mu\text{g L}^{-1}$, Cr(III)+Cr(VI) contendo $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uma das espécies e Cr(III)+Cr(VI) contendo $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uma das espécies, de acordo com o esquema da figura 8. Quando a diluição foi efetuada com solução tampão, o pH da solução final foi verificado por potenciometria.

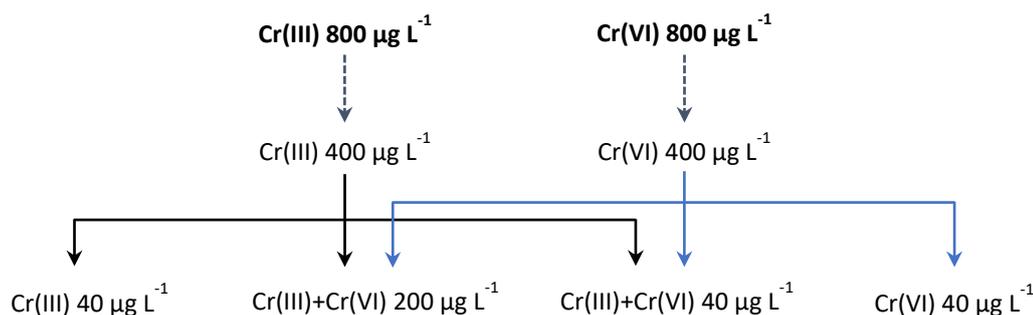


Figura 8 – Preparação das soluções de trabalho de Cr(III) e Cr(VI).

As soluções de ácido clorídrico (HCl), ácido acético (CH_3COOH) e ácido nítrico (HNO_3) foram preparadas por diluição das respetivas soluções comerciais concentradas: HCl (~37%, grau analítico, Fluka), CH_3COOH (conforme às especificações da USP, Sigma-Aldrich) e HNO_3 ($\geq 69\%$ w/w, *TraceSELECT*[®], Fluka, L'Isle d'Abeau Chesnes, França).

As soluções de cloreto de potássio (KCl), acetato de sódio (CH_3COONa) e hidrogenoftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, posteriormente referido pela abreviatura KHP) foram preparadas por dissolução em água ultrapura dos respetivos sais: KCl (a.r., Chem-Lab, Zedelgem, Bélgica), CH_3COONa (*ReagentPlus*[®], $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich) e $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ (99,95-100,05%, ACS, Sigma-Aldrich). As soluções tampão HCl 0,2 M/KCl 0,2 M, HCl 0,1 M/KHP 0,1 M e CH_3COOH 0,1 M/ CH_3COONa 0,1 M foram preparadas de acordo com as proporções tabeladas [109].

Soluções stock dos restantes minerais autorizados a ser utilizados na produção de suplementos alimentares foram preparadas por dissolução em água ultrapura de um dos respetivos sais que constam da lista de formas químicas autorizadas (tabela 8). Posteriormente, um volume adequado destas soluções stock foi adicionado individualmente a soluções de trabalho de Cr(III) $40 \mu\text{g L}^{-1}$, de modo a obter uma concentração final de cada mineral correspondente à sua DDR por litro (tabela 8).

Tabela 8 – Reagentes utilizados para a preparação das soluções stock dos minerais autorizados a ser utilizados na produção de suplementos alimentares.

Mineral	Composto	Marca	Concentração final
Cálcio (Ca)	CaCl ₂	Sigma-Aldrich	800 mg L ⁻¹
Magnésio (Mg)	MgSO ₄	p.a., anidro, Merck	375 mg L ⁻¹
Ferro (Fe)	FeSO ₄ .7H ₂ O	puriss p.a., ACS, ≥99.5%, Fluka	14 mg L ⁻¹
Cobre (Cu)	CuSO ₄	puriss. p.a., anidro, ≥99.0%, Fluka	1 mg L ⁻¹
Iodo (I)	KIO ₃	p.a., Merck	150 μg L ⁻¹
Zinco (Zn)	(CH ₃ COO) ₂ Zn.2H ₂ O	R.G., Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha	10 mg L ⁻¹
Manganês (Mn)	MnCl ₂ .4H ₂ O	ACS, VWR Chemicals, Barcelona, Espanha	2 mg L ⁻¹
Potássio (K)	KHCO ₃	p.a., Merck	2000 mg L ⁻¹
Selénio (Se)	Na ₂ SeO ₄	Sigma-Aldrich	55 μg L ⁻¹
Molibdénio (Mo)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Grau analítico, conforme à Ph. Eur., Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha	50 μg L ⁻¹
Fluoreto (F)	NaF	PA-ACS-ISO, Panreac, Barcelona, Espanha	3,5 mg L ⁻¹
Cloreto (Cl)	NaCl	ACS, conforme à Ph. Eur., VWR Chemicals, Leuven, Bélgica	800 mg L ⁻¹
Fósforo (P)	KH ₂ PO ₄	p.a., Merck	700 mg L ⁻¹
Boro (Bo)	H ₃ BO ₃	ACS, ISO, conforme à Ph. Eur., Chem-Lab, Zedelgem, Bélgica	3 mg L ⁻¹
Silício (Si)	SiO ₂ .2H ₂ O	LOBAL Chemie, Mumbai, Índia	525 mg L ⁻¹

Prepararam-se também soluções apenas com o mineral em estudo, sem Cr(III) (ensaio branco) e uma solução designada “MIX”, com todos os minerais autorizados. Para a solução “MIX” o ensaio branco correspondeu a uma solução com todos os minerais autorizados, exceto o Cr(III).

No caso da solução “MIX”, a concentração final de K era ligeiramente superior à DDR por litro devido à contribuição dos sais utilizados para a preparação das soluções stock de fósforo e iodo (concentração final de K = 2005 mg L⁻¹). O mesmo se verificou para o Cl, devido à contribuição dos sais utilizados para a preparação das soluções stock de Ca e Mn (concentração final de Cl = 813 mg L⁻¹).

Na legislação atualmente em vigor não se encontra definida uma DDR para o boro (B) e para o silício (Si). Após uma breve pesquisa, pôde verificar-se que, para o B, a maioria dos suplementos alimentares apresenta uma quantidade de 3 mg por unidade de dosagem (cápsula, comprimido ou outros). No caso do Si, a quantidade deste mineral nos suplementos é mais variável, sendo que o maior valor encontrado foi de 525 mg. Assim, no caso do B e do Si, estes minerais foram adicionados de modo a obter-se uma concentração final de 3 mg L⁻¹ e 525 mg L⁻¹, respetivamente.

2.2. Instrumentação

A determinação de Cr foi efetuada por ICP-MS, utilizando um equipamento iCAP™ Q (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com um nebulizador MicroMist™ (Glass Expansion, Port Melbourne, Austrália), uma câmara de nebulização ciclónica (arrefecida por efeito de Peltier), uma tocha de quartzo (*standard*) e cones de níquel. Como gás de nebulização e plasmogénico foi utilizado árgon de elevada pureza (99.9997%) (Gasin II, Leça da Palmeira, Portugal). As condições típicas de operação do equipamento encontram-se indicadas na tabela 9.

Tabela 9 – Condições típicas de operação do equipamento ICP-MS.

Parâmetro	Valor
Potência RF (W)	1548.6
Caudal árgon arrefecimento (L/min)	14.0
Caudal árgon auxiliar (L/min)	0.8
Caudal árgon nebulização (mL/min)	1.01
Velocidade da bomba peristáltica (rpm)	40.0
Temperatura da câmara de nebulização (°C)	2.7
Número de réplicas	3.0
“Dwell time” (ms)	0.1

2.3. Ensaios em *batch*

O estudo da retenção do Cr(III) e do Cr(VI) pela resina foi efetuado através de ensaios em *batch*, de acordo com o seguinte procedimento:

1. 0,5 g de resina (lavada; ver atrás) foram colocados em contacto com 9 mL da solução teste num tubo falcon de 15 mL;
2. Os tubos foram mantidos em agitação durante 60, 30, 15 ou 5 minutos num agitador (tal como representado na figura 9);
3. Findo o tempo de agitação, 5 mL de solução foram recolhidos e centrifugados a 3000 rpm, durante 5 minutos;
4. A resina depositada no fundo dos tubos foi descartada;
5. Efetuou-se a quantificação de Cr no sobrenadante e na solução de trabalho (sem ter estado em contacto com a resina), para posterior cálculo da percentagem de retenção.



Figura 9 – Ensaio em *batch*. Tubos falcon com 0,5 g de resina e 9 ml da solução teste no agitador.

2.4. Ensaio em coluna

Para a construção da coluna foram testados dois formatos de seringa: seringas de 5 mL, com 130 mm de diâmetro (HSW, Tuttlingen, Alemanha), e seringas de 1 mL, com 0,5 mm de diâmetro (B. Braun, Hessen, Alemanha). Na extremidade foi colocado um filtro de polipropileno com poro de 12 mm (Supelco Analytical, Bellefonte, PA), de modo a impedir a saída da resina. Uma suspensão em tampão de 0,5 g de resina foi utilizada como enchimento (figura 10). Os ensaios foram realizados de acordo com o seguinte procedimento:

- 1. Etapa de lavagem:** Aspirar no sentido ascendente 1 mL de HNO₃ 2%, 3 vezes;
- 2. Etapa de condicionamento:** Aspirar no sentido ascendente 1 mL de tampão, 2 vezes. Fazer passar 1 mL de tampão pela coluna, pressionando o êmbolo da seringa. Este último mL era recolhido para análise (determinação de Cr);
- 3. Passagem da amostra pela coluna:** 2 mL da amostra foram feitos passar pela coluna pressionando o êmbolo da seringa de modo que o gotejamento ocorresse a uma taxa de cerca de 2 mL/minuto, descartando o primeiro mL e recolhendo o segundo para análise.

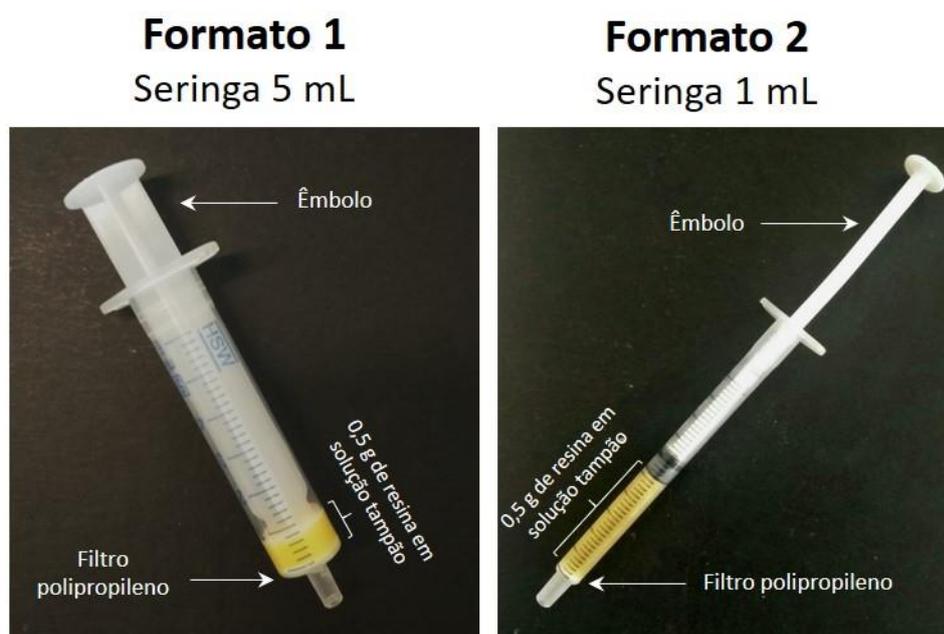


Figura 10 – Construção das colunas utilizando dois formatos distintos de seringa.

Nos capítulos seguintes, a amostra antes da passagem pela coluna é designada solução IN, e a amostra após passagem pela coluna é designada solução OUT.

2.5. Pré-tratamento de amostras reais

Amostras de dois suplementos alimentares sólidos minero-vitamínicos, designados SA1 e SA2, foram sujeitas a dois pré-tratamentos distintos. A composição mineral de cada amostra, de acordo com o indicado nos respetivos rótulos, encontra-se discriminada na tabela 10.

2.5.1. Dissolução em água

Vinte comprimidos foram pesados e reduzidos a um pó fino num almofariz. A massa de pó correspondente a 200 μg de Cr (massa correspondente a dois comprimidos para SA1, e massa correspondente a 5 comprimidos para SA2) foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi perfeito com água ultrapura (concentração final de Cr = 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Após agitação, o conteúdo do balão foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos e o resíduo insolúvel rejeitado.

Tabela 10 – Composição mineral dos dois suplementos alimentares, de acordo com os respetivos rótulos.

Produto	Ingrediente	Quantidade por comprimido	% VRN
SA1	Selénio	250 µg	364
	Magnésio	300 mg	80
	Zinco	15 mg	150
	Crómio	100 µg	250
SA2	Cálcio	340 mg	43%
	Fósforo	105 mg	15%
	Magnésio	107 mg	29%
	Ferro	4,2 mg	30%
	Iodo	100 µg	67%
	Cobre	500 µg	50%
	Manganésio	2,4 mg	120%
	Crómio	40 µg	100%
	Molibdénio	50 µg	100%
	Selénio	30 µg	55%
	Zinco	5 mg	50%

2.5.2. Solubilização ácida

A solubilização das amostras foi efetuada de acordo com o procedimento indicado na Farmacopeia Americana para suplementos alimentares de picolinato de crómio comercializados sob a forma de comprimidos [110]. Resumidamente, vinte comprimidos foram pesados e reduzidos a um pó fino num almofariz. A massa de comprimidos correspondente a 200 µg de Cr (massa correspondente a dois comprimidos para SA1, e massa correspondente a 5 comprimidos para SA2) foi transferida para um cadinho e aquecida em mufla a 550 °C durante cerca de 8 horas. Após arrefecimento, o conteúdo dos cadinhos foi suavemente fervido numa placa de aquecimento com 60 mL de HCl 37%, e a solução resultante transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi perfeito com água ultrapura (concentração final de Cr 2000 µg/L).

Paralelamente, foram realizados ensaios controlo com uma massa de amido de batata (Sigma-Aldrich) correspondente à massa de cada produto e adição de solução de Cr(III) ou Cr(VI) (*spike*), de modo a obter uma concentração final de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ (figura 11). Esta adição foi efetuada a partir de soluções stock de Cr(III) e Cr(VI) $1,0 \text{ g L}^{-1}$.



Figura 11 – Esquema representativo das solubilizações ácidas realizadas.

2.6. Cálculo da percentagem de retenção

O cálculo da percentagem de retenção foi sempre efetuado comparando a concentração da solução de trabalho sem ter estado em contacto com a resina com a concentração da mesma solução após o contacto com a resina.

Primeiramente, efetuou-se o cálculo da percentagem de Cr que não foi retido de acordo com as seguintes equações:

Ensaio em *batch*

$$\% \text{ de Cr não retido} = \frac{\text{Concentração de Cr no sobrenadante}}{\text{Concentração de Cr da solução de trabalho}} \times 100$$

Ensaio em coluna

$$\% \text{ de Cr não retido} = \frac{\text{Concentração de Cr na solução OUT}}{\text{Concentração de Cr na solução IN}} \times 100$$

Para as soluções Cr(III)+Cr(VI), as percentagens de retenção foram calculadas de forma diferente. Sendo que através de ICP-MS conseguimos quantificar apenas a concentração de Cr total, o denominador das equações correspondia à contribuição de Cr(VI) para a concentração total, tendo em conta a concentração da solução de Cr(VI) e da solução de Cr(III) das quais se partiu para a preparação destas:

Ensaios em *batch*

$$\% \text{ de Cr não retido} = \frac{\text{Concentração de Cr no sobrenadante}}{\text{Concentração de Cr(VI) na solução de trabalho}} \times 100$$

Ensaios em coluna

$$\% \text{ de Cr não retido} = \frac{\text{Concentração de Cr na solução OUT}}{\text{Concentração de Cr(VI) na solução IN}} \times 100$$

De seguida, a percentagem de retenção foi calculada a partir dos resultados das equações anteriores, do seguinte modo:

$$\% \text{ retenção} = 100 - \% \text{ de Cr não retido}$$

A eventual contribuição do tampão e de outros componentes das soluções (branco) foi sempre subtraída aos valores das concentrações de Cr obtidas. Para os ensaios com soluções de Cr(III), Cr(VI) ou Cr(III)+Cr(VI), às concentrações obtidas nos sobrenadantes (ensaios em *batch*) e nas soluções OUT (ensaios em coluna) foram subtraídos os valores correspondentes ao branco do ensaio:

- Ensaios em *batch*: 9 ml de tampão em contacto com a resina;
- Ensaios em coluna: último mL de tampão utilizado na etapa de condicionamento.

No estudo do efeito da coexistência dos restantes minerais autorizados, o branco correspondia ao ensaio realizado com uma solução, em meio tampão, contendo apenas o mineral em estudo, na ausência de Cr(III). Para a solução “MIX”, o branco correspondia ao ensaio realizado com uma solução, em meio tampão, contendo todos os minerais autorizados exceto o Cr(III).

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do pH

No caso de um suplemento alimentar que contenha, por unidade de dosagem (comprimido, cápsula, entre outros), 100% da DDR de Cr (40 µg), a sua dissolução em 100 mL de água ou tampão, originaria uma solução com concentração de 400 µg L⁻¹. Assim, esta foi a concentração escolhida para iniciar os ensaios.

Para estudar a influência do pH na retenção do Cr(III) e perceber qual o pH ótimo para obter o máximo de retenção, foram realizados ensaios em *batch* com uma solução de trabalho com concentração de 400 µg L⁻¹ de Cr(III), no intervalo de pH 2-10. O pH foi ajustado com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M, e os tubos contendo a solução (9 mL) e a resina (0,5 g) foram mantidos sob agitação durante 60 minutos. O gráfico da figura 12 apresenta os valores médios das percentagens de retenção obtidas em função do pH.

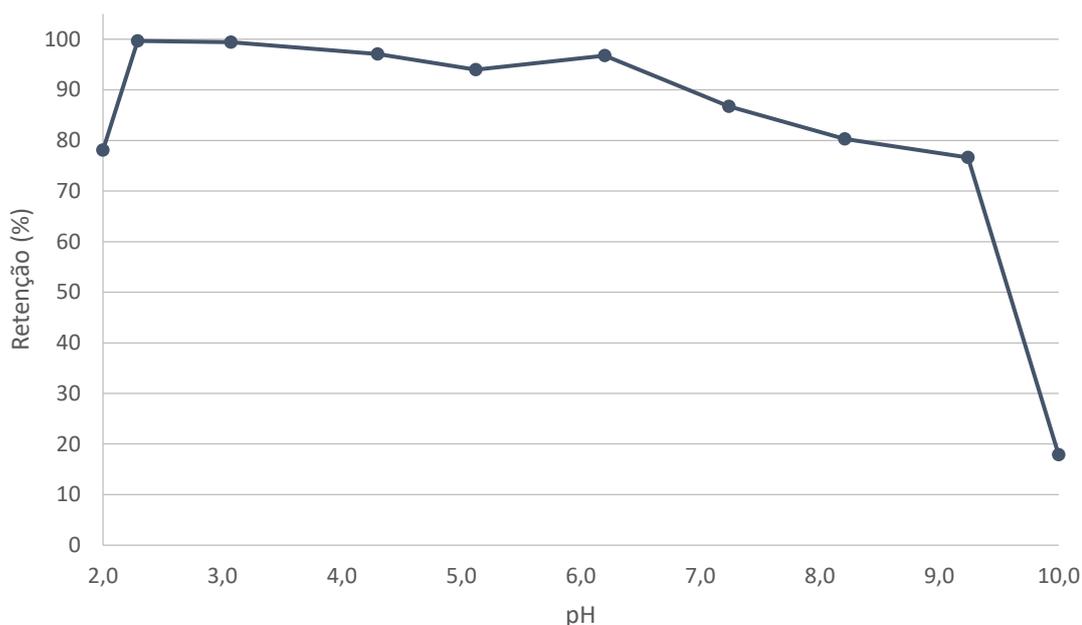


Figura 12 – Efeito do pH na retenção de Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em *batch*, soluções de Cr(III) 400 µg L⁻¹, pH ajustado com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M. Soluções mantidas em contacto com a resina e sob agitação durante 60 minutos (n=2).

O pH é o principal fator que influencia a retenção dos iões por parte das resinas comumente utilizadas em processos de extração em fase sólida. No caso da resina Metalfix-Chelamine, a sua capacidade para complexar catiões é dependente da maior ou menor protonação dos átomos N do grupo funcional tetraetilenopentamina.

Quando o pH aumentou de 2,0 para 2,2, verificou-se um aumento abrupto na percentagem de retenção do Cr(III). No intervalo de pH 2,2-6,0 observaram-se

percentagens de retenção muito próximas de 100%, e a partir de pH 6,0 essa percentagem de retenção foi diminuindo progressivamente. Assim, o intervalo de pH 2,2-6,0 foi considerado como o intervalo ótimo para a retenção de Cr(III), dentro do qual se realizaram os ensaios seguintes.

Em solução aquosa, para valores de pH entre 2,2 e 4,0, o Cr(III) existe maioritariamente sob a forma do complexo $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Para pH entre 4,0 e 5,0, este complexo sofre hidrólise originando os produtos $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$ e $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$. As espécies carregadas positivamente, poderão ser retidas na resina através da ligação formada entre o Cr (átomo central do complexo) e os eletrões desemparelhados dos átomos de N da resina. No entanto, e tal como irá ser referido nos próximos tópicos, é importante ter em consideração que na presença de outras espécies, por exemplo, ligandos capazes de quelatar o Cr(III), outras espécies de Cr(III) podem também formar-se.

3.2. Efeito da composição do tampão

A utilização de uma solução tampão permite-nos simplificar o processo de ajuste do pH e garantir que este permanece estável. Assim, foi testado o efeito de diferentes sistemas tampão dentro do intervalo de pH ótimo para a retenção de Cr(III). Procurou-se também verificar se era possível obter a total discriminação entre Cr(III) e Cr(VI). Para o efeito, realizaram-se ensaios em *batch* com soluções de trabalho de Cr(III) $400 \mu\text{g L}^{-1}$ e de Cr(VI) $400 \mu\text{g L}^{-1}$, tamponadas com três sistemas tampão distintos. As soluções foram mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos e os respetivos valores médios das percentagens de retenção foram representados em gráficos em função do pH.

3.2.1 Tampão HCl/KCl

O tampão HCl/KCl possui capacidade tampão ótima no intervalo de pH 1,0-2,2. No entanto, através da adição de algumas gotas de NaOH 0,1 M é possível deslocar o pH para valores ligeiramente mais elevados. Tal foi efetuado para o intervalo de pH 2,3-2,5. Os valores médios das percentagens de retenção obtidas encontram-se representados no gráfico da figura 13.

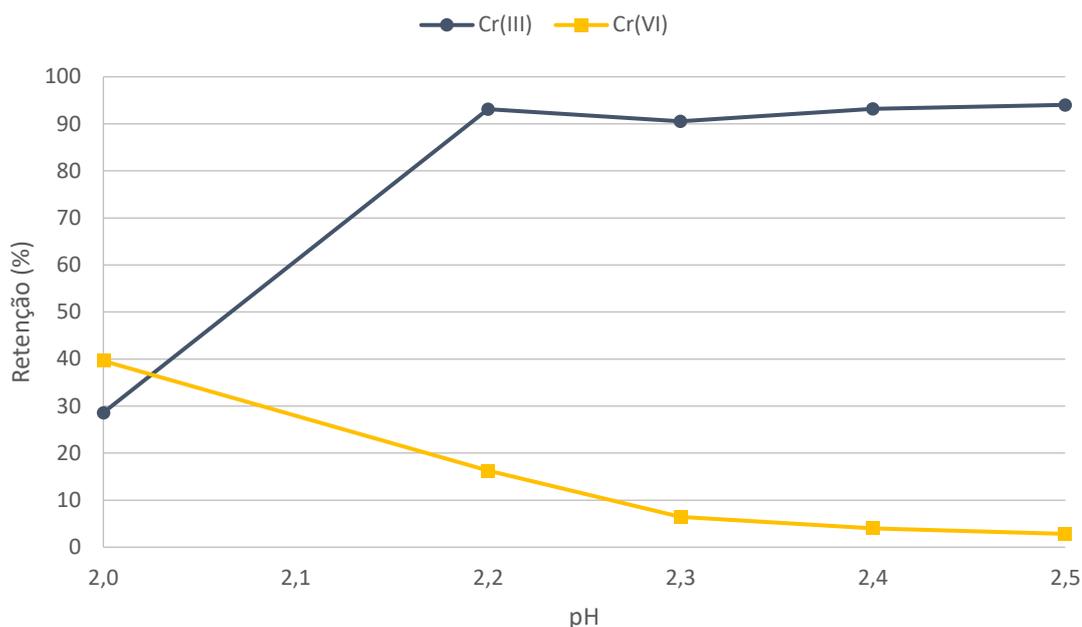


Figura 13 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em *batch*, com soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com HCl/KCl e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos ($n=2$).

Apesar de, a partir de pH 2,3, já estarmos a trabalhar fora da gama de pH ideal para o funcionamento deste sistema tampão, a sua utilização foi testada no sentido de evitar a introdução de outras soluções tampão com compostos orgânicos. Tal como já referido, alguns compostos orgânicos podem formar complexos com o Cr(III) e ser também responsáveis pela redução de Cr(VI) a Cr(III).

Tal como observado nos ensaios anteriores (ajuste de pH com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M), quando o pH aumentou de 2,0 para 2,2 verificou-se um aumento abrupto na percentagem de retenção do Cr(III), e a partir de pH 2,2 atingiu-se o máximo de retenção, com valores entre 90 e 95%. Neste intervalo de pH, quando em solução aquosa pura, o Cr(III) existe maioritariamente sob a forma do complexo $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, espécie carregada positivamente, passível de ser retida pela resina.

No caso das soluções de Cr(VI), verificou-se um comportamento exatamente oposto. Ao aumentar o pH de 2,0 para 2,2, a percentagem de retenção diminuiu abruptamente, e a partir de pH 2,3 permaneceu praticamente constante, num valor bastante próximo de 0%. Neste intervalo de pH, e atendendo à concentração de Cr(VI) na solução ($< 0,01 \text{ mol L}^{-1}$), a espécie maioritariamente presente é HCrO_4^- , uma espécie carregada negativamente, não suscetível de ser complexada pelo grupo funcional tetraetileno-pentamina.

De acordo com estes resultados, no intervalo de pH 2,3-2,5 era possível obter uma discriminação praticamente completa entre as duas espécies. No entanto, a utilização deste tampão apresentava alguns problemas:

- O intervalo de pH 2,3-2,5 encontra-se fora da gama de pH ideal para o funcionamento deste sistema tampão, ou seja, a sua capacidade para tamponar as soluções (isto é, o seu “poder tampão”) é menor, o que pode condicionar os resultados;
- A necessidade de adicionar NaOH 0,1 M para fazer subir ligeiramente o pH complica o procedimento, introduzindo mais uma etapa na manipulação das soluções;
- Em ICP-MS, frequentemente observam-se importantes interferências de natureza espectroscópica, provocadas por iões atômicos ou moleculares que possuem a mesma relação massa/carga (m/z) que o analito de interesse. Os iões poliatômicos podem ter origem nos gases da atmosfera, nos gases usados para produzir o plasma, na matriz das amostras e nos reagentes adicionados, sendo responsáveis por gerar interferências que o equipamento e/ou o software não são capazes de corrigir [21, 111]. No caso da determinação de Cr, todos os seus isótopos são afetados por uma grande variedade de interferências poliatômicas. Para as determinações analíticas recorre-se geralmente ao isótopo ^{52}Cr por ser o mais abundante. Para este isótopo, algumas das interferências poliatômicas resultam da presença de cloreto (Cl^-) na solução, anião presente neste sistema tampão, que pode levar à formação de iões também com a razão $m/z = 52$, como $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$ ou $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$ [111].

3.2.2 Tampão HCl/KHP

O tampão HCl/KHP foi testado para tamponar as soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou Cr(VI) no intervalo de pH 2,2-3,0. Os valores médios das percentagens de retenção obtidas encontram-se representados no gráfico da figura 14

Neste intervalo de pH, em solução aquosa pura, o Cr(III) continua a estar maioritariamente presente sob a forma de $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, e o Cr(VI) sob a forma de HCrO_4^- . No entanto, comparando estes resultados com os obtidos nos ensaios anteriores, verifica-se uma importante diminuição na retenção de Cr(III) e um aumento significativo na retenção de Cr(VI).

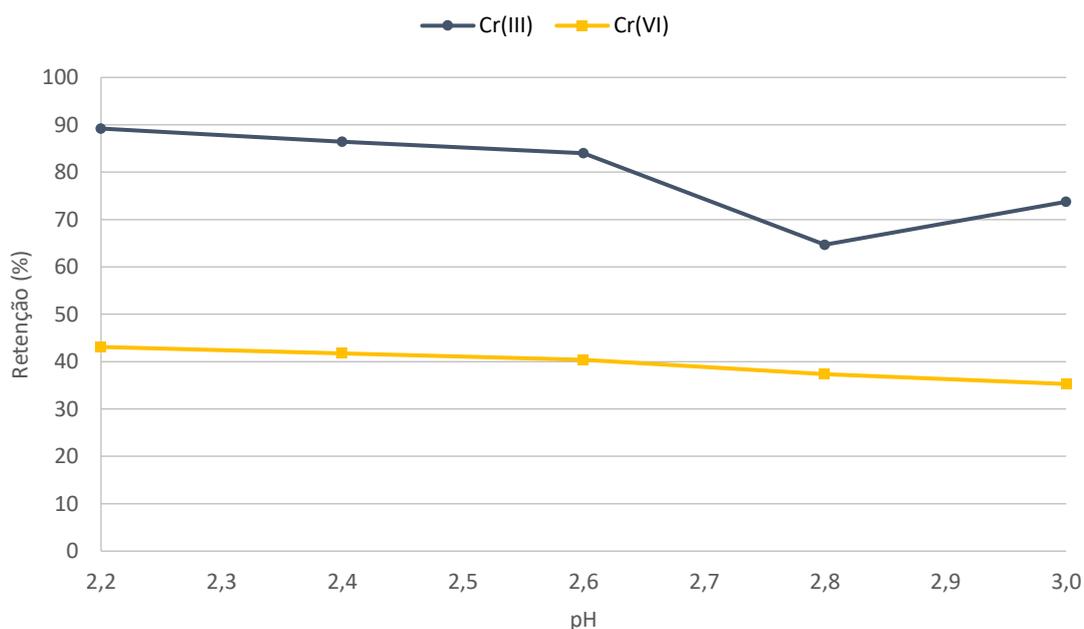


Figura 14 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em *batch*, com soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com HCl/KHP e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos ($n=2$).

O KHP (hidrogenoftalato de potássio) utilizado para a preparação deste sistema tampão é um sal do ácido ftálico. A formação de complexos entre o ácido ftálico e o Cr(III) encontra-se descrita na literatura para o intervalo de pH 1-4 [112]. O ácido ftálico formará um anel quelante de sete lados quando coordenado com o íon metálico, atuando como um ligando bidentado (figura 15) [112].

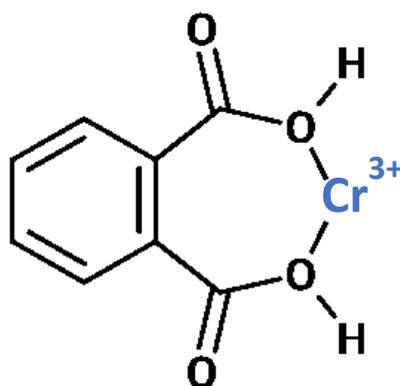


Figura 15 – Complexo Cr(III)-ácido ftálico (adaptado de [112]).

No intervalo de pH 1-2, este complexo parece existir na proporção 1:1 (1 íon Cr(III) para 3 ácidos ftálicos), enquanto no intervalo de pH 2,8-3, existe na proporção 1:3 (1 íon Cr(III) para 3 ácidos ftálicos). A formação destes complexos (quelatos) foi inclusivamente utilizada para permitir a separação cromatográfica de Cr(III) e Cr(VI) e a pré-concentração de Cr(III) em colunas C_{18} [113]. Para uma solução de Cr(III), com concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, níveis relativamente baixos de ftalato (na ordem dos 3 mmol L^{-1}) permitiram a adsorção de 100% do Cr(III) presente. A formação destes complexos poderá explicar a diminuição verificada na retenção de Cr(III), sendo que este deixa de estar presente numa forma disponível para a retenção pela resina.

O aumento da retenção do Cr(VI) poderá ser explicado pela ocorrência da sua redução a Cr(III), com posterior retenção pela resina. A redução do Cr(VI) a Cr(III) está descrita na presença de compostos orgânicos [15, 23]. O Cr(VI), em meio ácido, é um agente altamente oxidante, sendo capaz de oxidar a matéria orgânica e conseqüentemente ser reduzido, passando ao estado de oxidação Cr(III). O KHP é um composto orgânico facilmente oxidável tendo em consideração as ligações duplas presentes no seu anel benzénico. A ocorrência desta conversão pode justificar o grande aumento observado na percentagem de retenção para as soluções de Cr(VI).

3.2.3. Tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$

O tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ foi utilizado para tamponar soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou Cr(VI) no intervalo de pH 4,0-4,8. As percentagens de retenção obtidas encontram-se representadas no gráfico da figura 16. Ao contrário do que acontecia nos dois sistemas tampão testados anteriormente, para este intervalo de pH, em solução aquosa pura, o Cr(III) encontra-se sob a forma de $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$ e $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$.

Para as soluções de Cr(III) verificou-se uma percentagem de retenção muito próxima de 100% (entre 96-97%) e praticamente constante em todo o intervalo de pH testado. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente (simples adição de HCl ou NaOH), estando os valores de pH testados incluídos no intervalo de pH anteriormente considerado como ótimo para a retenção de Cr(III). Apesar de o Cr(III) se poder encontrar sob a forma de outras espécies químicas, tal não parece influenciar a sua retenção por parte da resina. O facto de não se ter obtido uma percentagem de retenção de exatamente 100% pode corresponder a uma contaminação dos sobrenadantes e não a uma parte do Cr(III) da solução original que não esteja a ser retido.

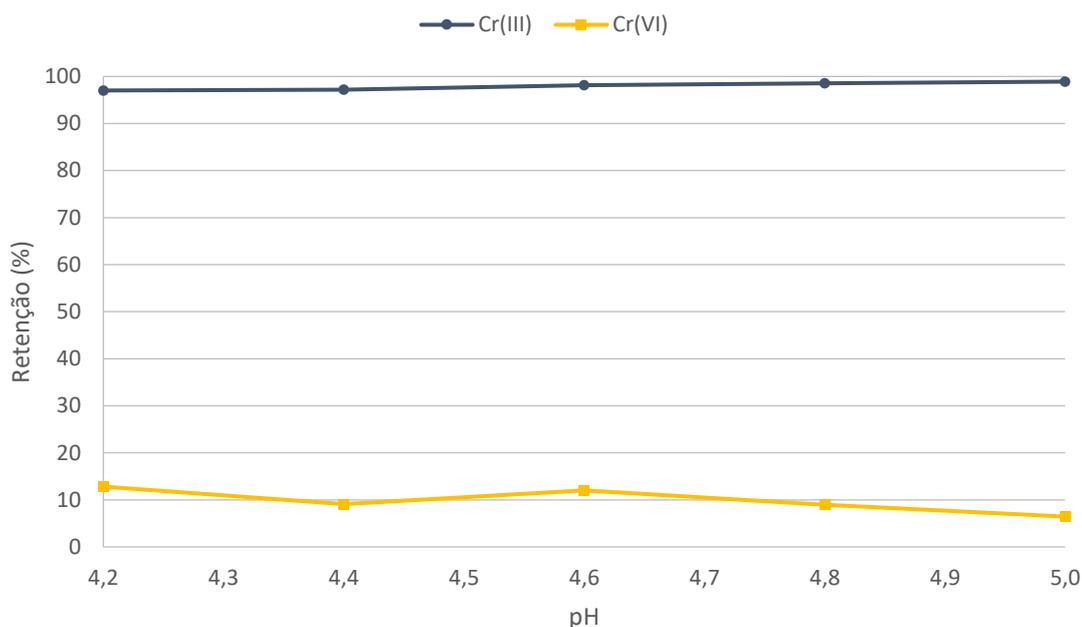


Figura 16 – Efeito do pH na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em *batch*, com soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) ou de Cr(VI), tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos ($n=2$).

A pequena retenção de Cr observada no caso das soluções de Cr(VI) pode mais uma vez ser justificada pela presença de compostos orgânicos, o ácido acético e o acetato. Assim sendo, e tendo em conta que este se encontra numa concentração muito superior à do Cr(VI), é possível que seja responsável por provocar alguma redução a Cr(III). No entanto, a retenção foi muito inferior à observada com o tampão HCl/KHP. Comparando a estrutura química do KHP, do CH_3COOH e do CH_3COONa (figura 17), verificamos que o primeiro é teoricamente mais suscetível à ocorrência de oxidação por parte do Cr(VI) devido à presença de ligações duplas. Se a conversão do Cr(VI) a Cr(III) ocorrer em maior extensão no meio tampão com KHP, fica justificado que a percentagem de retenção de Cr nas soluções de Cr(VI) também tenha sido superior neste tampão (HCl/KHP) relativamente ao tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$. No entanto, a confirmação da ocorrência desta conversão – redução do Cr(VI) a Cr(III) – exige a realização de ensaios adicionais.

Tendo em conta as desvantagens apresentadas pelos sistemas tampão KCl/HCl e HCl/KHP, e os bons resultados observados com o tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (apenas uma pequena conversão de Cr(VI) a Cr(III), mas numa extensão muito inferior à verificada no tampão HCl/KHP), este foi o escolhido para a realização dos ensaios seguintes. Optou-se pela realização dos ensaios a pH 4,6, sendo que este se encontra a meio do intervalo de pH testado.



Figura 17 – Estruturas químicas do KHP, do acetato de sódio e do ácido acético.

3.3. Efeito da concentração de Cr

Foram realizados ensaios em *batch* com soluções de Cr(III) e Cr(VI) a 400 ou 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aumentar a diluição das soluções, passando para uma concentração final de Cr de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, permite, aquando da análise de amostras reais (soluções resultantes da solubilização de produtos comerciais – suplementos alimentares disponíveis no mercado) minimizar os possíveis efeitos provocados pela matriz. Além disso, sendo o limite de detecção da técnica de ICP-MS tipicamente inferior a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, esta menor concentração continua a ser suficiente para efetuar a quantificação de Cr através desta técnica. As soluções foram tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ a pH 4,60 e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos. Os valores médios das percentagens de retenção obtidas encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Efeito da concentração na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaio em *batch*, soluções tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).

Solução	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Retenção (%)
Cr(III)	40	96,80 \pm 0,47
	400	98,37 \pm 0,04
Cr(VI)	40	7,46 \pm 0,28
	400	6,03 \pm 0,63

Tendo em conta que os ensaios apenas foram realizados em duplicado, não se justifica a aplicação de testes estatísticos para comparação de resultados. Se compararmos as percentagens de retenção obtidas para as soluções de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ com as percentagens para as soluções de $400 \mu\text{g L}^{-1}$, verificamos que os valores variam no máximo dois pontos percentuais. Assim, parece poder-se concluir que no intervalo $40\text{-}400 \mu\text{g L}^{-1}$ a taxa de retenção do Cr pela resina é independente da concentração.

3.4. Efeito da coexistência de Cr(III) e Cr(VI)

Nesta fase de desenvolvimento do trabalho, realizaram-se também ensaios em *batch* com soluções Cr(III)+Cr(VI). Tal como anteriormente descrito (ver materiais e métodos), estas são soluções mistas, contendo $40 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uma das espécies. Na tabela 12 encontram-se as médias das percentagens de retenção obtidas.

Tabela 12 – Efeito da coexistência de Cr(III) e Cr(VI) na retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em *batch*, soluções tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos ($n=2$).

Solução	Concentração de cada espécie ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Retenção (%)
Cr(III)+Cr(VI)	40	$10,07 \pm 0,13$
	200	$8,61 \pm 0,52$

Tal como verificado nos ensaios anteriores, a concentração das espécies parece não exercer uma influência significativa na percentagem de retenção, tendo-se verificado uma diferença de apenas dois pontos percentuais entre as soluções com concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ e as soluções com concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

A percentagem de retenção no caso das soluções de Cr(III)+Cr(VI) foi calculada relativamente à contribuição de Cr(VI) para a concentração total de Cr na solução em estudo. Comparando os resultados obtidos para a solução Cr(III)+Cr(VI) $40 \mu\text{g L}^{-1}$ com os obtidos para as soluções apenas com Cr(VI) $40 \mu\text{g L}^{-1}$ (ver tabela 11), verifica-se que há um aumento de cerca de três pontos percentuais. Além de pouco significativa, esta diferença pode dever-se também a uma pequena percentagem de Cr(III) que não tenha ficado retida. O que está de acordo com os resultados anteriormente obtidos, sendo que a percentagem de retenção para as soluções apenas com Cr(III) também nunca atingiu exatamente os 100%. Assim, pode concluir-se que a coexistência de Cr(III) e Cr(VI) parece não causar uma interferência relevante na retenção de Cr(III) por parte da resina.

3.5. Efeito da coexistência de outros minerais

Sendo o objetivo final deste trabalho a aplicação da metodologia desenvolvida na confirmação de que o Cr presente em suplementos alimentares se encontra sob a forma de Cr(III), um dos fatores que importava estudar era o eventual efeito da possível coexistência dos restantes minerais autorizados a ser incorporados na sua composição.

Tal como já descrito, os minerais foram adicionados individualmente a soluções de Cr(III) $40 \mu\text{g L}^{-1}$, cujo ensaio branco correspondeu à solução contendo apenas o mineral em estudo. Foi também preparada uma solução “MIX”, contendo todos os minerais autorizados nos suplementos alimentares, cujo ensaio branco correspondeu a uma solução com todos esses minerais, exceto o Cr(III). Em paralelo realizaram-se sempre ensaios controlo, com soluções de Cr(III) $40 \mu\text{g L}^{-1}$, de modo a assegurar que todas as condições experimentais (estado da resina, pH das soluções, entre outras) necessárias para a retenção do Cr(III) eram cumpridas. As soluções foram tamponadas a pH 4,6 com o tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos.

A percentagem de retenção obtida no ensaio controlo [solução contendo apenas Cr(III)] foi considerada como 100%. Os valores médios das percentagens de retenção para cada uma das soluções com cada mineral em estudo foram normalizados relativamente à percentagem para o ensaio controlo e encontram-se representados no gráfico da figura 18. O efeito de cada mineral foi considerado uma interferência sempre que a sua presença originava uma diferença de $\pm 5\%$ relativamente à solução contendo apenas Cr(III), encontrando-se esse limite representado pelas linhas a vermelho no gráfico.

O Na, tal como o B e o Si, não possui uma DDR definida, sendo frequentemente encontrado nos suplementos alimentares proveniente de compostos adicionados como fonte de outros minerais (iodeto de sódio, cloreto de sódio, molibdato de sódio, entre outros), em concentrações muito variáveis. Considerando que este elemento já se encontrava presente nas soluções em estudo, proveniente do tampão utilizado ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$), inclusivamente numa concentração elevada ($2,3 \text{ g L}^{-1}$), não se considerou necessário realizar ensaios individuais para avaliar a sua influência.

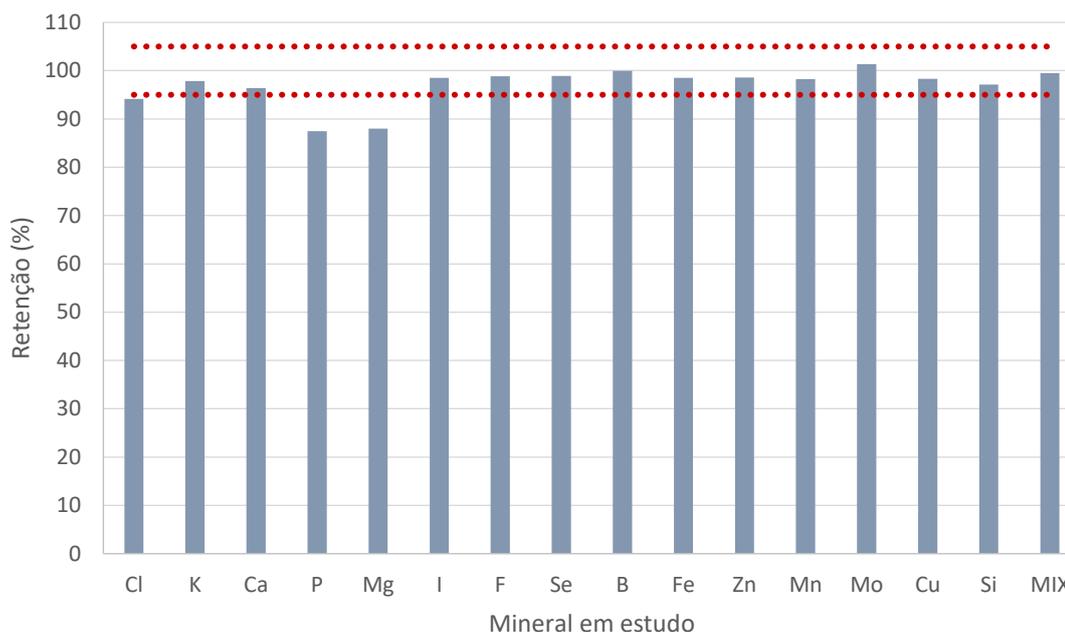


Figura 18 – Efeito da coexistência dos restantes minerais (autorizados a ser introduzidos nos suplementos alimentares) na percentagem de retenção do Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em *batch*, soluções tamponadas com CH₃COOH/CH₃COONa a pH 4,60, e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 60 minutos (n=2).

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que apenas os minerais Cl, P e Mg mostraram causar uma ligeira interferência na retenção do Cr(III). O Cl e o P encontram-se em solução sob a forma aniões, não podendo ser complexados pela resina. Já o Mg é um metal alcalinoterroso, para o qual a resina não apresenta afinidade.

O estudo da formação de pares iónicos mistos entre o Cr(III), o OH⁻ e os principais aniões presentes em águas do mar já foi efetuado por Edelfier e seus colaboradores [114] e por Turner e seus colaboradores [115]. Através destes estudos, verificou-se, por exemplo, que espécies como [CrCl(H₂O)₄OH⁺] podiam representar até 0,1% do total das espécies de Cr(III) presentes [114]. A formação deste tipo de espécies, mesmo que em pequena quantidade, poderá explicar a ligeira interferência provocada pela presença de Cl, afetando a retenção do Cr(III) por parte da resina. No caso do tampão HCl/KCl, este problema pode não ter surgido tendo em consideração que estávamos a trabalhar a um pH mais baixo, e consequentemente mais distante do pH da água do mar, onde a formação destas espécies pode não se verificar, ou ocorrer numa taxa ainda inferior. Para o Mg, encontra-se também descrita a formação de pares iónicos como [Cr_xMg_{(1-x)1.5}](OH)₃ [116].

Em meio aquoso, o P também existe sob a forma de anião podendo estar envolvido na formação de complexos com o Cr(III). Tal foi já descrito para alguns nucleótidos, cujos grupos fosfato se mostraram capazes de formar complexos com o Cr(III) [117], o que poderia explicar a diminuição da percentagem de retenção, não estando o Cr(III) livre para a ligação à resina.

As interferências referidas não se observaram na solução “MIX”. Durante a sua preparação (adição sucessiva das várias soluções dos minerais individuais) verificou-se a formação de um precipitado. É possível que nestas condições os minerais interferentes precipitem, deixando de estar presentes em solução e de provocar qualquer efeito na retenção do Cr(III). Esta é uma forte possibilidade para o fosfato, cujos compostos apresentam na sua maioria baixa solubilidade [118].

A formação deste precipitado implica que, ao passarmos para a aplicação a uma amostra real de um suplemento alimentar, possa ocorrer a precipitação de alguns dos minerais presentes. Tal, no entanto, acaba por representar uma vantagem, em nada comprometendo a discriminação entre Cr(III) e Cr(VI).

3.6. Efeito do tempo de contacto

No sentido de otimizar o tempo de contacto da solução com a resina, realizaram-se ensaios em *batch* com tempos de contacto (sob agitação) inferiores aos 60 minutos que tinham vindo a ser aplicados. Os valores médios das percentagens de retenção obtidas para as soluções de Cr(III) e Cr(VI) encontram-se representadas no gráfico da figura 19.

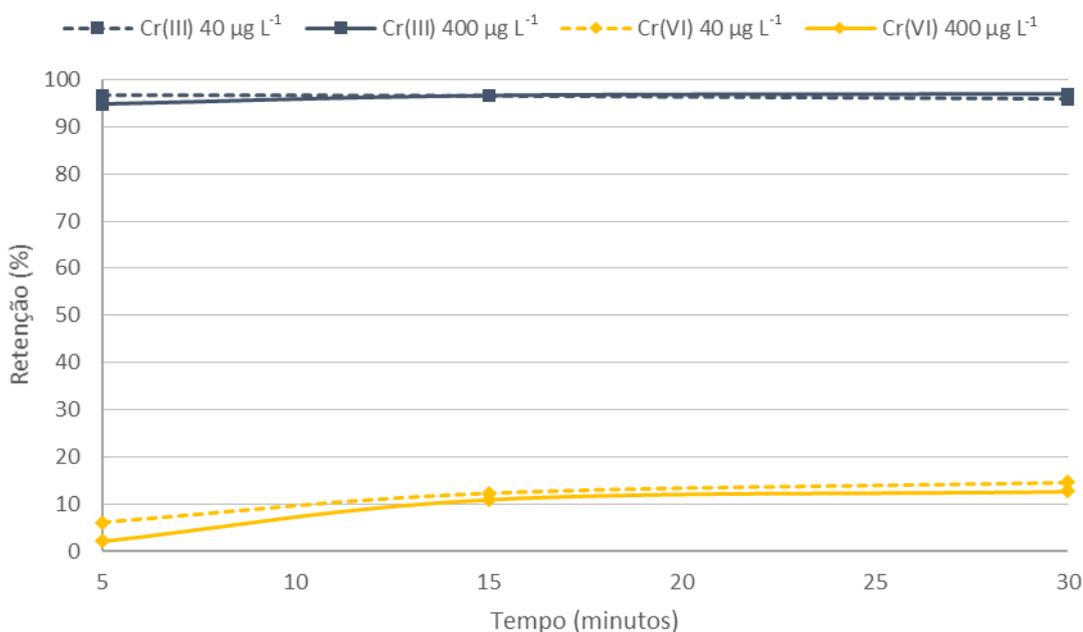


Figura 19 – Efeito do tempo de contacto na percentagem de retenção de Cr pela resina Metalfix-Chelamine. Ensaios em *batch*, soluções tamponadas com CH₃COOH/CH₃COONa a pH 4,6 e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 5, 15 ou 30 minutos (n=2).

Os ensaios foram realizados para os dois níveis de concentração (40 e 400 µg L⁻¹). Tal como nos ensaios anteriores, obtiveram-se percentagens de retenção praticamente iguais para as duas concentrações.

Para o Cr(III) a retenção mostrou-se constante e muito próxima de 100% independentemente do tempo de contacto da solução com a resina. No que diz respeito aos ensaios com as soluções de Cr(VI), a percentagem de retenção diminuiu à medida que diminuiu o tempo de contacto com a resina, caindo para valores inferiores a 5% para um tempo de contacto de 5 min. A resina é constituída por matéria orgânica, podendo também promover a redução do Cr(VI) a Cr(III). Assim, conclui-se que menores tempos de contacto favorecem a discriminação entre os dois estados de oxidação.

A influência do tempo de contacto foi também estudada para a solução “MIX” (todos os minerais autorizados nos suplementos alimentares), tendo-se verificado a mesma tendência, ou seja, a percentagem de retenção do Cr(III) mantém-se muito próxima de 100%, independentemente do tempo de contacto (figura 20).

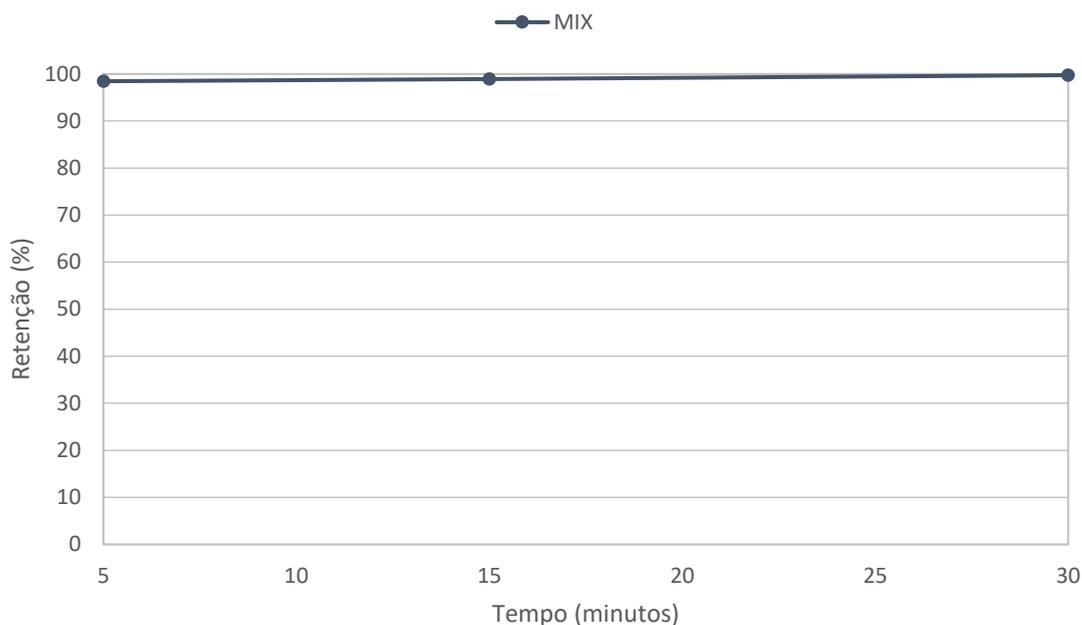


Figura 20 – Efeito do tempo de contacto na percentagem de retenção do Cr(III) pela resina Metalfix-Chelamine para a solução MIX (solução contendo todos os minerais autorizados nos suplementos alimentares). Ensaios em *batch*, soluções tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ a pH 4,6 e mantidas em contacto com a resina sob agitação durante 5, 15 ou 30 minutos ($n=2$).

3.7. Ensaios em coluna

De modo a obter um arranjo experimental mais facilmente automatizável, realizaram-se ensaios em coluna, recorrendo ao enchimento, com a mesma massa de resina utilizada nos ensaios em *batch* (0,5 g), de seringas com dois formatos distintos (figura 21). Nestes ensaios foram testadas soluções de Cr(III) e Cr(VI) com concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções foram tamponadas com $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ a pH 4,6 e feitas passar pela coluna a um caudal de aproximadamente 2 mL/min. As médias das percentagens de retenção obtidas para os dois formatos encontram-se na tabela 13.

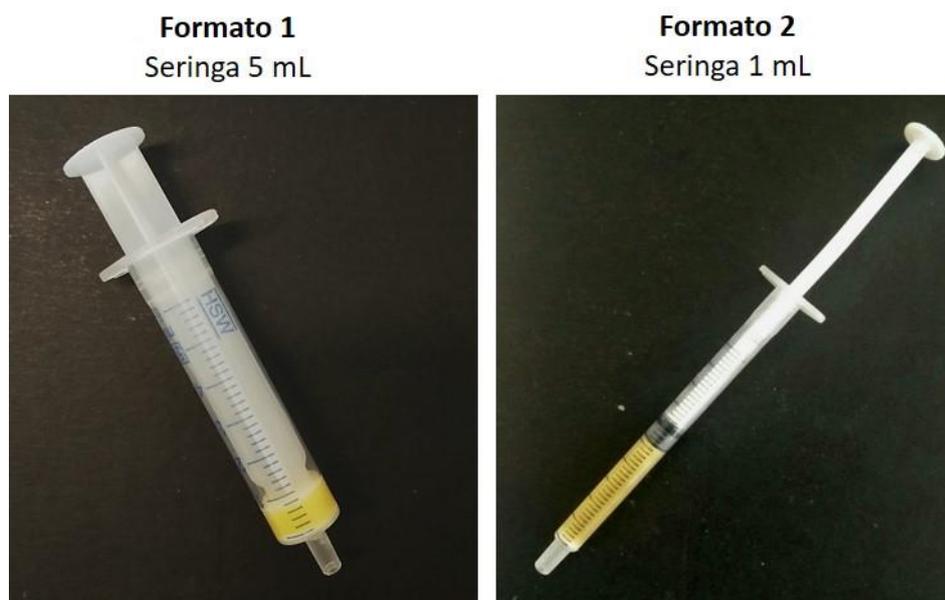


Figura 21 – Formatos de seringa utilizados para a construção das colunas.

Tabela 13 – Valores médios das percentagens de retenção obtidas nos ensaios em coluna com os dois formatos de seringa (n=2).

Formato	Solução	Retenção (%)
1	Cr(III)	66,16 ± 1,72
	Cr(VI)	4,37 ± 0,69
2	Cr(III)	97,44 ± 0,46
	Cr(VI)	0,41 ± 0,03

Neste tipo de procedimento, à medida que a solução vai passando ao longo da coluna vão-se estabelecendo sucessivos equilíbrios. No seu percurso, a solução vai contactando sucessivamente com resina que ainda não teve qualquer contacto com Cr(III), encontrando-se completamente livre para o complexar, aumentando assim a possibilidade de todo o Cr(III) presente na solução ser retido. Ou seja, era de esperar que a percentagem de retenção do Cr(III) pudesse ser consistentemente muito próxima de 100%.

No caso do formato 1, a percentagem de retenção mostrou-se bastante variável (desvio padrão elevado) e inferior aos valores obtidos nos ensaios em *batch*, enquanto para o formato 2 se aproximou dos valores obtidos nesses mesmos ensaios. Um fator importante neste tipo de procedimento é a altura do enchimento da coluna. Em colunas

mais altas, maior será o trajeto que a solução terá de percorrer, contactando com mais resina disponível para a complexação do Cr e aumentando a probabilidade de o mesmo ficar completamente retido. No formato 1 a altura da coluna era bastante inferior à do formato 2, o que pode justificar os diferentes resultados obtidos. Para o formato 2, além da retenção praticamente total do Cr(III) verificou-se uma retenção quase nula do Cr(VI). As soluções utilizadas nestes ensaios foram preparadas no dia da realização dos mesmos, de modo a minimizar qualquer efeito resultante do seu envelhecimento, nomeadamente a eventual conversão do Cr(VI) a Cr(III) por ação dos compostos orgânicos do tampão. Além disso, relativamente aos ensaios em *batch*, o tempo de contacto da solução com a resina também foi inferior, o que pode adicionalmente contribuir para minimizar a taxa de redução do Cr(VI).

Face a estes resultados, o procedimento em coluna com o formato 2 mostrou ser o mais adequado para a completa discriminação entre as duas espécies de Cr. Depois de alguns ajustes com vista a ultrapassar algumas dificuldades inicialmente encontradas, o procedimento consistia no seguinte (figura 22):

- 1. Etapa de lavagem** – aspirar (no sentido do encaixe da agulha para o êmbolo) 1 mL de HNO₃ 2% e rejeitar (no sentido oposto), por três vezes;
- 2. Etapa de condicionamento** – repetir o procedimento anterior com solução tampão CH₃COOH/CH₃COONa, por duas vezes. De seguida, retirar o êmbolo, encher a seringa com 1 mL de solução tampão e forçar a passagem pela resina. Recolher este último mL para análise;
- 3. Passagem da amostra através da coluna** – retirar o êmbolo, encher a seringa com 1 mL de solução amostra, recolocar o êmbolo e forçar a passagem da solução pela resina a um caudal baixo (aproximadamente 2 mL min⁻¹). Rejeitar o primeiro mL de solução que passou pela coluna e repetir o procedimento recolhendo a solução para análise (determinação de Cr).

Ao longo da realização dos ensaios, verificou-se que, por vezes, não era possível recolher por completo o último mL de tampão da etapa de condicionamento. Assim, o primeiro mL de amostra era rejeitado de modo a evitar possíveis efeitos de diluição.

As principais dificuldades encontradas relacionaram-se sobretudo com a pressão que era necessário exercer no êmbolo para forçar a passagem das soluções. No entanto, esse problema praticamente desaparecia se se efetuasse a lavagem e o condicionamento da coluna de acordo com o procedimento atrás descrito. De referir também que entre as etapas de lavagem (com ácido) e condicionamento (com solução tampão) se observava uma alteração significativa na altura da coluna (volume de enchimento), devido à

contração da resina a pH muito ácido e expansão a valores de pH mais elevados (figura 23).

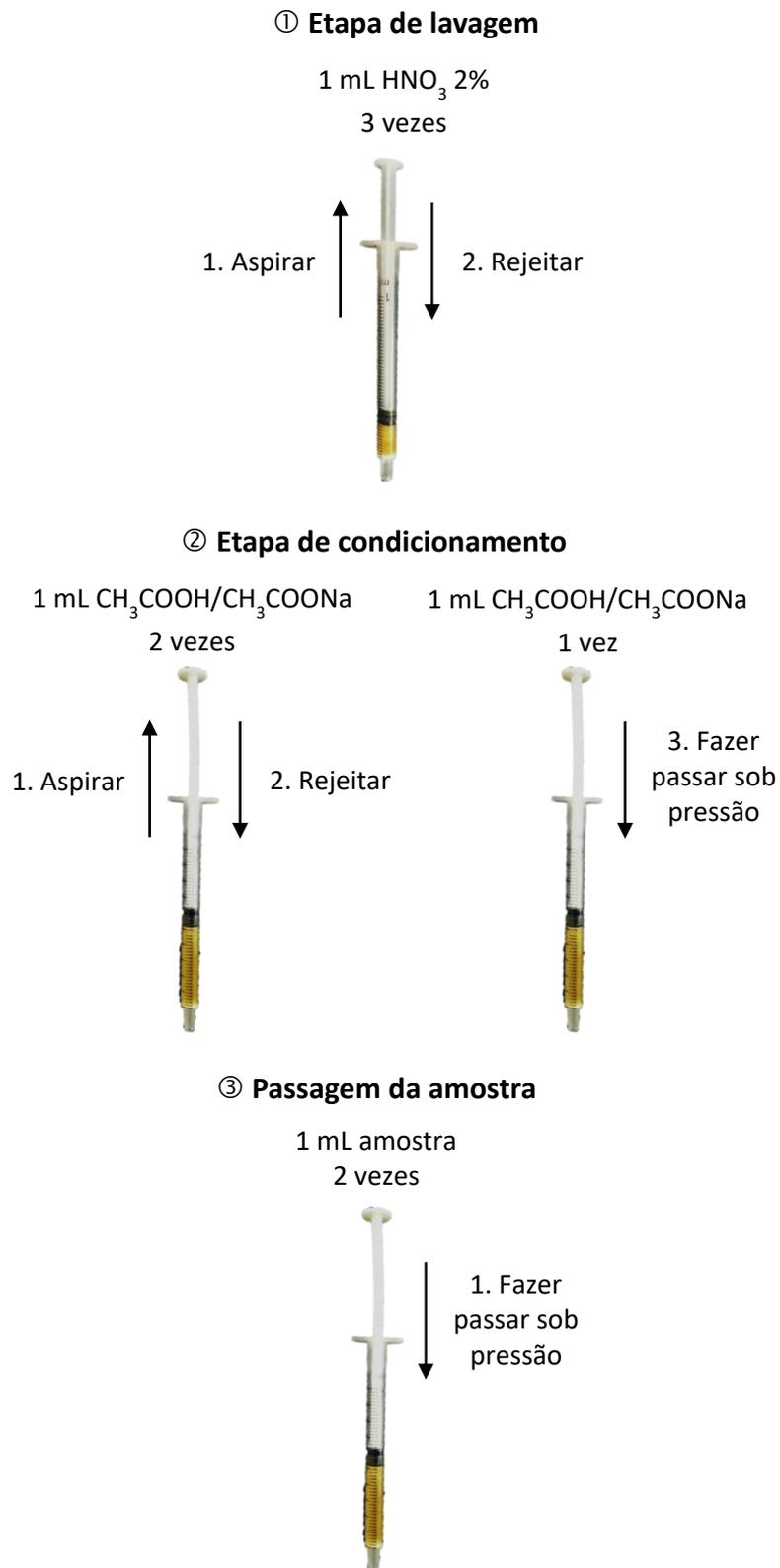


Figura 22 – Procedimento final para a realização dos ensaios em coluna.

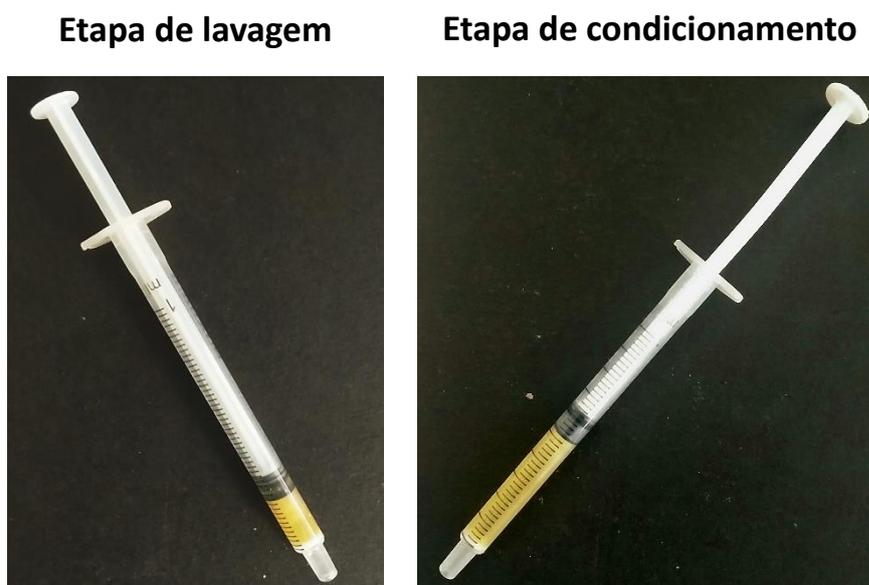


Figura 23 – Aspeto da coluna (formato 2) após lavagem com ácido (esquerda) e após condicionamento com tampão (direita).

Futuramente poderia optar-se pela construção de colunas utilizando materiais mais resistentes (por exemplo, metal), ou a automatização do processo em sistemas de fluxo, de modo a tornar o procedimento mais expedito.

3.8. Pré-tratamento de amostras reais

No caso de amostras reais de suplementos alimentares, torna-se necessário introduzir uma etapa de pré-tratamento que permita:

- Solubilizar as amostras sólidas, se não completamente, pelo menos o composto ou compostos de Cr nelas presentes;
- Garantir que o Cr(III) em solução se encontra numa forma que o torna suscetível de ser retido na resina.

Para o efeito, foram aplicados dois pré-tratamentos a duas amostras sólidas: dissolução em água e solubilização ácida, de acordo com o procedimento indicado na Farmacopeia Americana para a análise de suplementos alimentares de picolinato de crómio comercializados sob a forma de comprimidos [110].

3.8.1. Dissolução em água

A dissolução em água foi testada por representar o procedimento mais simples, não implicando o recurso a outros reagentes que possam provocar a ocorrência de interconversões entre Cr(III) e Cr(VI). Num almofariz, vinte comprimidos de cada um dos produtos foram reduzidos a um pó fino. Posteriormente, a massa correspondente a dois comprimidos para SA1, e a massa correspondente a cinco comprimidos para SA2, foram dissolvidas em 100 mL de água ultrapura. Por fim, as amostras foram diluídas com HNO₃ 2% para determinação da concentração total de Cr, cujos valores obtidos se encontram na tabela 14.

Tabela 14 – Concentração de Cr total obtida após dissolução em água de duas amostras de suplementos alimentares (n=2).

Amostra	Concentração de Cr total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SA1	2003 \pm 82
SA2	39,2 \pm 1,1

Para o produto SA1, a concentração obtida estava de acordo com a quantidade de Cr rotulada, tendo este pré-tratamento (simples dissolução em H₂O) mostrado ser suficiente para promover a passagem para a solução de todo o Cr presente na amostra. Para o produto SA2, obteve-se um valor de concentração de Cr muito inferior à quantidade rotulada. Assim, colocam-se duas hipóteses:

- O produto encontrava-se mal rotulado;
- A dissolução da amostra em água não foi suficiente para garantir a dissolução de todo o Cr presente.

Na tabela 15 indicam-se as formas em que o Cr(III) está autorizado a ser incluído nos suplementos alimentares e a respetiva solubilidade em água.

Tabela 15 – Compostos de Cr(III) autorizados a ser utilizados na produção de suplementos alimentares e respectivas solubilidades.

Composto	Solubilidade do composto em água	Referência
	Insolúvel em água fria	
Cloreto de crómio (III)	Levemente solúvel em água quente ($1,0 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7 \mu\text{g L}^{-1}$)	[119, 120]
	Levemente solúvel	
Lactato de crómio (III) trihidratado	($1,0 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7 \mu\text{g L}^{-1}$)	[120, 121]
	Solúvel	
Nitrato de crómio	($3,3 \times 10^7 - 1,0 \times 10^8 \mu\text{g L}^{-1}$)	[119, 120]
	Praticamente insolúvel	
Sulfato de crómio (III)	($100 \mu\text{g L}^{-1}$)	[122]
Picolinato de crómio	$2,5 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH = 7)	[123]
Leveduras enriquecidas em crómio	Dados não disponíveis	-

De acordo com os valores apresentados, a dissolução das amostras sólidas, após a sua redução a pó, em 100 mL de água ultrapura, é teoricamente suficiente para garantir a solubilização dos seguintes compostos de Cr(III): lactato de crómio (III) trihidratado, nitrato de crómio e picolinato de crómio. Tendo em consideração as quantidades em que o Cr(III) é normalmente adicionado aos suplementos alimentares (entre 50 e 200 μg), a solubilidade destes compostos é suficiente para garantir a sua dissolução em água.

No caso do cloreto de crómio (III), a dissolução em água terá de ser efetuada sob aquecimento. Para o sulfato de crómio (III), a dissolução em água também poderá ser suficiente desde que o suplemento contenha menos de 100 μg deste composto. Finalmente, para as leveduras enriquecidas em crómio, não existe este tipo de informação relativamente à solubilidade do Cr nelas presente. No entanto, tratando-se de células, será eventualmente necessária a realização de um procedimento que garanta a lise das mesmas e a separação do Cr(III) de componentes celulares aos quais esteja ligado.

Sendo que para a amostra do produto SA1 se verificou a dissolução total do Cr presente, a solução foi posteriormente submetida a ensaios em *batch*. Para o efeito, foi diluída em solução tampão de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (pH 4,6) de modo a obter uma

concentração final de Cr de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. O tempo de contacto com a resina foi de 5 minutos, sob agitação, como anteriormente descrito. Obteve-se uma percentagem de retenção muito baixa, de $4,13\% \pm 0,28\%$ ($n=2$), colocando-se então duas possibilidades:

- O Cr presente no produto foi incorporado sob a forma de Cr(VI), ou seja, sob a forma de compostos não autorizados;
- O Cr(III) foi incorporado sob a forma de picolinato de crómio, o que explicava que a dissolução completa do composto tivesse ocorrido, mas não a complexação do Cr(III) por parte da resina.

Enquanto o lactato de crómio (III) e o nitrato de crómio são sais cuja dissociação em água deixa o ião Cr^{3+} livre em solução, disponível para interagir com a resina, o mesmo não se verifica no caso do picolinato de crómio. Neste composto, o Cr(III) encontra-se complexado por três moléculas de picolinato (figura 23). Isto significa que, apesar de o composto ser solúvel em água, o Cr(III) permanece complexado, o que parece não permitir a sua interação com a resina. A aplicação de condições mais drásticas para a dissolução do composto poderá ser necessária para garantir a sua dissociação.

Assim, conclui-se que a dissolução em água não é aplicável a todos os tipos de suplementos, mas apenas naqueles em que o Cr(III) tenha sido adicionado sob a forma de um sal solúvel.

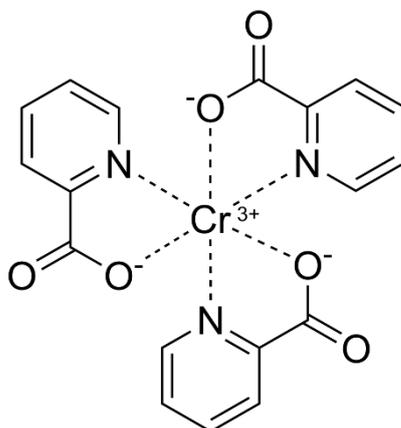


Figura 24 – Estrutura química do picolinato de crómio.

3.8.2. Solubilização ácida

Após a solubilização ácida das amostras dos produtos SA1 e SA2, as soluções foram diluídas com HNO₃ 2% para a determinação da concentração de Cr total, cujos resultados obtidos se encontram na tabela 16.

Tabela 16 – Concentração de Cr total obtida após a solubilização ácida de duas amostras de suplementos alimentares (n=2).

Amostra	Concentração de Cr total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SA1	1956 \pm 80
SA2	1927 \pm 81

Em ambos os casos, verificou-se a dissolução completa do Cr presente comprovando-se que, no produto SA2, o Cr terá sido adicionado numa forma pouco solúvel em água, possivelmente cloreto de crômio (III), sulfato de crômio (III) ou leveduras enriquecidas em crômio.

De seguida, as soluções resultantes das digestões de amido com *spike* de Cr(III) ou Cr(VI) foram diluídas com a solução tampão CH₃COOH/CH₃COONa (pH 4,6) para uma concentração final de Cr de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram realizados ensaios em *batch* para um tempo de agitação correspondente a 5 minutos, cujas médias das percentagens de retenção se encontram na tabela 17.

Tabela 17 – Valores médios das percentagens de retenção obtidas nos ensaios com amido e *spike* de Cr(III) ou Cr(VI) (n=4).

	Retenção (%)
Amido + <i>Spike</i> Cr(III)	96,9 \pm 1,5
Amido + <i>Spike</i> Cr(VI)	85,4 \pm 0,7

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de testar a ocorrência de possíveis interconversões durante o processo de solubilização ácida. Para os ensaios com *spike* de Cr(III), a percentagem de retenção encontra-se dentro da obtida para os ensaios anteriores com as soluções de trabalho de Cr(III), comprovando-se que este pré-tratamento não provoca oxidação do Cr(III) a Cr(VI).

Por outro lado, para os ensaios com *spike* de Cr(VI), o valor obtido é semelhante ao obtido para o *spike* de Cr(III), o que indica que o Cr(VI) terá sido reduzido a Cr(III). A redução do Cr(VI) por ação do HCl concentrado é um processo conhecido desde a descoberta do Cr por *Vauquelin*, em 1797 [124]. Quantidades vestigiais de Cr (1×10^{-4} – 1×10^{-7} M) são reduzidas na presença de uma grande variedade de ácidos concentrados [124], incluindo o HCl 37% utilizado durante o processo de solubilização aqui aplicado. Assim sendo, conclui-se que este pré-tratamento não é adequado quando se pretende efetuar a especiação de Cr, devido à redução do Cr(VI) a Cr(III) que provoca.

Futuramente, de forma a encontrar um pré-tratamento único que possa ser aplicado a todos os suplementos alimentares, será necessário testar condições menos drásticas. Por exemplo, dissolução em água com ligeiro aquecimento ou adição de pequenas quantidades de um ácido pouco concentrado de modo a minimizar a ocorrência da redução do Cr(VI).

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível desenvolver e avaliar um sistema (resina + meio tampão) capaz de efetuar a discriminação entre Cr(III) e Cr(VI) de um modo expedito e fiável.

A resina Metalfix-Chelamine, uma resina quelante com ligandos do tipo pentamina, mostrou ser adequada para este fim, retendo o Cr(III) e não retendo o Cr(VI), nas condições experimentais definidas. Este foi o primeiro trabalho em que esta resina foi utilizada na especiação de Cr.

Inicialmente, optou-se por realizar o estudo das condições ideais para efetuar a discriminação entre as duas espécies através de ensaios em *batch* (resina em contacto com a solução em tubo de ensaio, sob agitação). O intervalo de pH 2,2-6,0 foi considerado como o intervalo ótimo para a retenção do Cr(III).

Dentro deste intervalo, testaram-se três sistemas tampão:

- **HCl/KCl:** Para a obtenção da total discriminação entre Cr(III) e Cr(VI), este tampão tinha de ser utilizado ligeiramente fora da gama de pH ideal para o seu funcionamento. Além disso, a presença de Cl⁻ no meio contribuía para gerar interferências espectroscópicas na deteção por ICP-MS;
- **HCl/KHP:** O hidrogenoftalato (HP) presente na solução mostrou ser capaz de complexar o ião Cr³⁺, impedindo-o de se ligar à resina. Além disso, tratando-se de um composto orgânico, podia potencialmente contribuir para a redução do Cr(VI) a Cr(III), o que poderá justificar a retenção de Cr verificada em soluções contendo apenas Cr(VI);
- **CH₃COOH/CH₃COONa:** Este tampão forneceu bons resultados, com uma pequena retenção de Cr nas soluções contendo apenas Cr(VI) (geralmente inferior a 5%), que não compromete o objetivo final de verificar se houve utilização deliberada de Cr(VI) na formulação dos produtos, tendo sido o sistema tampão selecionado.

Nos ensaios em *batch*, o contacto com a resina mostrou contribuir para o aumento da redução do Cr(VI) a Cr(III). A diminuição do tempo de contacto entre a resina e as soluções para cerca de cinco minutos permitiu diminuir a taxa de redução do Cr(VI) e, conseqüentemente, obter uma discriminação praticamente completa entre as duas espécies.

A discriminação foi ainda melhor nos ensaios em coluna, o que pode estar associado ao facto de nestes ensaios se ter diminuído ainda mais o tempo de contacto com

a resina (gotejamento a uma taxa de cerca de 2 mL/min). Para estes ensaios obteve-se uma retenção de Cr de $97,44 \pm 0,46\%$ nas soluções de Cr(III) e de $0,41 \pm 0,03\%$ nas soluções de Cr(VI)

Sendo que este sistema foi desenvolvido com o objetivo final de ser aplicado a suplementos alimentares, foi estudado o possível efeito provocado pela coexistência com o Cr(III) dos restantes minerais autorizados a ser introduzidos nestes produtos. Verificou-se que apenas o cloreto, o fosfato e o magnésio pareciam provocar uma pequena diminuição na percentagem de retenção do Cr(III).

Comprovou-se também que esta metodologia pode ser aplicável a todos os suplementos alimentares em que o Cr tenha sido adicionado sob uma das formas autorizadas, exceto no caso do picolinato de crómio, composto que mostrou não ser retido na resina. Para este caso específico, serão necessários mais estudos para encontrar um procedimento de pré-tratamento que permita a colocação do Cr^{3+} livre em solução, sem provocar a sua conversão a Cr(VI).

ANEXOS

ANEXO 1 – Diretivas e Regulamentos Europeus aplicáveis aos suplementos alimentares

Diretiva ou Regulamento	Aspetos principais
Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de junho de 2002	Relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares
Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006	Relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos
Regulamento (CE) n.º 1925/ 2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006	Relativo à adição de vitaminas, minerais e determinadas outras substâncias aos alimentos
Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008	Relativo aos aditivos alimentares
Regulamento (CE) n.º 1334/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008	Relativo aos aromas e a determinados ingredientes alimentares com propriedades aromatizantes utilizados nos e sobre os géneros alimentícios
Regulamento (UE) n.º 420/2011 da Comissão de 29 de abril de 2011	Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011	Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios
Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro de 2015	Relativo a novos alimentos

ANEXO 2 – Alterações à Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de junho de 2002

Diretiva ou Regulamento	Subdivisão da diretiva alterada
Directiva 2006/37/CE da Comissão de 30 de março de 2006	Anexo 2
	Artigo 4
Regulamento (CE) n.º 1137/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de outubro de 2008	Artigo 5
	Artigo 12
	Artigo 13
Regulamento (CE) n.º 1170/2009 da Comissão de 30 de novembro de 2009	Anexo I
	Anexo II
Regulamento (UE) n.º 1161/2011 da Comissão de 14 de Novembro de 2011	Anexo II
Regulamento (UE) n.º 119/2014 da Comissão de 7 de fevereiro de 2014	Anexo II
Regulamento (UE) 2015/414 da Comissão de 12 de março de 2015	Anexo II
Regulamento (UE) 2017/1203 da Comissão de 5 de julho de 2017	Anexo II

Anexo 3 - Vitaminas e minerais que podem ser utilizados no fabrico de suplementos alimentares

1. Vitaminas

Vitamina A (μg)

Vitamina D (μg)

Vitamina E (mg)

Vitamina K (μg)

Vitamina B1 (mg)

Vitamina B2 (mg)

Niacina (mg)

Ácido pantoténico (mg)

Vitamina B6 (mg)

Ácido fólico (μg)¹

Vitamina B12 (μg)

Biotina (μg)

Vitamina C (mg)

2. Minerais

Cálcio (mg)

Magnésio (mg)

Ferro (mg)

Cobre (μg)

Iodo (μg)

Zinco (mg)

¹ Ácido fólico é o termo constante do anexo I da Diretiva 2008/100/CE da Comissão, de 28 de outubro de 2008, que altera a Diretiva 90/496/CEE do Conselho relativa à rotulagem nutricional dos géneros alimentícios, no que diz respeito às doses diárias recomendadas, aos fatores de conversão de energia e às definições, e é usado para efeitos de rotulagem nutricional, abrangendo todas as formas de folatos.

Manganês (mg)

Sódio (mg)

Potássio (mg)

Selênio (μg)

Crômio (μg)

Molibdênio (μg)

Fluoreto (mg)

Cloreto (mg)

Fósforo (mg)

Boro (mg)

Silício (mg)

ANEXO 4 – Preparados vitamínicos e substâncias minerais que podem ser utilizados no fabrico de suplementos alimentares

A. Vitaminas

1. VITAMINA A

- a) retinol
- b) acetato de retinilo
- c) palmitato de retinilo
- d) beta-caroteno

2. VITAMINA D

- a) colecalciferol
- b) ergocalciferol

3. VITAMINA E

- a) D-alfa-tocoferol
- b) DL-alfa-tocoferol
- c) acetato de D-alfa-tocoferilo
- d) acetato de DL-alfa-tocoferilo
- e) succinato ácido de D-alfa-tocoferilo
- f) tocoferóis mistos³
- g) tocotrienol tocoferol⁴

4. VITAMINA K

³ Alfa-tocoferol < 20 %, beta-tocoferol < 10 %, gama-tocoferol 50–70 % e delta-tocoferol 10–30 %.

⁴ Níveis típicos dos tocoferóis e tocotrienóis individuais:

- alfa-tocoferol: 115 mg/g (no mínimo, 101 mg/g)
- beta-tocoferol: 5 mg/g (no mínimo, < 1 mg/g)
- gama-tocoferol: 45 mg/g (no mínimo, 25 mg/g)
- delta-tocoferol: 12 mg/g (no mínimo, 3 mg/g)
- alfa-tocotrienol: 67 mg/g (no mínimo, 30 mg/g)
- beta-tocotrienol: < 1 mg/g (no mínimo, < 1 mg/g)
- gama-tocotrienol: 82 mg/g (no mínimo, 45 mg/g)
- delta-tocotrienol: 5 mg/g (no mínimo, < 1 mg/g).

a) filoquinona (fitomenadiona)

b) menaquinona⁵

5. VITAMINA B1

a) cloridrato de tiamina

b) mononitrato de tiamina

c) cloreto de tiamina monofosfato

d) cloreto de tiamina pirofosfato

6. VITAMINA B2

a) riboflavina

b) riboflavina-5'-fosfato de sódio

7. NIACINA

a) ácido nicotínico

b) nicotinamida

c) hexanicotinato de inositol (hexaniacinato de inositol)

8. ÁCIDO PANTOTÉNICO

a) D-pantotenato de cálcio

b) D-pantotenato de sódio

c) dexpantenol

d) pantetina

9. VITAMINA B6

a) cloridrato de piridoxina

b) piridoxina-5'-fosfato

c) piridoxal-5'-fosfato

10. FOLATO

a) ácido pteroilmonoglutâmico

b) L-metilfolato de cálcio

c) ácido (6S)-5-metiltreta-hidrofólico, sal de glucosamina

⁵ Menaquinona essencialmente sob a forma de menaquinona-7 e, em menor grau, menaquinona-6.

11. VITAMINA B12

- a) cianocobalamina
- b) hidroxocobalamina
- c) 5'-desoxiadenosilcobalamina
- d) metilcobalamina

12. BIOTINA

- a) D-biotina

13. VITAMINA C

- a) ácido L-ascórbico
- b) L-ascorbato de sódio
- c) L-ascorbato de cálcio⁶
- d) L-ascorbato de potássio
- e) 6-palmitato de L-ascorbilo
- f) L-ascorbato de magnésio
- g) L-ascorbato de zinco

B. Minerais

acetato de cálcio

L-ascorbato de cálcio

bisglicinato de cálcio

carbonato de cálcio

cloreto de cálcio

citrato malato de cálcio

sais de cálcio do ácido cítrico

gluconato de cálcio

glicerofosfato de cálcio

lactato de cálcio

⁶ Pode conter até 2 % de treonato.

piruvato de cálcio
sais de cálcio do ácido ortofosfórico
succinato de cálcio
hidróxido de cálcio
L-lisinato de cálcio
malato de cálcio
óxido de cálcio
L-pidolato de cálcio
L-treonato de cálcio
sulfato de cálcio
oligossacáridos fosforilados de cálcio
acetato de magnésio
L-ascorbato de magnésio
bisglicinato de magnésio
carbonato de magnésio
cloreto de magnésio
sais de magnésio do ácido cítrico
gluconato de magnésio
glicerofosfato de magnésio
sais de magnésio do ácido ortofosfórico
lactato de magnésio
L-lisinato de magnésio
hidróxido de magnésio
malato de magnésio
óxido de magnésio
L-pidolato de magnésio
citrato de magnésio e potássio
piruvato de magnésio
succinato de magnésio

sulfato de magnésio
taurato de magnésio
acetiltaurato de magnésio
carbonato ferroso
citrato ferroso
citrato férrico de amónio
gluconato ferroso
fumarato ferroso
difosfato férrico de sódio
lactato ferroso
sulfato ferroso
difosfato férrico (pirofosfato férrico)
sacarato férrico
ferro elementar (resultante da redução por carbonilo, electrólise ou hidrogénio)
bisglicinato ferroso
L-pidolato ferroso
fosfato ferroso
fosfato de amónio ferroso
EDTA de sódio férrico
taurato de ferro (II)
carbonato cúprico
citrato cúprico
gluconato cúprico
sulfato cúprico
L-aspartato de cobre
bisglicinato de cobre
complexo de cobre-lisina
óxido de cobre (II)

iodeto de sódio
iodato de sódio
iodeto de potássio
iodato de potássio
acetato de zinco
L-ascorbato de zinco
L-aspartato de zinco
bisglicinato de zinco
cloreto de zinco
citrato de zinco
gluconato de zinco
lactato de zinco
L-lisinato de zinco
malato de zinco
mono-L-metionina-sulfato de zinco
óxido de zinco
carbonato de zinco
L-pidolato de zinco
picolinato de zinco
sulfato de zinco
ascorbato de manganês
L-aspartato de manganês
bisglicinato de manganês
carbonato de manganês
cloreto de manganês
citrato de manganês
gluconato de manganês
glicerofosfato de manganês

pidolato de manganês
sulfato de manganês
bicarbonato de sódio
carbonato de sódio
cloreto de sódio
citrato de sódio
gluconato de sódio
lactato de sódio
hidróxido de sódio
sais de sódio do ácido ortofosfórico
sulfato de sódio
sulfato de potássio
bicarbonato de potássio
carbonato de potássio
cloreto de potássio
citrato de potássio
gluconato de potássio
glicerofosfato de potássio
lactato de potássio
hidróxido de potássio
L-pidolato de potássio
malato de potássio
sais de potássio do ácido ortofosfórico
L-selenometionina
levedura enriquecida em selênio⁷

⁷ Leveduras enriquecidas em selênio produzidas por fermentação na presença de selenito de sódio como fonte de selênio e contendo, na forma seca tal como é comercializada, 2,5 mg Se/g, no máximo. A espécie orgânica com selênio predominantemente presente na levedura é a selenometionina (entre 60 e 85 % do selênio total extraído do produto). O teor de outros compostos orgânicos com selênio, incluindo a selenocisteína, não deve

ácido selenioso
selenato de sódio
hidrogenosselenito de sódio
selenito de sódio
cloreto de crómio (III)
levedura enriquecida em crómio⁸
lactato de crómio (III) tri-hidratado
nitrato de crómio
picolinato de crómio
sulfato de crómio (III)
molibdato de amónio [molibdénio (VI)]
molibdato de potássio [molibdénio (VI)]
molibdato de sódio [molibdénio (VI)]
fluoreto de cálcio
fluoreto de potássio
fluoreto de sódio
monofluorofosfato de sódio
ácido bórico
borato de sódio
ácido ortossilícico estabilizado com colina
dióxido de silício
ácido silícico⁹
silício orgânico (monometilsilanotriol)

exceder 10 % do selénio total extraído. Os níveis de selénio inorgânico não devem normalmente exceder 1 % do selénio total extraído.

⁸ Levedura enriquecida em crómio produzida por cultura de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de cloreto de crómio (III) como fonte de crómio e contendo, na forma seca tal como é comercializada, 230-300 mg de crómio/kg. O teor de crómio (VI) não deve exceder 0,2 % do crómio total.

⁹ Sob a forma de gel.

ANEXO 5 – Vitaminas e sais minerais que podem ser declarados e respectivos valores de referência do nutriente (VRN) [64].

Vitamina	VRN	Mineral	VRN
Vitamina A (µg)	800	Potássio (mg)	2000
Vitamina D (µg)	5	Cloreto (mg)	800
Vitamina E (mg)	12	Cálcio (mg)	800
Vitamina K (µg)	75	Fósforo (mg)	700
Vitamina C (mg)	80	Magnésio (mg)	375
Tiamina (mg)	1,1	Ferro (mg)	14
Riboflavina (mg)	1,4	Zinco (mg)	10
Niacina (mg)	16	Cobre (mg)	1
Vitamina B6 (mg)	1,4	Manganês (mg)	2
Ácido fólico (µg)	200	Fluoreto (mg)	3,5
Vitamina B12 (µg)	2,5	Selénio (µg)	55
Biotina (µg)	50	Crómio (µg)	40
Ácido pantoténico (mg)	6	Molibdénio (µg)	50
		Iodo (µg)	150

REFERÊNCIAS

1. Alloway BJ. Heavy Metals in Soils. 2ª ed. Blackie Academic & Professional; 1995.
2. USGS. Chromium Commodity Summaries. Disponível em: <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/chromium/mcs-2018-chrom.pdf> [acedido em 02/07/2018].
3. BGS. European Mineral Statistics. Disponível em: <https://www.bgs.ac.uk/mineralsuk/statistics/europeanstatistics.html> [acedido em 10/08/2018].
4. Kotaś J, Stasicka Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut.* 2000; 107 (3): 263-83.
5. Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. 3ª ed. CRC Press; 2000.
6. Rakhunde R, Deshpande L, Juneja HD. Chemical Speciation of Chromium in Water: A Review. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2012; 42 (7): 776-810.
7. Shahid M, Shamshad S, Rafiq M, Khalid S, Bibi I, Niazi NK, et al. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere.* 2017; 178 (Supplement C): 513-33.
8. ESDAC. European Soil Data Centre. Disponível em: <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/resource-type/datasets> [acedido em 17/09/2018].
9. Tóth G, Hermann T, Szatmári G, Pásztor L. Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Sci Total Environ.* 2016; 565: 1054-62.
10. Oze C, Bird DK, Fendorf S. Genesis of hexavalent chromium from natural sources in soil and groundwater. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (16): 6544.
11. Salminen R, Batista M, M B, Demetriades A, De Vivo B, De Vos W, et al. FOREGS Geochemical Atlas of Europe, Part 1: Background Information, Methodology and Maps. 2005.
12. WHO. Chromium in drinking-water, Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/chromium.pdf?ua=1 [acedido em 14/07/2018].
13. Diretiva (UE) 2015/1787 da Comissão de 6 de outubro de 2015. *Jornal Oficial da União Europeia* nº L 260. [Acedido em 14/07/2018].

14. EPA. Chromium in Drinking Water. Disponível em: <https://www.epa.gov/dwstandardsregulations/chromium-drinking-water> [acedido em 17/07/2018].
15. Guertin J, Jacobs JA, Avakian CP. Chromium(VI) Handbook. 1ª ed. CRC Press; 2005.
16. WHO. Air Quality Guidelines - Second Edition. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/123074/AQG2ndEd_6_4Chromium.PDF [acedido em 14/07/2018].
17. RSC. Periodic Table - Chromium. Disponível em: <http://www.rsc.org/periodic-table/element/24/chromium> [acedido em 12/01/2018].
18. Mishra S, Bharagava RN. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2016; 34 (1): 1-32.
19. Unceta N, Séby F, Malherbe J, Donard OFX. Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397 (3): 1097-111.
20. Zhitkovich A. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chem Res Toxicol.* 2011; 24 (10): 1617-29.
21. Markiewicz B, Komorowicz I, Sajnog A, Belter M, Baratkiewicz D. Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological traceability: A review since 2000. *Talanta.* 2015; 132: 814-28.
22. Apte AD, Tare V, Bose P. Extent of oxidation of Cr(III) to Cr(VI) under various conditions pertaining to natural environment. *J Hazard Mater.* 2006; 128 (2): 164-74.
23. Dhal B, Thatoi HN, Das NN, Pandey BD. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *J Hazard Mater.* 2013; 250-251: 272-91.
24. Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Bruce-Robertson A. Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30 (4): 531-8.
25. Pechova A, Pavlata L. Chromium as an essential nutrient: A review. *Vet Med (Praha).* 2007; 52 (1): 1-18.
26. NIH. Chromium, Dietary Supplement Fact Sheet. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Chromium-HealthProfessional/> [acedido em 03/06/2018].

27. Clodfelder BJ, Vincent JB. The time-dependent transport of chromium in adult rats from the bloodstream to the urine. *J Biol Inorg Chem*. 2005; 10 (4): 383-93.
28. Junaid M, Hashmi MZ, Malik RN, Pei D-S. Toxicity and oxidative stress induced by chromium in workers exposed from different occupational settings around the globe: A review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016; 23 (20): 20151-67.
29. Lewicki S, Zdanowski R, Krzyżowska M, Lewicka A, Dębski B, Niemcewicz M, et al. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Ann Agric Environ Med*. 2014; 21 (2): 331-5.
30. Vincent JB. Mechanisms of Chromium Action: Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance. *J Am Coll Nutr*. 1999; 18 (1): 6-12.
31. Davis CM, Vincent JB. Isolation and Characterization of a Biologically Active Chromium Oligopeptide from Bovine Liver. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 339 (2): 335-43.
32. Chen Y, Watson HM, Gao J, Sinha SH, Cassady CJ, Vincent JB. Characterization of the Organic Component of Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance and Its Binding of Chromium. *J Nutr*. 2011; 141 (7): 1225-32.
33. Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T, Narayanan S. Chromium(III)-induced apoptosis of lymphocytes: death decision by ROS and Src-family tyrosine kinases. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33 (12): 1622-40.
34. Pattar GR, Tackett L, Liu P, Elmendorf JS. Chromium picolinate positively influences the glucose transporter system via affecting cholesterol homeostasis in adipocytes cultured under hyperglycemic diabetic conditions. *Mutat Res*. 2006; 610 (1-2): 93-100.
35. Choe S-Y, Kim S-J, Kim H-G, Lee JH, Choi Y, Lee H, et al. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci Total Environ*. 2003; 312 (1): 15-21.
36. Fang Z, Zhao M, Zhen H, Chen L, Shi P, Huang Z. Genotoxicity of Tri- and Hexavalent Chromium Compounds In Vivo and Their Modes of Action on DNA Damage In Vitro. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e103194.
37. Stearns DM, Silveira SM, Wolf KK, Luke AM. Chromium(III) tris(picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2002; 513 (1): 135-42.
38. Kirpnick-Sobol Z, Reliene R, Schiestl RH. Carcinogenic Cr(VI) and the Nutritional Supplement Cr(III) Induce DNA Deletions in Yeast and Mice. *Cancer Res*. 2006; 66 (7): 3480.

39. WHO. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Chromium, Nickel and Welding. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-9.pdf> [acedido em 29/07/2018].
40. USEPA. Toxicological Review of Hexavalent Chromium, U.S. Government Printing Office, Washington. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0144tr.pdf [acedido em 29/07/2018].
41. Hansen MB, Johansen JD, Menné T. Chromium allergy: significance of both Cr(III) and Cr(VI). *Contact Derm.* 2004; 49 (4): 206-12.
42. Kanojia RK, Junaid M, Murthy RC. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. *Toxicol Lett.* 1998; 95 (3): 165-72.
43. ATSDR. Toxicological profile for chromium. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf> [acedido em 06/06/2018].
44. De Flora S, Camoirano A, Micale RT, La Maestra S, Savarino V, Zentilin P, et al. Reduction of hexavalent chromium by fasted and fed human gastric fluid. I. Chemical reduction and mitigation of mutagenicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 306: 113-9.
45. De Flora S, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, E Corbett G, Kerger B. Estimates of the chromium(VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity. *Carcinogenesis.* 1997; 18 (3): 531-7.
46. Guttmann D, Poage G, Johnston T, Zhitkovich A. Reduction with glutathione is a weakly mutagenic pathway in chromium(VI) metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21 (11): 2188-94.
47. Zhitkovich A, Shrager S, Messer J. Reductive Metabolism of Cr(VI) by Cysteine Leads to the Formation of Binary and Ternary Cr–DNA Adducts in the Absence of Oxidative DNA Damage. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13 (11): 1114-24.
48. Stearns DM, Wetterhahn KE. Reaction of Chromium(VI) with Ascorbate Produces Chromium(V), Chromium(IV), and Carbon-Based Radicals. *Chem Res Toxicol.* 1994; 7 (2): 219-30.
49. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011; 283: 65-87.
50. Cieślak-Golonka M. Toxic and mutagenic effects of chromium(VI). A review. *Polyhedron.* 1996; 15 (21): 3667-89.

51. Husain N, Mahmood R. Hexavalent chromium induces reactive oxygen species and impairs the antioxidant power of human erythrocytes and lymphocytes: Decreased metal reducing and free radical quenching ability of the cells. *Toxicol Ind Health*. 2017; 33 (8): 623-35.
52. Setyaningsih Y, Husodo AH, Astuti I. Detection of Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Levels as a Biomarker of Oxidative DNA Damage among Home Industry Workers Exposed to Chromium. *Procedia Environ Sci*. 2015; 23: 290-6.
53. Shi X. Reduction of Chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1999; 2 (1): 87-104.
54. Arakawa H, Weng M-w, Chen W-c, Tang M-s. Chromium (VI) induces both bulky DNA adducts and oxidative DNA damage at adenines and guanines in the p53 gene of human lung cells. *Carcinogenesis*. 2012; 33 (10): 1993-2000.
55. Hodges NJ, Ádám B, Lee AJ, Cross HJ, Chipman JK. Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability. *Mutagenesis*. 2001; 16 (6): 467-74.
56. Reynolds MF, Peterson-Roth EC, Bernalov IA, Johnston T, Gurel VM, Menard HL, et al. Rapid DNA double-strand breaks resulting from processing of Cr-DNA crosslinks by both MutS dimers. *Cancer Res*. 2009; 69 (3): 1071-9.
57. Hu L, Liu X, Chervona Y, Yang F, Tang M-s, Darzynkiewicz Z, et al. Chromium induces chromosomal instability, which is partly due to deregulation of BubR1 and Emi1, two APC/C inhibitors. *Cell Cycle*. 2011; 10 (14): 2373-9.
58. Annangi B, Bonassi S, Marcos R, Hernández A. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016; 770: 140-61.
59. Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de junho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n.º L 183. [Acedido em 15/08/2018].
60. DGAV. Suplementos alimentares. Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=5904430&cboui=5904430> [acedido em 15/08/2018].
61. Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro de 2015. *Jornal Oficial da União Europeia* n.º L 327. [Acedido em 15/08/2018].

62. Regulamento (CE) N.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia n.º L 404. [Acedido em 15/08/2018].
63. EFSA. Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals. Disponível em: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf [acedido em 12/06/2018].
64. Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011. Jornal Oficial da União Europeia n.º L 304. [Acedido em 15/08/2018].
65. Regulamento (CE) N.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia n.º L 404. [Acedido em 15/08/2018].
66. EU Register of nutrition and health claims made on foods. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home [acedido em 15/08/2018].
67. Vincent JB. The Potential Value and Toxicity of Chromium Picolinate as a Nutritional Supplement, Weight Loss Agent and Muscle Development Agent. *Sports Med.* 2003; 33 (3): 213-30.
68. ODS. Chromium - Dietary Supplement Fact Sheet. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Chromium-HealthProfessional/> [acedido em 17/08/2018].
69. Onakpoya IJ, Wider B, Pittler MH, Ernst E. Food Supplements for Body Weight Reduction: A Systematic Review of Systematic Reviews. *Obesity.* 2011; 19 (2): 239-44.
70. Anderson RA. Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium. *J Am Coll Nutr.* 1997; 16 (5): 404-10.
71. Cefalu WT, Hu FB. Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27 (11): 2741.
72. Olin KL, Stearns D, Armstrong W, Keen C. Comparative retention/absorption of ⁵¹chromium (⁵¹Cr) from ⁵¹Cr chloride, ⁵¹Cr nicotinate and ⁵¹Cr picolinate in a rat model. *Trace Elem Electroly.* 1994; 11: 182-6.
73. Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, Gautschi K. Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 1996; 9 (1): 11-25.
74. EFSA. Scientific Opinion on the safety of chromium picolinate as a source of chromium added for nutritional purposes to foodstuff for particular nutritional uses and to foods intended

- for the general population. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1883> [acedido em 18/08/2018].
75. WHO. Trace elements in human nutrition and health. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/> [acedido em 25/08/2018].
76. Martone N, Rahman GMM, Pamuku M, Kingston HMS. Determination of Chromium Species in Dietary Supplements Using Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry with Mass Balance. *J Agric Food Chem.* 2013; 61 (41): 9966-76.
77. Avula B, Wang Y-H, Duzgoren-Aydin NS, Khan IA. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. *Food Chem.* 2011; 127 (1): 54-62.
78. Frentiu T, Ponta M, Darvasi E, Frentiu M, Cordos E. Analytical capability of a medium power capacitively coupled plasma for the multielemental determination in multimineral/multivitamin preparations by atomic emission spectrometry. *Food Chem.* 2012; 134 (4): 2447-52.
79. Krawczyk M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 88: 377-84.
80. Krejčová A, Ludvíková I, Černohorský T, Pouzar M. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. *Food Chem.* 2012; 132 (1): 588-96.
81. Zinn GM, Rahman GMM, Faber S, Wolle MM, Pamuku M, Kingston HMS. Evaluation of Dietary Supplement Contamination by Xenobiotic and Essential Elements Using Microwave-Enhanced Sample Digestion and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *J Diet Suppl.* 2016; 13 (2): 185-208.
82. Hamilton EM, Young SD, Bailey EH, Watts MJ. Chromium speciation in foodstuffs: A review. *Food Chem.* 2018; 250: 105-12.
83. Trzonkowska L, Leśniewska B, Godlewska-Żyłkiewicz B. Recent Advances in On-Line Methods Based on Extraction for Speciation Analysis of Chromium in Environmental Matrices. *Crit Rev Anal Chem.* 2016; 46 (4): 305-22.

84. EPA. Method 3060A, alkaline digestion for hexavalent chromium. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3060a.pdf> [acedido em 25/08/2018].
85. Unceta N, Astorkia M, Abrego Z, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. A novel strategy for Cr(III) and Cr(VI) analysis in dietary supplements by speciated isotope dilution mass spectrometry. *Talanta*. 2016; 154 (Supplement C): 255-62.
86. Ahmadi S, Haji Shabani A, Dadfarnia S, Taei M. On-Line Preconcentration and Speciation of Chromium by an 8-Hydroxyquinoline Microcolumn Immobilized on Surfactant-Coated Alumina and Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry. *Turk J Chem*. 2007; 31 (2): 191-9.
87. Martendal E, Maltez HF, Carasek E. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in environmental samples determined by selective separation and preconcentration on silica gel chemically modified with niobium(V) oxide. *J Hazard Mater*. 2009; 161 (1): 450-6.
88. Gil RA, Cerutti S, Gásquez JA, Olsina RA, Martinez LD. Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination. *Talanta*. 2006; 68 (4): 1065-70.
89. Leśniewska B, Trzonkowska L, Zambrzycka E, Godlewska-Żyłkiewicz B. Multi-commutation flow system with on-line solid phase extraction exploiting the ion-imprinted polymer and FAAS detection for chromium speciation analysis in sewage samples. *Anal Methods*. 2015; 7 (4): 1517-26.
90. Yu H, Sun W, Zhu X, Zhu X, Wei J. Study on Multi-walled Carbon Nanotubes On-line Separation/ Preconcentration of Chromium(III) and Chromium Speciation. *Anal Sci*. 2012; 28 (12): 1219-24.
91. Murphy V, Hughes H, McLoughlin P. Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. *Chemosphere*. 2008; 70 (6): 1128-34.
92. De Rossi A, Rigon MR, Zapparoli M, Braido RD, Colla LM, Dotto GL, et al. Chromium (VI) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* subjected to chemical and thermal treatments. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25 (19): 19179-86.
93. Chen S, Zhu S, He Y, Lu D. Speciation of chromium and its distribution in tea leaves and tea infusion using titanium dioxide nanotubes packed microcolumn coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chem*. 2014; 150 (Supplement C): 254-9.
94. Prusisz B, Żyrnicki W. Preconcentration of some metals using metalfix chelamine resin prior to ICP-AES analysis. *Fresenius J Anal Chem*. 1999; 363 (1): 110-2.

95. Blain S, Appriou P, Handel H. Preconcentration of trace metals from sea water with the chelating resin Chelamine. *Anal Chim Acta*. 1993; 272 (1): 91-7.
96. Tavares S. ICP-MS na análise de águas: análise direta de água engarrafadas e avaliação de uma estratégia de colheita de águas naturais em mini-colunas [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2002.
97. Almeida A. Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a Determinação de Espécies Inorgânicas em Amostras Biológicas e Farmacêuticas – Técnicas Cromatográficas e de Espectrofotometria de Absorção Atômica [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2000.
98. López-Artíguez M, Cameán A, Repetto M. Preconcentration of Heavy Metals in Urine Using Chelating Ion Exchange Resin and Quantification by ICP-AES. *At Spectrosc*. 1996; 17: 83-7.
99. Iglesias M, Anticó E, Salvadó V. Characterisation of Metalfix-Chelamine and its application in precious metal adsorption. *Solvent Extr Ion Exc*. 2000; 18 (5): 965-79.
100. Pohl P, Prusisz B, Zyrnicki W. Application of Metalfix Chelamine prior to the determination of noble metals by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. 2005; 67 (1): 155-61.
101. Muzikar M, Fontàs C, Hidalgo M, Havel J, Salvadó V. A preconcentration system using polyamine Metalfix-Chelamine resin for the on-line determination of palladium(II) and platinum(IV) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*. 2006; 70 (5): 1081-6.
102. Coedo AG, Dorado MT, Padilla I, Alguacil F. Preconcentration and matrix separation of precious metals in geological and related materials using metalfix-chelamine resin prior to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 1997; 340 (1): 31-40.
103. Vasconcelos MTSD, Leal MFC. Speciation of Cu, Pb, Cd and Hg in waters of the Oporto coast in Portugal, using pre-concentration in a Chelamine resin column 1. *Anal Chim Acta*. 1997; 353 (2): 189-98.
104. Merck. Tetraethylene pentamine. Disponível em: http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Tetraethylene-pentamine,MDA_CHEM-814713?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.pt%2F [acedido em 29/08/2018].
105. Iglesias M, Anticó E, Salvadó V. On-line determination of trace levels of palladium by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2003; 59 (4): 651-7.

106. Guéguen C, Dominik J, Perret D. Use of chelating resins and inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of trace and major elements in small volumes of saline water samples. *Fresenius J Anal Chem.* 2001; 370 (7): 909-12.
107. Pohl P, Prusisz B. Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection. *Anal Chim Acta.* 2004; 502 (1): 83-90.
108. Nisi S, Copia L, Dafinei I, L. Di Vacri M. ICP-MS measurement of natural radioactivity at LNGS. *Int J Mod Phys A.* 2017; 32: 1743003.
109. University of The West Indies. Preparation of pH buffer solutions. Disponível em: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html> [acedido em 21/01/2018].
110. USP (United States Pharmacopeia), 2008. Chromium picolinate tablets. United States Pharmacopeia, 31ª ed. And National Formulary, 26ª ed. US Pharmacopeia (USP) Convention Inc., Rockville, Maryland, 923.
111. May TW, Wiedmeyer RH. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *At Spectrosc.* 1998; 19 (5): 150-5.
112. Higashi K, Hori K, Tsuchiya R. Formation Constants of Chromium(III) Complexes with Phthalic Acid and the Jumping Property of the Solid Complex. *Bull Chem Soc Jpn.* 1967; 40: 2569-72.
113. Gáspár A, Posta J, Tóth R. On-line chromatographic separation and determination of chromium(III) and chromium(VI) with preconcentration of the chromium(III) using potassium hydrogen phthalate, in various samples by flame atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 1996; 11 (11): 1067-74.
114. Elderfield H. Chromium speciation in sea water. *Earth Planet Sci Lett.* 1970; 9 (1): 10-6.
115. Turner DR, Whitfield M, Dickson AG. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and sea water at 25°C and 1 atm pressure. *Geochim Cosmochim Acta.* 1981; 45 (6): 855-81.
116. Maurizio P, Millero F, La Noce T. Chromium(III) interaction in sea water through its oxidation kinetics. 1991; 34: 29-46.
117. DePamphilis ML, Cleland WW. Preparation and properties of chromium(III)-nucleotide complexes for use in the study of enzyme mechanisms. *Biochemistry.* 1973; 12 (19): 3714-24.

118. EDUCA. Produtos de solubilidade (Ks) a 25 °C. Disponível em: <http://educa.fc.up.pt/ficheiros/fichas/888/Produtos%20de%20solubilidade%20a%2025%20BAC.pdf> [acedido em 28/09/2018].
119. World Health Organization, United Nations Environment Programme & International Labour Organization. (2009). Inorganic chromium(III) compounds. Geneva : World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44090> [acedido em 29/06/2018].
120. Censi R, Di Martino P. Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules*. 2015; 20 (10): 18759-76.
121. EFSA. Chromium(III) lactate trihydrate as a source of chromium added for nutritional purposes to food supplements. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2009.1112> [acedido em 02/09/2018].
122. NCBI. Chromic Sulfate. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chromium_sulfate#section=Top [acedido em 06/09/2018].
123. Evans GW, Pouchnik DJ. Composition and biological activity of chromium-pyridine carboxylate complexes. *J Inorg Biochem*. 1993; 49 (3): 177-87.
124. Pezzin SH, Rivera JFL, Collins CH, Collins KE. Reduction of trace quantities of chromium(VI) by strong acids. *J Braz Chem Soc*. 2004; 15: 58-65.