



Faculdade de Ciências
Departamento de Química
Licenciatura em Química Ambiental
Trabalho de Conclusão de Curso

Tema:

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo



Autora: Lucinda Ernesto Livele.

Maputo, Setembro de 2024



Faculdade de Ciências
Departamento de Química
Trabalho de Conclusão de Curso

Tema:

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

Autora: Lucinda Ernesto Livele

Supervisora: Mestre Noor Jehan Gulamussen

Co-supervisor: Mestre Sérgio Chibute

Maputo, Setembro de 2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mulheres incansáveis e resilientes, como eu, minha irmã Ângela e minha amiga Hássima. Mesmo diante de obstáculos e desafios financeiros, nunca nos rendemos, mantendo acesa a chama da determinação em nos formar e evoluir como seres humanos, lutando diariamente em busca da realização de nossos sonhos.

Dedico também, com profunda gratidão, aos meus amados pais, Ernesto Livele e Meldina Sigáúque Livele, alicerces inabaláveis nos momentos mais árduos desta jornada académica.

A sua presença constante e inspiradora foi o farol que guiou os meus passos, iluminando o caminho com amor e incentivo incondicionais. Vocês são, e sempre serão, a fonte inesgotável de força e motivação para perseguir meus ideais.

Que esta conquista seja um tributo à perseverança, à coragem e à determinação de todos aqueles que, mesmo diante de adversidades, nunca desistem de lutar por um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ergo minha gratidão a Deus, pela dádiva da vida, pela saúde e pela sabedoria que me foram graciosamente concedidas desde os primeiros dias, iluminando o meu caminho até aos dias actuais.

O meu profundo agradecimento aos meus queridos padrinhos, o Lourino Chemane e a Sandra Inguane Chemane, por nutrirem em mim a chama da perseverança na busca pelos meus sonhos e objectivos.

Agradeço imensamente aos docentes da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane, pelos ensinamentos valiosos compartilhados ao longo desses quatro anos. Em especial, aos meus supervisores, a Mestre Noor Gulamussen e o Mestre Sérgio Chibute, por todo o apoio e direccionamento durante a elaboração deste trabalho.

A minha gratidão também se estende aos técnicos do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina e do Departamento de Química, pelo suporte oferecido durante a realização da parte experimental deste trabalho.

Um agradecimento especial à minha querida “Malta”, em particular ao Gércio Nhantumbo e à Daniela Nhocuana, por todos os conselhos, apoio e motivação que me proporcionaram ao longo desta jornada académica.

Às minhas amigas e colegas da faculdade, Hássima Loforte e Hana Kereta, o meu muito obrigado pela ajuda, pelo companheirismo, por estarem ao meu lado nos trabalhos em grupo e por me incentivarem a estudar, mesmo quando o cansaço parecia vencer.

Expresso a minha profunda gratidão aos meus colegas da PANGEIA, S.A., especialmente a Créspe Manhique, Milton Milambo e Lizandra Sabino, pelos valiosos subsídios, dicas e sugestões que enriqueceram este relatório.

Por fim, estendo a minha gratidão aos meus familiares, amigos e a todos aqueles que, porventura, não foram mencionados nestes agradecimentos, mas que, directa ou indirectamente, contribuíram para que eu alcançasse este momento. Às suas presenças foram fundamentais nesta trajectória.

DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA

Declaro pela minha honra que este Trabalho de Culminação do Curso de Licenciatura em Química Ambiental é resultado da minha investigação, tendo sido desenvolvido com base nos recursos feitos referência e análises laboratoriais. Nunca foi apresentado em instituição alguma para obtenção de qualquer título/grau académico.

Maputo, Setembro de 2024

A autora:

(Lucinda Ernesto Livele)

RESUMO

A deficiência de micronutrientes, é um grave problema de saúde pública global, tendo impactos significativos, principalmente em países em via de desenvolvimento como Moçambique, com mais de metade das crianças menores de 5 anos sofrendo dessa condição em todo o país. Para combater esse problema, o governo moçambicano instituiu uma lei pelo decreto nº 9/2016, obrigando a fortificação de farinhas de trigo e milho com 20 a 140mg/kg de ferro.

Dada a função vital do ferro no organismo, é essencial garantir a quantidade adequada desse micronutriente nos alimentos fortificados, conforme exigido pela legislação nacional. Portanto, este estudo teve como objectivo primordial analisar o teor de ferro presente nas farinhas de trigo e milho fortificadas comercializadas no mercado da cidade de Maputo.

A análise foi feita em 12 amostras de farinha de trigo e milho, sendo uma não fortificada, pelos métodos de espectrofotometria de absorção molecular, espectrofotometria de absorção atómica e em duas amostras pelo método de referência em vigor no LNHA. O método de espectrofotometria de absorção molecular foi validado através da avaliação de nove parâmetros, que incluíam faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, selectividade, exactidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Todos os parâmetros avaliados mostraram-se satisfatórios, com excepção da sensibilidade que de acordo com o teste *t-student*, não havia evidências suficientes para considerá-la satisfatória a um nível de confiança de 95%.

Uma vez validado o método, prosseguiu-se com a análise do teor de ferro nas amostras de farinhas de trigo e milho colhidas no Mercado Grossista do Zimpeto, Shoprite da Praça da Paz e do Zimpeto, na Padaria Guebo e a amostra não fortificada. Verificou-se, através do teste *t-student*, não haver diferenças significativas nos resultados obtidos pelos métodos de espectrofotometria de absorção molecular (EAM) e espectrofotometria de absorção atómica por chama (FAAS), porém, uma diferença acentuada foi observada na amostra ATS, que apresentou um teor de ferro de $74,645 \pm 4,003$ mg/kg e $78,525 \pm 0,460$ mg/kg para FAAS e EAM respectivamente.

No que diz respeito à comparação com os limites mínimo e máximo estabelecidos pela legislação nacional vigente, todas as amostras apresentaram teor de ferro em conformidade com a legislação.

Embora todas as amostras analisadas atendessem aos limites mínimo e máximo estabelecidos pela legislação nacional vigente, é importante destacar que 58,34% das amostras (APP, AWM, AWS, ACS, AIS, AXM e AXS) apresentaram teores de ferro equivalentes ao limite mínimo de 20 mg/kg. Este nível é equivalente ao teor de ferro encontrado na farinha de milho não fortificada

(ANF), sendo $20,202 \pm 0,320$ mg/kg em análises feitas por FAAS e $19,511 \pm 0,829$ mg/kg em análises realizadas por EAM, podendo ser insuficiente para suprir as necessidades nutricionais de grupos vulneráveis, quando a dieta não for combinada com outros alimentos ricos em ferro, devido à baixa biodisponibilidade e variabilidade de ingestão.

Palavras-chave: *Deficiência de ferro; Desnutrição crónica; EAM; Fortificação de farinhas; Biodisponibilidade.*

Lista de siglas e acrónimos

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atómica)
AI	<i>Adequate Intake</i> (Ingestão Adequada)
AM	Amostra Matrizada
ANM	Amostra Não Matrizada
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CV	Coeficiente de Variação
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i> (Ingestão Dietética de Referência)
EAM	Espectrofotometria de absorção molecular na região UV-vis
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i> (Requisito Médio Estimado)
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atómica por chama)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
H₀	Hipótese nula
H₁	Hipótese alternativa
HR	Humidade Relativa
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LNHAA	Laboratório Nacional de Higiene de Águas e Alimentos
MISAU	Ministério da Saúde
NaFeEDTA	Ácido etilenodiaminotetracético de ferro sódico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i> (Dose Diária Recomendada)
SPM	<i>Suspended Particulate Matter</i> (Material Particulado Suspenso)
TUL	<i>Tolerable Upper Level</i> (Limite Máximo de Ingestão Tolerável)
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

1. Capítulo I: Generalidades	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objectivos	2
1.2.1. Objectivo geral	2
1.2.2. Objectivos específicos	2
1.3. Perguntas de pesquisa	2
1.4. Justificativa da escolha do tema	2
1.5. Metodologia	3
2. Capítulo II: Revisão Bibliográfica	5
2.1. Ferro	5
2.1.1. Ciclo biogeoquímico do ferro	5
2.1.2. Factores que influenciam a absorção do ferro	6
2.1.3. Ingestão recomendada do ferro	7
2.2. Fortificação alimentar	10
2.2.1. Fonte de ferro para fortificação	10
2.2.2. Veículos para fortificação com ferro	11
2.2.2.1. Farinha de milho	12
2.2.2.2. Farinha de trigo	12
2.3. Métodos analíticos	13
2.3.1. Espectrofotometria de absorção molecular na região UV-vis (EAM)	13
2.3.2. Espectrofotometria de Absorção Atómica (AAS)	13
2.3.2.1. Lei de Lambert-Beer	14
2.4. Validação de métodos analíticos	15
2.4.1. Linearidade	15
2.4.2. Sensibilidade	16
2.4.3. Selectividade	16
2.4.4. Precisão	16
2.4.5. Exactidão	17
2.4.6. Limite de detecção	17
2.4.7. Limite de quantificação	18
2.4.8. Robustez	18
3. Capítulo III: Parte Experimental	19
3.1. Materiais, Equipamentos e Reagentes	19
3.1.1. Materiais e equipamentos	19
3.1.2. Reagentes	19
3.2. Amostragem	20

3.3.	Procedimentos Experimentais.....	22
3.3.1.	Lavagem do material.....	22
3.3.2.	Validação da espectrofotometria de absorção molecular.....	22
3.3.2.2.	Linearidade	23
3.3.2.3.	Sensibilidade	24
3.3.2.4.	Selectividade	24
3.3.2.5.	Precisão	25
3.3.2.6.	Exactidão.....	26
3.3.2.7.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	28
3.3.2.8.	Robustez.....	28
3.3.3.	Determinação do ferro nas farinhas de trigo e milho.....	29
3.3.3.1.	Comparação dos resultados obtidos por EAM e FAAS.....	29
4.	Capítulo IV: Apresentação, Discussão e Interpretação dos Resultados	30
4.1.	Apresentação dos resultados	30
4.1.1.	Resultados da validação do método analítico	30
4.1.1.1.	Análise de Homogeneidade dentro da faixa de trabalho	30
4.1.1.2.	Parâmetros avaliados a partir da regressão linear	31
4.1.1.3.	Robustez.....	33
4.1.2.	Resultados da determinação do ferro nas amostras de farinha de trigo e farinha de milho	34
4.2.	Discussão e Interpretação dos Resultados	36
4.2.1.	Validação do método analítico.....	36
4.2.2.	Análise das amostras.....	38
4.2.2.1.	Comparação dos resultados obtidos pelo método de EAM e FAAS	38
4.2.2.2.	Comparação dos teores obtidos com os limites estabelecidos.....	39
4.2.2.3.	Comparação das concentrações obtidas com os valores rotulados.....	40
4.2.2.4.	Comparação das concentrações de ferro entre farinhas da mesma marca ...	40
5.	Capítulo V: Conclusões e Recomendações.....	42
5.1.	Conclusões	42
5.2.	Recomendações	43
	Referências Bibliográficas	44
	Anexos	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da metodologia usada no trabalho	4
Figura 2. Ciclo do ferro.	6
Figura 3: Fluxograma geral de processamento industrial do milho.....	13
Figura 4. Mapa de localização das áreas de amostragem	21
Figura 5. Padrões usados para curva de calibração.....	22
Figura 6. Padrões usados para curva de calibração no método de referência.....	27
Figura 7.: Curva de Calibração do Ferro	31
Figura 8. Comparação do teor de ferro com os limites estabelecidos pela lei.....	39
Figura 9. Comparação das concentrações obtidas com o valor rotulado.....	40
Figura 10. Comparação das concentrações de ferro entre farinhas da mesma marca.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Recomendações dietéticas do ferro.....	9
Tabela 2. Materiais.....	19
Tabela 3. Equipamentos.....	19
Tabela 4. Reagentes usados nas análises laboratoriais	19
Tabela 5. Quantidade e data da colheita das amostras em cada local da amostragem	20
Tabela 6. Absorvâncias dos padrões P1 e P7 e das respectivas variâncias.....	30
Tabela 7. Parâmetros da curva de calibração de ferro	31
Tabela 8. Resultados da avaliação dos parâmetros de validação do método analítico (EAM) ...	32
Tabela 9. Resultado das concentrações de ferro usadas para o cálculo da exactidão do método de EAM.....	32
Tabela 10. Resultados das concentrações de ferro usados na validação da EAM.....	33
Tabela 11. Resultado das concentrações determinadas para a realização do teste ANOVA.....	33
Tabela 12. Tabela ANOVA para avaliação da estabilidade dos padrões	34
Tabela 13. Concentrações de farinha de milho e trigo obtidas por EAM e FAAS.....	35
Tabela 14. Teste t - Emparelhado	35

ÍNDICE DE FIGURAS DOS ANEXOS

Figura A 1: (a) destilador; (b) desionizador(c) Estufa	I
Figura A 2 (a) placa aquecedora com agitador magnético; (b) pH-metro; (c) mufla	I
Figura A 3. Espectrofotómetro de Absorção Molecular à esquerda; Espectrofotómetro de Absorção Atómica à direita	II
Figura A 4. Balança analítica.....	II
Figura A 5. Curvas de calibração (EAM e FAAS)	V
Figura A 6. Curva de calibração do método de referência (LNHAA).....	VI
Figura A 7. Valores Críticos da Distribuição de Fischer-Snedecor.....	VII
Figura A 8 Tabela de valores críticos de t <i>Student</i> bilateral	VIII

1. Capítulo I: GENERALIDADES

1.1.Introdução

A deficiência de micronutrientes, particularmente de ferro, representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo, afectando desproporcionalmente os grupos mais vulneráveis, como crianças e mulheres em idade reprodutiva (Rich, 2016). Em Moçambique, a desnutrição crónica é alarmante, com cerca de 53% das crianças menores de 5 anos sofrendo dessa condição, segundo dados recentes (UNICEF, 2022). As zonas centro e norte são as mais críticas, onde as províncias com as maiores taxas são Nampula, com 59%, Zambézia com 57% e Cabo Delgado com 57% (MISAU, 2021).

A carência de ferro está intimamente relacionada a complicações graves, como anemia ferropriva, redução da capacidade de trabalho em adultos, infecções recorrentes e atrasos no desenvolvimento psicomotor e cognitivo em crianças (Umbelino & Rossi, 2006). O ferro desempenha um papel fundamental na constituição da hemoglobina, participando do transporte de oxigénio e dióxido de carbono, sendo indispensável para a respiração celular.

Diante desse cenário preocupante, várias estratégias têm sido adoptadas para mitigar a deficiência de micronutrientes, com destaque para a fortificação de alimentos. Nesse contexto, o governo moçambicano aprovou o Regulamento de Fortificação de Alimentos com Micronutrientes Industrialmente Processados (Decreto nº 9/2016, de 18 de Abril), tornando obrigatória a adição de ferro às farinhas de trigo e milho em níveis específicos (20 mg/kg a 140 mg/kg).

A fortificação de farinhas tem-se mostrado uma estratégia eficaz, simples e economicamente viável para fornecer nutrientes essenciais a grandes populações, sem exigir mudanças drásticas nos hábitos alimentares (Martínez, 2006; WHO, 2010). Considerando que mais de 600 milhões de toneladas de farinhas de trigo e milho são processados anualmente em todo o mundo, sendo amplamente consumidas na forma de pães, bolos, massas e outros produtos, a fortificação dessas farinhas representa uma oportunidade singular para o combate à deficiência de ferro.

No entanto, é fundamental garantir que os níveis de ferro presentes nas farinhas fortificadas sejam adequados e atendam às recomendações nutricionais estabelecidas, a fim de alcançar os benefícios desejados para a saúde pública. Nesse sentido, esta monografia tem como objectivo avaliar os teores de ferro em farinhas de trigo e milho fortificadas comercializadas na cidade de Maputo, Moçambique, e analisar a sua conformidade com as directrizes nacionais e internacionais.

Através de uma análise criteriosa, baseada em métodos analíticos validados, busca-se fornecer informações relevantes sobre a eficácia dos programas de fortificação de farinhas em Moçambique, bem como identificar possíveis lacunas e oportunidades de aprimoramento. Espera-se que os resultados obtidos neste estudo contribuam para o fortalecimento das políticas de segurança alimentar e nutricional no país, visando mitigar os impactos negativos da deficiência de ferro na população, especialmente nos grupos mais vulneráveis.

1.2.Objectivos

1.2.1. Objectivo geral

- ✓ Avaliar conformidade com as recomendações nutricionais vigentes em Moçambique dos níveis de ferro presente em farinhas de trigo e milho fortificadas comercializadas em Maputo.

1.2.2. Objectivos específicos

- ✓ Identificar e colher amostras de farinhas de trigo e milho fortificadas com ferro disponíveis no mercado de Maputo;
- ✓ Determinar o teor de ferro nas farinhas aplicando a espectrofotometria de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrofotometria de absorção molecular (EAM);
- ✓ Comparar os resultados obtidos pelos dois métodos;
- ✓ Comparar os níveis de ferro encontrados nas farinhas com os valores rotulados e com os valores recomendados pela legislação moçambicana.

1.3.Perguntas de pesquisa

- ✓ Qual é a concordância entre os níveis de ferro declarados nos rótulos e os teores realmente presentes nas farinhas de trigo e milho fortificadas comercializadas em Maputo?
- ✓ Os teores de ferro encontrados nas farinhas de trigo e milho fortificadas analisadas estão em conformidade com as recomendações estabelecidas pelo decreto 9/2016 de 18 de Abril, e outras directrizes nacionais e internacionais?
- ✓ Que estratégias e medidas podem ser recomendadas para aprimorar os programas de fortificação de farinhas em Moçambique, visando garantir uma ingestão adequada de ferro pela população?

1.4.Justificativa da escolha do tema

Em uma sociedade onde os níveis de desnutrição e pobreza são alarmantes, é crucial buscar mecanismos eficazes e acessíveis para mitigar e prevenir essa condição. A fortificação

alimentar emerge como uma estratégia promissora nessa luta, oferecendo uma maneira económica e replicável de suprir deficiências nutricionais, sem comprometer significativamente as dietas alimentares das populações afectadas.

O governo de Moçambique reconhece a importância da fortificação alimentar e implementa políticas que exigem a adição de micronutrientes, como ferro, em farinhas de milho e trigo. Essas farinhas são componentes essenciais da dieta diária em Moçambique, consumidas de diversas formas, como pães, papas e chima, e desempenham um papel fundamental na suplementação de nutrientes, especialmente do ferro, nas famílias moçambicanas.

Dada a função vital do ferro no organismo, é essencial garantir a quantidade adequada desse micronutriente nos alimentos fortificados, conforme exigido pela legislação moçambicana. Este estudo, para além de contribuir para o controle de qualidade desses produtos, também visa incentivar um maior consumo dessas farinhas como uma estratégia para combater a anemia em Moçambique.

Ao avaliar os níveis de ferro nessas farinhas e compará-los com as recomendações nutricionais, espera-se fornecer informações valiosas para os produtores, reguladores e consumidores sobre a eficácia da fortificação alimentar e a sua contribuição para a saúde pública em Moçambique. Este estudo também pode destacar áreas de melhoria na implementação e monitoramento das políticas de fortificação alimentar, visando garantir melhores resultados para a população moçambicana.

1.5. Metodologia

A realização deste trabalho obedeceu a 4 etapas para o alcance dos objectivos propostos os quais são apresentados na figura 1.

A revisão bibliográfica consistiu na recolha de informações sobre as características do ferro e sua biodisponibilidade, fortificação alimentar com o ferro, fundamentos e validação de métodos analíticos nas fontes mencionadas na figura 1.

Seguiu-se a amostragem, onde foram colhidas amostras de farinhas de trigo e milho nos locais seleccionados.

A etapa dos ensaios laboratoriais envolveu a determinação e avaliação dos parâmetros seleccionados para a validação da EAM, seguida da determinação do teor de ferro nas farinhas de trigo e milho pelos métodos de EAM, FAAS e método de referência (em duas amostras de farinha, uma de trigo e uma de milho).

Por fim, a análise e discussão dos resultados foram realizadas através da elaboração de tabelas e gráficos, com base nas determinações feitas na etapa anterior, contemplando os parâmetros para validação da EAM, o teor de ferro nas amostras analisadas e os respectivos testes para a comparação das médias experimentais da EAM e FAAS. Esta última etapa culminou com a elaboração deste relatório, que seguiu as normas em vigor na Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane. O relatório possui informações que vão desde a introdução, objectivos, justificativa da escolha do tema, revisão bibliográfica, parte experimental, apresentação e interpretação dos resultados, conclusões e recomendações.

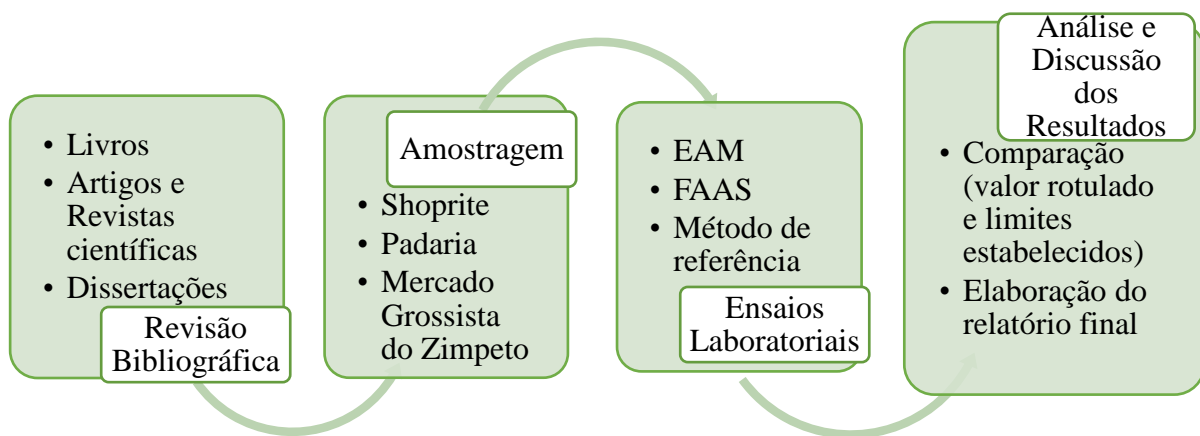


Figura 1. Esquema da metodologia usada no trabalho

2. Capítulo II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ferro

O ferro é um metal pertencente ao oitavo grupo B e quarto período da tabela periódica, e é um elemento bastante abundante na crosta terrestre. É amplamente útil biologicamente por diversos motivos tais como transporte de oxigénio, função enzimática, sistema imunológico, desenvolvimento cognitivo e neurológico, regulação da temperatura corporal e metabolismo energético (Carvalho *et al.*, 2006).

Embora seja bastante abundante, o ferro é dificilmente absorvido pelo organismo humano devido a factores não só fisiológicos como também dietéticos. O ferro encontra-se distribuído em diferentes partes do nosso corpo, sendo que a maior parte deste encontra-se na hemoglobina no sangue ou mioglobina nos tecidos, e o restante encontra-se em enzimas ligadas às várias células (Zancul, 2004).

Dada a sua ampla importância para o homem, a carência do ferro causa problemas e o maior destes é a anemia. A deficiência do ferro ocorre gradual e progressivamente, seguindo três etapas até que a anemia se manifeste como depleção de ferro, deficiência de ferro e anemia ferropriva. Uma das formas de tratamento da anemia é a fortificação dos alimentos com o ferro (Zancul, 2004).

2.1.1. Ciclo biogeoquímico do ferro

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, representando cerca de 5% de sua composição (Rudnick & Gao, 2003). A sua ocorrência está intimamente ligada aos minerais formadores de rochas, nos quais se apresenta principalmente como silicatos, óxidos e sulfetos de ferro. Esses minerais constituem as rochas ígneas, sedimentares e metamórficas (Klein & Philpotts, 2017).

Nos solos, o ferro é um componente fundamental, influenciando nas suas propriedades físicas e químicas. As principais formas do ferro no ambiente incluem óxidos cristalinos insolúveis (hematite, magnetite, goethite), sulfetos (pirite, pirrotite), iões ferrosos (Fe^{2+}) e férricos (Fe^{3+}), além de complexos orgânicos de ferro (quelatos com ácidos fúlvicos e húmicos) (Raiswell, 2012). Essas formas são pouco biodisponíveis para absorção pelos organismos vivos, incluindo os seres humanos. O ciclo biogeoquímico do ferro em ambientes aquáticos, representado pela Figura 2, envolve uma série de processos e interfaces que regem o comportamento e distribuição deste importante nutriente. As principais entradas de ferro no sistema ocorrem através do intemperismo de minerais contendo ferro presentes em solos e rochas, resultando na

libertação de CO_2 , e pelo escoamento superficial carregando iões de ferro dissolvidos, $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ provenientes da bacia hidrográfica (Xia *et al.*, 2022).

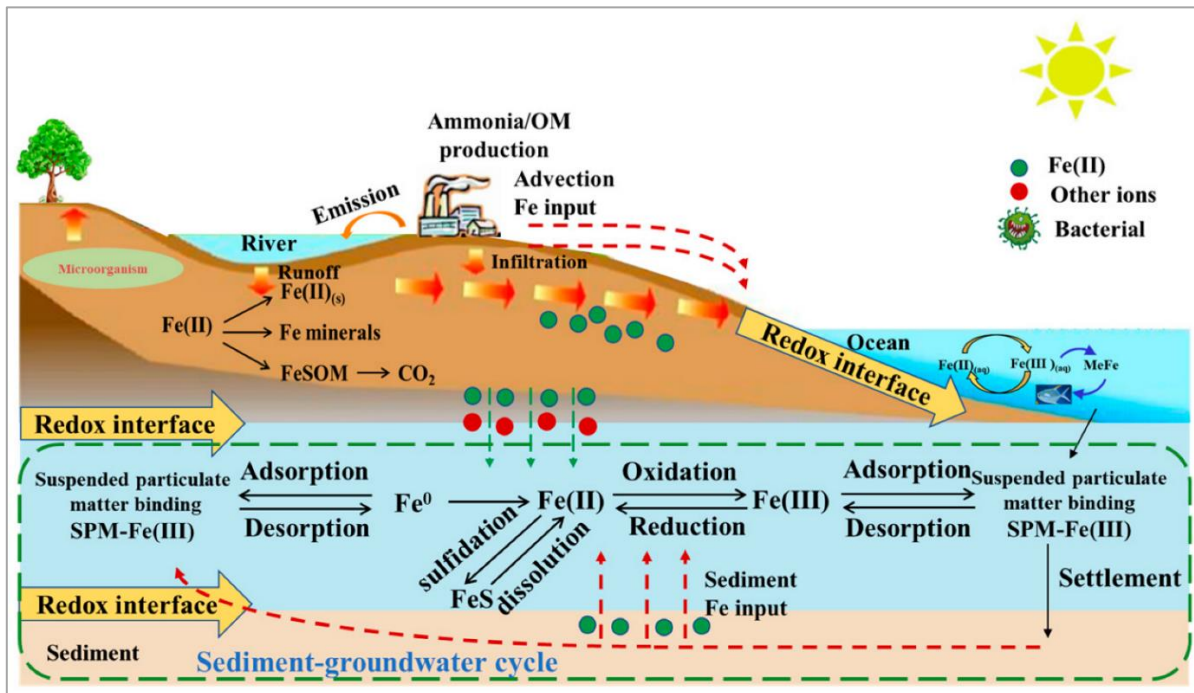


Figura 2. Ciclo do ferro. Fonte: (Xia *et al.*, 2022)

Na coluna d'água, o ferro pode existir sob diferentes formas iónicas, como Fe(II) ou outras espécies. As bactérias desempenham um papel crucial neste ambiente, influenciando a especiação e biodisponibilidade do ferro. Processos de adsorção e dessorção ocorrem continuamente, envolvendo a interacção do ferro com material particulado suspenso (SPM - *Suspended Particulate Matter*).

Uma interface redox crítica é estabelecida na região de contacto entre o sedimento e a água sobrejacente. Nesta interface, reacções de oxidação do Fe(II) a Fe(III) e de redução do Fe(III) a Fe(II) ocorrem, mediadas por actividade bacteriana e controladas pelas condições redox prevalentes.

Os sedimentos actuam como um reservatório importante de ferro, recebendo aportes de material particulado em suspensão ligado ao Fe(III) . Um ciclo de dissolução e precipitação do ferro ocorre entre os sedimentos e as águas intersticiais (poros).

Além disso, o esquema destaca a possível influência de actividades humanas, como a produção de amónia, matéria orgânica e emissões, que podem afectar a biodisponibilidade do ferro nos sistemas aquáticos.

2.1.2. Factores que influenciam a absorção do ferro

Embora o ferro seja abundante na crosta terrestre, a sua biodisponibilidade para absorção pelo corpo humano é limitada, pois ele encontra-se predominantemente em formas insolúveis e

pouco absorvíveis. Além disso, a absorção do ferro dietético é um processo regulado e influenciado por diversos factores, o que explica a dificuldade em obter quantidades adequadas desse mineral essencial apenas por meio da dieta (Hurrell & Egli, 2010)

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos de absorção do ferro, ainda existem lacunas no conhecimento sobre como ocorre a biodisponibilidade desse mineral em dietas mistas, nas quais são consumidos diversos alimentos em diferentes proporções durante as refeições (Teucher, 2004). Os inibidores e estimuladores da absorção de ferro são definidos como compostos presentes nos alimentos que interferem positiva ou negativamente na biodisponibilidade do ferro não-heme (forma de ferro presente nos alimentos na forma de sais inorgânicos, como a ferritina) proveniente do conjunto de ferro presente na cavidade interior do trato gastrointestinal, especificamente no estômago e intestino delgado (Hurrell, 2020).

De acordo com Teucher *et al.*, (2004), a biodisponibilidade desse mineral a partir de refeições mistas é influenciada por uma complexa interacção entre diversos componentes dos alimentos. Alguns dos principais factores que afectam a absorção do ferro não-heme incluem: ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, fitatos, proteínas e cálcio, entre outros.

Hurrell (2020) ressalta que a presença de ácido ascórbico e outros compostos redutores, como o ácido cítrico, pode aumentar significativamente a absorção de ferro não-heme. Por outro lado, fitatos e polifenóis, encontrados em cereais integrais, leguminosas e bebidas como chá e café, têm um efeito inibitório sobre a biodisponibilidade do ferro.

2.1.3. Ingestão recomendada do ferro

DRI (*Dietary Reference Intakes*) ou simplesmente Ingestão Dietética de Referência são valores mais recentemente revistos de recomendação de nutrientes e energia adoptados pelos Estados Unidos e Canadá e estes vêm sendo publicados desde o ano 1997. Estes resultam da parceria feita pelo comité de especialistas organizados, Instituto de Medicina Norte Americano e agência de Saúde do Canadá, onde a actualização conta com 4 categorias a saber:

- **EAR** (*Estimated Average Requirement*) que significa, em português, Requisito Médio Estimado: valor de referência correspondente à mediana da distribuição das necessidades de um nutriente em um grupo de indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida, atendendo às necessidades de 50% da população;
- **RDA** (*Recommended Dietary Allowances*) que quer dizer, em português, Doses Diárias Recomendadas: deriva da primeira categoria, devendo esta atender a 97 a 98% dos indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida;

- **AI** (*Adequate Intake*) que em português significa, Ingestão Adequada: refere-se ao valor recomendável de consumo com base nos levantamentos, quando a RDA não se pode estimar; e por fim
- **TUL** (*Tolerable Upper Level*) que quer dizer em português, Limite Máximo de Ingestão Tolerável.

A Tabela 1 indica os valores de referência do ferro que pode ser ingerido nos diferentes ciclos de vida.

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

Tabela 1: Recomendações dietéticas do ferro

Ciclos de vida	TUL (mg de Fe/dia)	EAR (mg de Fe/dia)	RDA/AI* (mg de Fe/dia)
Lactentes			
0 a 6 meses	40	ND	0,27*
7 a 12 meses	40	6,9	11
Crianças			
1 a 3 anos	40	3	7
4 a 8 anos	40	4,1	10
Mulheres			
9 a 13 anos	40	5,7	8
14 a 18 anos	45	7,9	15
19 a 30 anos	45	8,1	18
31 a 50 anos	45	8,1	18
51 a 70 anos	45	5	8
>70 anos	45	5	8
Gestantes			
<18 anos	45	23	27
19 a 30 anos	45	22	27
31 a 50 anos	45	22	27
Homens			
9 a 13 anos	40	7	8
14 a 18 anos	45	6,5	11
>19 anos	45	6,5	8

Fonte: (Bortoline & Fiesberg, 2010)

2.2. Fortificação alimentar

A fortificação de alimentos é definida como a adição intencional de micronutrientes (vitaminas e minerais) a determinados produtos alimentícios, independentemente da sua presença natural, dentro de parâmetros legalmente estabelecidos. O seu objectivo é aumentar o valor nutricional dos alimentos ou corrigir prováveis deficiências nutricionais em grupos populacionais específicos ou na população em geral (Vellozo & Fiesberg, 2010)

A iodização do sal foi a primeira estratégia de fortificação adoptada, inicialmente nos países europeus, com o intuito de mitigar a deficiência de iodo (Marques *et al.*, 2012). Em Moçambique, a fortificação de alimentos foi adoptada mais tarde, em 2013, com o lançamento do Programa Nacional de Fortificação de Alimentos. Esse programa tinha como objectivos principais reduzir a deficiência alimentar e combater a desnutrição crónica na população, assim como os programas pioneiros de fortificação adoptados anteriormente em outros países.

No entanto, a obrigatoriedade da fortificação de determinados alimentos em Moçambique foi estabelecida apenas em 2016, com a aprovação do Decreto 9/2016, de 18 de Abril. Esse decreto determinou a fortificação obrigatória do sal com iodo, do óleo alimentar com vitamina A, e das farinhas de milho e trigo com ferro (Chamuço, 2017).

A fortificação de alimentos tem-se mostrado uma estratégia eficaz, simples e economicamente viável para fornecer nutrientes essenciais a grandes segmentos da população, sem exigir mudanças significativas nos hábitos alimentares. Essa abordagem é particularmente relevante em países em desenvolvimento, onde a deficiência de micronutrientes é um problema recorrente.

2.2.1. Fonte de ferro para fortificação

A selecção das fontes de ferro para a fortificação de alimentos é uma etapa crucial nos programas de fortificação. As fontes escolhidas devem ser compostos inertes, pouco absorvidos, com alta biodisponibilidade, e adequados aos alimentos a serem fortificados, garantindo a eficácia do processo.

No entanto, as formas biodisponíveis de ferro são quimicamente reactivas e podem criar efeitos indesejados quando adicionadas aos alimentos, tornando a fortificação com ferro uma técnica desafiadora (Hurrell & Egli, 2010).

Segundo Hurrell & Egli (2010), as várias fontes de ferro disponíveis apresentam limitações, por isso a selecção adequada é fundamental. O composto escolhido deve ser discreto, bem absorvido e não influenciar a estabilidade de outros nutrientes. Entre os compostos mais utilizados para fortificação estão o sulfato ferroso, gluconato ferroso, fumarato ferroso,

pirofosfato férrico, ácido etilenodiaminotetracético de ferro sódico (NaFeEDTA), bisglicinato ferroso e pós de ferro alimentar.

A biodisponibilidade do sulfato ferroso é influenciada pelos mesmos factores que afectam o ferro presente no alimento fortificado, como componentes inibidores e potenciadores, além do estado fisiológico do consumidor. Por isso, a sua absorção ocorre na mesma proporção que o ferro do próprio alimento (Hurrel, 2020).

Para os outros compostos, a extensão em que se dissolvem no fluido gástrico rege a absorção relativa do ferro. O gluconato ferroso é solúvel tanto em água quanto no fluido gástrico. Já o fumarato ferroso (composto indicado pela legislação nacional para fortificação) embora não muito solúvel em água, dissolve-se completamente no ácido diluído do suco gástrico, apresentando biodisponibilidade semelhante à do sulfato ferroso (Hurrel, 2020).

A escolha adequada da fonte de ferro é fundamental para garantir a eficácia da fortificação, levando em consideração a biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade e compatibilidade com o alimento a ser enriquecido.

2.2.2. Veículos para fortificação com ferro

A identificação do veículo de transporte adequado é imprescindível uma vez que o alimento pode interferir directamente na biodisponibilidade do ferro (Zancul, 2004).

Um alimento veiculador adequado é aquele cujo processamento é centralizado, viável à fortificação em termos tecnológicos e económicos, que não sofra alterações físicas como o sabor, a textura e a aparência; que seja um alimento habitualmente consumido pela população-alvo e disponível através de um sistema efectivo de distribuição (Zancul, 2004).

Os cereais são a principal fonte de energia e outros nutrientes para a maioria das sociedades em todo o mundo. O trigo, o milho e o arroz representam as culturas de cereais mais importantes, respondendo por 94% do consumo total de cereais em todo o mundo. O milho, por exemplo, é cultivado na maior parte do mundo, pois é uma cultura fácil de produzir, uma vez que é capaz de crescer em diversos climas.

Em 2012, a produção mundial total de milho foi superior a 875 milhões de toneladas, com os Estados Unidos da América, Brasil e China produzindo a grande maioria do volume total. Actualmente, cerca de 55% do consumo mundial de grãos grosseiros é destinado à alimentação animal, mas em muitos países, principalmente na África Subsaariana e na América Latina, eles são utilizados directamente para consumo humano (WHO, 2006).

2.2.2.1. Farinha de milho

O milho possui uma ampla gama de nutrientes, e é um cereal bastante consumido nos países em desenvolvimento, sendo matéria-prima para vários ramos da indústria. Na alimentação humana, o milho é consumido sob diversas formas, como por exemplo bolo de milho, papas (instantâneas) e outros produtos industrializados. Os produtos de milho como a farinha, farelo, amido por exemplo, são também usados na preparação de outros alimentos, e ainda na indústria de panificação como ingrediente, em molhos e sopas, e o farelo é usado como fonte de fibras dietéticas (Giacomelli *et al.*, 2012).

A farinha de milho é obtida a partir da moagem industrial dos grãos de milho, cujo objectivo da moagem é a quebra do grão, retirada do endosperma e reduzi-lo.

2.2.2.2. Farinha de trigo

A farinha de trigo é o principal produto obtido pelo beneficiamento do grão do trigo, sendo obtida pela moagem exclusiva do grão *Triticum vulgare*. Esta é a segunda cultura mais produzida no mundo depois do milho. A farinha obtida pela moagem dos grãos de trigo é amplamente consumida tanto pelo homem, quanto pelos animais, devendo por esta razão, garantir que se processe em condições sanitárias adequadas para a saúde humana (Nievisnki, 2009).

Esta farinha é amplamente usada como ingrediente principal na preparação de diversos alimentos, como o pão na indústria panificadora, para produção de massas, bolos e outras sobremesas, bolachas, sopas, e ainda na produção de comida para bebés. A Figura 3 mostra um fluxograma geral do processamento tanto do milho quanto do trigo, onde se pode perceber que a fortificação é uma das últimas fases do processo. Este processo é apenas um esboço geral do processamento das farinhas, sendo que este pode variar entre indústrias e de acordo com o método e resultado desejado.

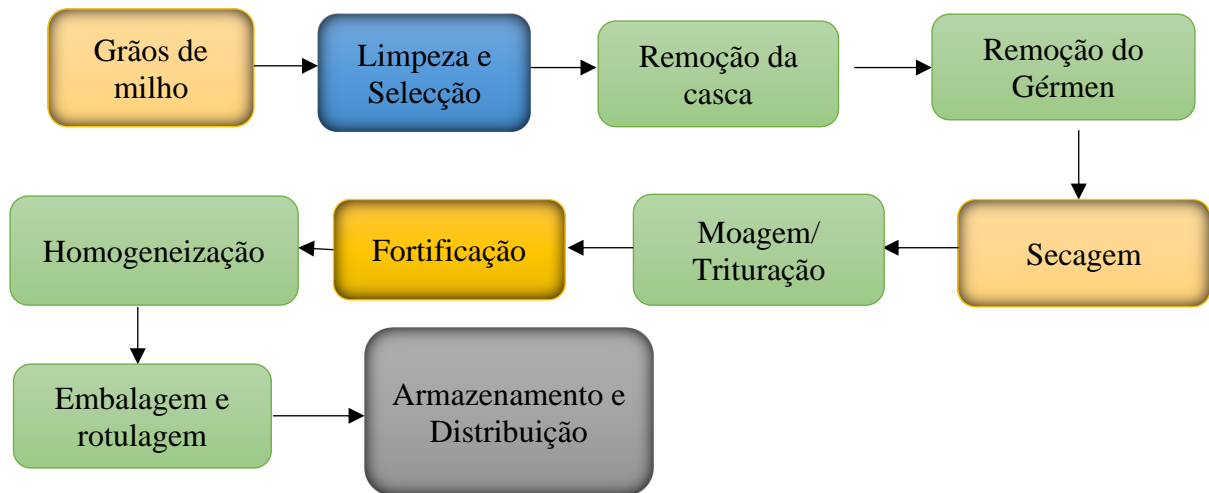


Figura 3: Fluxograma geral de processamento industrial do milho

Fonte: (Cardoso *et al.*, 2011)

2.3.Métodos analíticos

2.3.1. Espectrofotometria de absorção molecular na região UV-vis (EAM)

A espectrofotometria de absorção molecular na região ultravioleta-visível (UV-vis) é uma técnica analítica amplamente utilizada em análises químicas, fazendo parte das técnicas que envolvem a interacção entre a matéria e a energia radiante. A região UV-vis abrange o intervalo de comprimentos de onda de 185 a 700 nm, sendo subdividida em região ultravioleta próxima (185-400 nm) e região visível (400-700 nm) (Skoog *et al.*, 2017).

A espectrofotometria UV-vis baseia-se na medição directa da luz absorvida por espécies químicas moleculares que possuem grupos cromóforos relevantes, geralmente em solução. A partir do espectro de absorção obtido, podem ser deduzidas informações estruturais e composicionais do analito. A energia da radiação UV ou visível absorvida envolve transições electrónicas distintas, resultando em processos moleculares diferentes (Skoog, *et al.*, 2017).

Embora forneça pouca informação estrutural detalhada, a espectrofotometria UV-vis é amplamente utilizada em análises químicas quantitativas. A concentração do analito pode ser determinada pela medição da absorvância em um comprimento de onda específico, seguida da aplicação da lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação linear entre a absorvância e a concentração da espécie absorvente (Skoog *et al.*, 2017).

2.3.2. Espectrofotometria de Absorção Atómica (AAS)

A espectrofotometria de absorção atómica é uma técnica analítica utilizada para determinar a concentração de elementos metálicos em uma amostra. Baseia-se na medição da absorção de

radiação óptica por átomos gasosos livres. O princípio fundamental é que átomos livres conseguem absorver radiação em comprimentos de onda específicos, que são característicos para cada elemento. A quantidade de radiação absorvida é proporcional à concentração do analito na amostra (Skoog *et al.*, 2017).

A AAS é amplamente utilizada para análises quantitativas de elementos metálicos em diversas matrizes, como: alimentos e bebidas (farinhas, cereais, vinhos, etc.) amostras ambientais (água, solo, sedimentos) amostras biológicas (sangue, urina, tecidos) materiais geológicos e minerais (Welz & Sperling, 2008). A determinação da concentração neste método também é feita com base na lei de Lambert-Beer, tal como na EAM.

A espectrofotometria de absorção atómica por chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), técnica usada para determinar o ferro neste trabalho, é uma das técnicas mais comuns e amplamente utilizadas da AAS, apesar de apresentar limites de detecção mais elevados em comparação com outras técnicas de AAS. Neste método, a atomização dos elementos ocorre em uma chama de ar-acetileno, óxido nitroso-acetileno, chama de ar-butano, chama de ar - gás natural ou chama de ar-álcool (Pereira *et al.*, 2021).

2.3.2.1. Lei de Lambert-Beer

Segundo Pavia *et al.*, (s.d.), a lei de Lambert-Beer estabelece a relação entre a absorção da radiação electromagnética por uma amostra e a concentração da espécie absorvente presente, e pode ser expressa da seguinte forma:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b C \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

A - Corresponde à absorvância (grandeza adimensional)

T- Corresponde à transmitância (grandeza adimensional)

P₀ e P – Correspondem respectivamente às potências da radiação incidida e transmitida (w ou w/m²)

ε – Corresponde ao coeficiente de absorptividade molar (L*^{mol}⁻¹*cm⁻¹)

b – Corresponde ao caminho óptico (cm)

A absorção da radiação electromagnética na região UV-Vis de maior comprimento de onda restringe-se a um número limitado de grupos cromóforos, os quais contêm electrões de valência com energia de excitação relativamente baixas. Os electrões π, σ e n são os que contribuem para essa absorção em moléculas orgânicas, e estes, por sua vez, estão envolvidos nas seguintes transições electrónicas: σ→σ*, n→σ*, n→π* e π→π*.

Na estrutura do 2,2'-bipiridina, a absorção da radiação electromagnética ocorre devido às transições electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$, que envolvem a promoção de electrões π dos orbitais moleculares ligantes π para os orbitais antiligantes π^* vazios, e $n \rightarrow \pi^*$ que envolvem a promoção de electrões não-ligantes (n) dos átomos de nitrogénio para os orbitais moleculares antiligantes π^* vazios.

2.4. Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é uma das etapas mais importantes no trabalho científico, pois verifica a adequabilidade do método analítico aplicado. Nesta etapa, são analisados diversos parâmetros, como sensibilidade, selectividade, precisão, exactidão, linearidade, limites de detecção e quantificação, robustez e repetibilidade. A validação tem como objectivo garantir que o método escolhido seja confiável e adequado para os objectivos do trabalho. Durante a validação, avalia-se se o método pode efectivamente identificar e quantificar os analitos de interesse nas condições especificadas. Além disso, são estabelecidos critérios de aceitabilidade para garantir que o método seja consistente e reproduzível (Skoog *et al.*, 2017). Neste subcapítulo definir e descrever-se-ão diferentes figuras de mérito atinentes à validação do método.

2.4.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico expressa a capacidade do mesmo em obter resultados que são directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo de concentrações. A avaliação da linearidade é realizada por meio da análise de, no mínimo, 5 níveis de concentração de padrões, em triplicado, cobrindo uma faixa de 50% a 150% da concentração esperada do analito na amostra alvo (Ribani, 2004).

Embora o coeficiente de determinação (R^2) seja comumente utilizado como critério para avaliar a linearidade, com um valor aceitável de 0,998 ou superior, esse parâmetro isoladamente não garante a linearidade do método. Portanto, é recomendado que, principalmente para valores de R^2 inferiores a 0,998, seja realizado um teste estatístico adicional, como o teste *t Student*, para verificar se os desvios da linearidade são ou não significativos. Para este efeito pode-se usar a equação seguinte:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Equação 2})$$

A linearidade é considerada, por Cohen & Cohen, 2008, satisfatória quando se obedece à condição seguinte: $t_{cal} > t_{crit}$, onde $t_{crit} = (2T; \alpha=0.05; v = n-2)$.

2.4.2. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade pela qual um determinado método analítico ou instrumento distingue, em um determinado intervalo de confiança, duas concentrações próximas. Na regressão linear, a sensibilidade determina-se pelo declive da curva de calibração «b», tal como é apresentado na equação que se segue (Skoog *et al.*, 2017):

$$y = bx + a \quad \text{(Equação 3)}$$

onde:

y - é o sinal dado pelo instrumento (absorvância)

b - é o declive da curva de calibração

x - é a concentração do analito (em mg/L)

a - é a intersecção.

Para a avaliação de um método que envolve regressão linear propõe-se o uso do teste de hipóteses *t-student*, o qual compara o valor do declive «b» com o valor da literatura « $\beta=0,95$ », tal como mostra a equação:

$$t_{cal} = \frac{|b-\beta|}{s_b} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde s_b corresponde ao desvio padrão do declive.

Para que a sensibilidade seja satisfatória, deve-se cumprir a seguinte condição: $t_{cal} < t_{crit}$, onde $t_{crit} = (2T; \alpha = 0,05; v = n - 2)$.

2.4.3. Selectividade

A selectividade de um método analítico é a capacidade deste em determinar o analito de interesse de forma inequívoca na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz. O efeito da matriz pode ser positivo, quando houver espécies que absorvem a radiação na mesma região do espectro, ou negativo, quando o analito reage com um dos componentes da matriz para formar um composto que absorve a radiação numa região do espectro diferente. Desta forma, este parâmetro é avaliado pela comparação do sinal instrumental do analito matrizado com o sinal obtido do analito de um solvente puro (Skoog *et al.*, 2017).

2.4.4. Precisão

Grau de concordância entre medidas individuais realizadas de uma amostra homogénea, através de análises repetidas nas mesmas condições. A avaliação deste parâmetro pode ser realizada a diferentes níveis tais como: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade,

porém, em todos os casos este é avaliado pelo coeficiente de variação (CV) ou percentagem do desvio padrão relativo, tal como elucida a equação abaixo (Rocha & Oliveira, 2021):

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média da concentração experimental do ferro}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

❖ Repetibilidade

É a capacidade de o método gerar os mesmos resultados em um curto intervalo de tempo e em condições idênticas de análise. A repetibilidade é também referida como precisão intra ensaio, e pode ser avaliada em um mínimo de seis determinações na concentração adoptada para o ensaio.

2.4.5. Exactidão

A exactidão indica a proximidade entre o valor obtido experimentalmente e um valor tido como verdadeiro. Expressa-se em termos de erro relativo (Er) ou absoluto (E) de acordo com a equação seguinte:

$$E = X_i - X_v \quad (\text{Equação 6})$$

$$E = \frac{X_i - X_v}{X_v} * 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

onde:

X_i é o valor observado;

X_v é o valor tido como verdadeiro

Outro método que pode ser usado para avaliar este parâmetro consiste na comparação do valor experimental com o resultado obtido por um método considerado de referência, pelo emprego do teste de hipóteses *t-student* dado pela equação 8

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - x_v}{s} x \sqrt{n} \quad (\text{Equação 8})$$

Este método considera-se satisfatório quando obedece à condição seguinte: $t_{cal} < t_{crit}$.

onde: $t_{crit} = (2T, \alpha = 0,05, v = n - 1)$ (Skoog *et al.*, 2017)

Para se determinar este parâmetro são apresentadas estas três propostas:

- Análise de um material de referência certificado;
- Comparação com resultados obtidos de outro método certificado como exacto;
- Estudos de recuperação do analito.

2.4.6. Limite de detecção

Menor concentração de um analito numa determinada amostra que pode ser detectada, mas que não se possa necessariamente quantificar. Determina-se experimentalmente pelas análises

repetidas do branco, de preferência em um longo período. Deste modo, os dados são estatisticamente analisados, com o objectivo de se obter a média das absorvâncias do branco ($\overline{S_{br}}$) e o seu desvio padrão. Matematicamente o limite de detecção pode ser expresso da seguinte forma (FDA, 2019):

$$LD = \overline{S_{br}} + k * S_{br} \quad \text{(Equação 9)}$$

onde o «k» é um factor que frequentemente assume o valor de 3, correspondendo a um nível de confiança de aproximadamente 99,7% de que o sinal analítico detectado é significativamente diferente do ruído de fundo.

2.4.7. Limite de quantificação

Define-se como sendo a concentração mais baixa de um analito em uma determinada amostra, que pode ser quantificada com exactidão e precisão aceitáveis nas condições operacionais declaradas do método. Igualmente ao limite de detecção, o limite de quantificação é determinado a partir da média do desvio padrão dos sinais obtidos a partir de repetições do branco, como mostra a equação seguinte:

$$LQ = \overline{S_{br}} + k * S_{br} \quad \text{(Equação 10)}$$

onde o «k» é uma constante igual a 10, que corresponde a um nível de confiança de 99,9% de que o analito pode ser quantificado com uma precisão aceit.

2.4.8. Robustez

A robustez de um método analítico refere-se à sua capacidade de resistir a pequenas variações deliberadas nos parâmetros do procedimento, fornecendo resultados consistentes dentro de um intervalo aceitável. A avaliação da robustez é realizada por meio da introdução intencional de alterações nos parâmetros críticos do método, como temperatura, pH, composição da fase móvel, entre outros. Um método robusto é capaz de tolerar essas pequenas variações sem comprometer significativamente a sua precisão, exactidão e selectividade, demonstrando confiabilidade e reprodutibilidade durante o uso rotineiro (FDA, 2019).

3. Capítulo III: PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais, Equipamentos e Reagentes

Neste subcapítulo serão apresentados os materiais (Tabela 2), reagentes (Tabela 4) e equipamentos usados (Tabela 3) desde a amostragem até aos ensaios laboratoriais.

3.1.1. Materiais e Equipamentos

Tabela 2. Materiais

Materiais	Volume
Cadinhos de porcelana	
Almofariz e pistilo	
Peneira	Granulometria – 0,5 mm
Pipetas automáticas	1, 2, 5 e 10 mL
Balões volumétricos	25, 50, 100 e 500 mL
Copos de Becker	50, 100 e 500mL
Vareta de vidro	
Pinça metálica	
Espátula	
Funil de vidro	
Cuvetes de vidro	b=1cm
Saco de amostra	

Tabela 3. Equipamentos

Equipamentos	Marca/Fabricante
Mufla	CARBOLITE-GERO; Temperatura: 30-3000°C
Estufa	SCIENTIFIC-SERIES 9000
Destilador	J. P. SELECTA
Placa de aquecimento e agitador magnético	VELP SCIENTIFICA; Tmax:400°C
Balança analítica	METTLER-PM1200; Pmax: 250g; precisão: 1mg
Espectrofotómetro UV-Vis	SPECTRONIC GENESYS 5
Espectrofotómetro de absorção atómica com chama	Perkin Elmer AAnalyst 200

3.1.2. Reagentes

Os reagentes usados durante as análises laboratoriais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Reagentes usados nas análises laboratoriais

Nome do reagente	Fórmula química	Pureza (%)	Marca/ Fornecedor
Ácido nítrico	HNO ₃	65,00	PRONALAB
Ácido clorídrico	HCl	30,00	MERCK
Cloridrato de hidroxilamina	H ₂ NO _x HCl	---	Minema Chemicals

Nome do reagente	Fórmula química	Pureza (%)	Marca/ Fornecedor
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	99,70	AMRESCO
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	99,50	Sigma-Aldrich
2,2'-bipiridina	C ₁₀ H ₈ N ₂	---	MERCK
Padrão de ferro – Nitrato de ferro (III)	Fe (NO ₃) ₃	99,9	PerkinElmer Pure
Água desionizada	---	---	Purificador de Água Barnstead Smart2Pure

3.2.Amostragem

Para este trabalho, foram colhidas um total de 12 amostras de farinha, sendo 5 de farinha de trigo fortificadas e 7 de farinha de milho fortificadas em cinco lugares diferentes na cidade de Maputo, apresentados na Tabela 5 e Figura 4 a saber: Mercado grossista do Zimpeto, Super Mercado Shoprite do Zimpeto, Super Mercado Shoprite da Praça da Paz e Padaria Guebo e ainda se colheu uma amostra de farinha de milho não fortificada (obtida através da moagem do milho em uma moageira que presta serviço de moagem para consumo familiar). Importa referir que das amostras colhidas no supermercado Shoprite da Praça da Paz e no Mercado Grossista do Zimpeto, uma de cada era de marca internacional, uma vez que a fortificação é obrigatória para produtos industrialmente processados a nível nacional e para produtos importados.

As amostras colhidas na padaria e a não fortificada foram colocadas em sacos plásticos devidamente rotulados e logo de seguida foram encaminhados ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane, onde foram colocadas em um local limpo, seco e fresco até à data das análises. Com a excepção das amostras colhidas na padaria e a de milho não fortificada, colheram-se apenas pacotes de farinha de trigo e farinha de milho de 1kg.

Tabela 5. Quantidade e data da colheita das amostras em cada local da amostragem

Local de amostragem	Número de Amostras	Data
Mercado Grossista do Zimpeto	4	03/09/2022
Shoprite do Zimpeto	1	30/08/2022
Shoprite da P. da paz	5	29/08/2022
Padaria Guebo	1	05/09/2022
Moageira caseira	1	05/09/2022

As localizações geográficas dos pontos de amostragem são apresentadas no mapa da Figura 4.

Avaliação da Conformidade com as Diretrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

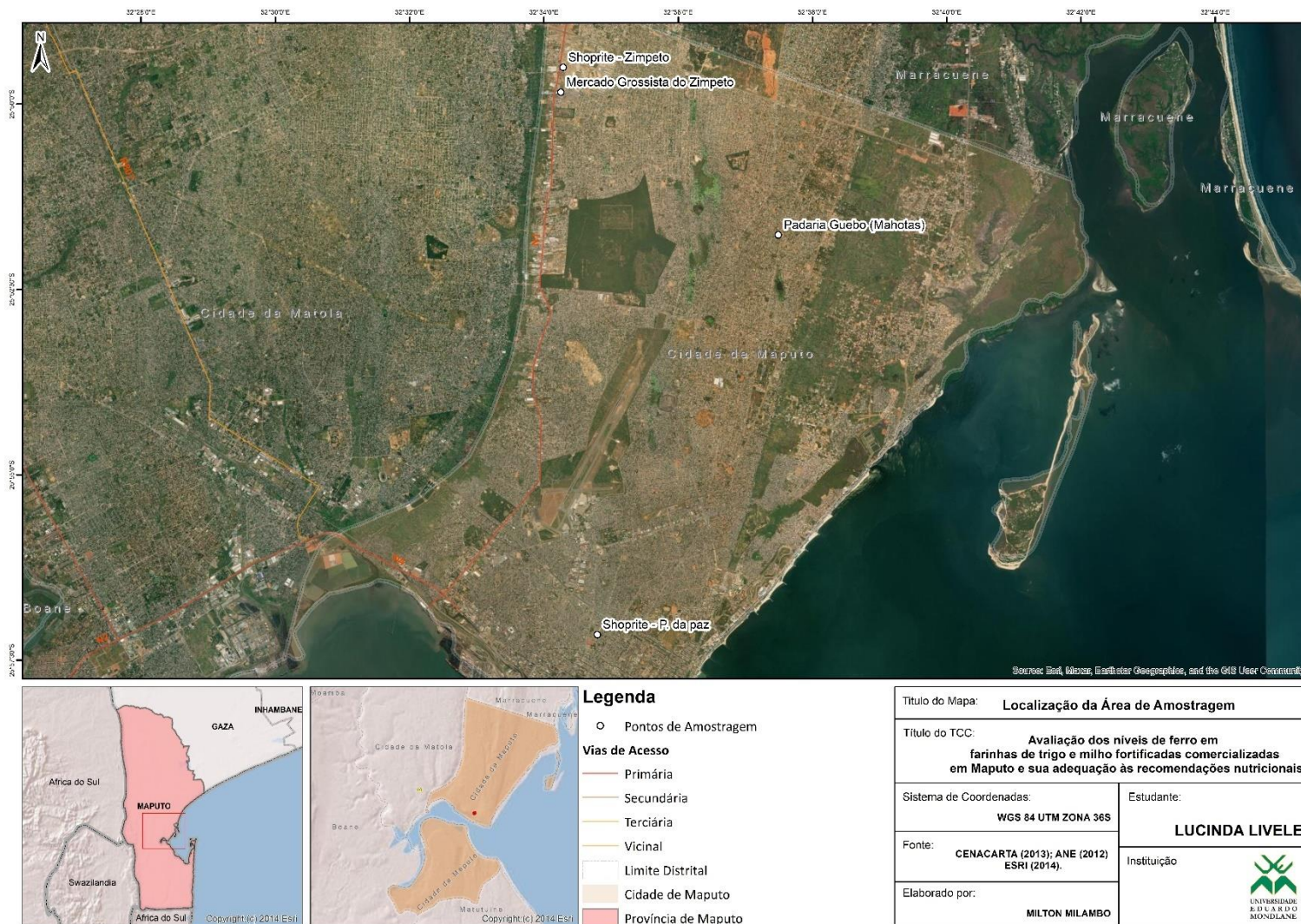


Figura 4. Mapa de localização das áreas de amostragem

3.3.Procedimentos Experimentais

3.3.1. Lavagem do material

Toda a vidraria foi primeiramente lavada com água corrente e detergente, de seguida colocada em uma solução de ácido nítrico e água destilada 1:1 durante 12 horas. De seguida, a vidraria foi lavada com água desionizada e por fim colocada a secar, para posterior uso nas análises laboratoriais. Os cadinhos, por sua vez, seguiram o mesmo processo de lavagem, porém, após a secura foram levados à estufa a 110°C durante uma hora e foram colocados no exsiccador durante 30 minutos e por fim pesados na balança analítica.

3.3.2. Validação da espectrofotometria de absorção molecular

Foram ao todo analisados oito parâmetros com vista a validar o método analítico de EAM, tendo sido empregue o 2,2'-bipiridina como agente cromógeno tal como é apresentado pelo procedimento abaixo indicado.

3.3.2.1.Análise de homogeneidade dentro da faixa de trabalho

Adoptou-se, para este trabalho, uma faixa de concentração que foi estatisticamente avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, com recurso a uma curva de calibração, como sugere um método no guia Relacre (2000). A curva de calibração definida, que se pode ver no anexo 3 EAM, é constituída por uma série de 8 padrões, tal como se pode visualizar na Figura 5, cujas concentrações de ferro são: 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg/L de ferro, tendo designado cada padrão como branco, P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆ e P₇..



Figura 5. Padrões usados para curva de calibração

Os padrões P₁ e P₇, ou seja, o primeiro e o último foram analisados em dez réplicas independentes e em 3 dias, comparados com um branco preparado nas mesmas condições. Tendo feito as leituras, formulou-se o teste estatístico com base nas equações 11 e 12,

antecedidas pelas respectivas hipóteses, H_0 e H_1 para hipótese nula e hipótese alternativa respectivamente.

Hipóteses

$H_0: s_1^2 = s_7^2$ (Não há diferença significativa entre as variâncias)

$H_1: s_1^2 \neq s_7^2$ (Há diferença significativa entre as variâncias)

onde: s_1^2 e s_7^2 são as variâncias associadas às absorvâncias dos padrões.

Teste estatístico

$$F_{cal} = \frac{S_7^2}{S_1^2} \quad (\text{Equação 11) se } S_7^2 > S_1^2$$

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_7^2} \quad (\text{Equação 12) se } S_7^2 < S_1^2$$

Compara-se o valor de F_{cal} com o valor tabelado de distribuição de *Fischer-Snedecor* ($F_{critico}$), para os graus de liberdade $n-1$ com nível de confiança de 95%. Desta forma, considerou-se a faixa de trabalho ajustada quando fosse aceite a condição $F_{calculado} \leq F_{critico}$.

➤ Preparação da curva de calibração

Para preparação da curva de calibração, pipetou-se alíquotas de 0,00; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00 e 50,00 mL da solução padrão que continha 10 mg/L de ferro para balões volumétricos de 100 mL devidamente rotulados e fez-se o volume com água destilada, obtendo-se desta forma 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L de ferro. Tomou-se 10 mL da solução padrão de ferro de cada balão volumétrico de 100 mL para balões de 25 mL, onde de seguida acrescentou-se 1 mL da solução de cloridrato de hidroxilamina a 10%, aguardando-se 5 minutos com vista a permitir a libertação do ferro; de seguida acrescentou-se 5 mL do tampão acetato a 2M e 5 gotas da solução de 2,2'-bipiridina a 0,1% para formação do complexo, tendo-se obtido soluções padrão com as seguintes concentrações de ferro: 0,08; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/L respectivamente. Aguardou-se 30 minutos e de seguida fez-se o volume com água desionizada, sob as condições da realização das análises.

Prosseguiu-se com a leitura das absorvâncias no espectrofotómetro (que foi previamente ligado 15 minutos antes) a um comprimento de 522 nm. Este valor foi adoptado pois correspondeu à maior absorção da radiação electromagnética no espectro do complexo tris (2,2'-bipiridina) ferro (II).

3.3.2.2. Linearidade

A linearidade avaliou-se a partir da curva de calibração, com recurso ao teste de hipóteses *t-student* de acordo com o método sugerido por Cohen & Cohen (2008) o qual se baseou na

formulação de hipóteses com as seguintes designações, para hipótese nula e hipótese alternativa, H_0 e H_1 respectivamente. O respectivo teste estatístico está apresentado na equação 2.

Hipóteses

H_0 : Não há correlação entre x e y;

H_1 : Há correlação entre x e y.

Para a realização do teste de linearidade, primeiramente determinou-se os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (r) associados às medidas de absorção realizadas para a determinação da curva de calibração com auxílio do *Microsoft Office Excel* 2016.

O critério de aceitação usado neste teste foi $t_{cal} > t_{crit}$, onde $t_{crit} = (2T, \alpha=0.05; v = n-2)$.

3.3.2.3.Sensibilidade

Este parâmetro foi analiticamente determinado pela curva de calibração e para avaliá-lo realizou-se o teste de hipóteses *t-student* que consistiu basicamente na comparação do declive da curva de calibração do ferro com o valor ($\beta = 0.95$) (Cohen & Cohen, 2008).

Para a realização do teste estatístico acima descrito, seguiu-se o procedimento da formulação da hipótese nula H_0 e hipótese alternativa H_1 , seguida da apresentação do respectivo teste representado pela equação 4.

Hipóteses

H_0 : $b = \beta$ (o declive não é significativamente diferente do valor de referência)

H_1 : $b \neq \beta$ (o declive é significativamente diferente do valor de referência)

A sensibilidade considerou-se satisfatória quando se verificasse a seguinte condição: $t_{cal} < t_{crit}$, onde: $t_{crit} = (2T, \alpha=0.05; v = n-2)$.

3.3.2.4.Selectividade

A selectividade foi avaliada pela comparação do valor de concentração do analito em uma solução de solvente puro-água com a concentração do analito adicionado a uma amostra de farinha de milho não fortificada contendo quantidade significativa de ferro. O estudo foi realizado em três níveis de concentração correspondentes a 20, 35 e 70 mg/kg de ferro. Deste modo, as médias dos valores obtidos foram estatisticamente comparadas pelo teste estatístico *t-student*, antecedidas pelas respectivas hipóteses: H_0 para a hipótese nula e H_1 para a hipótese alternativa.

Hipóteses

$H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ (Não há diferença significativa entre as duas médias)

$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$ (Há diferença significativa entre as duas médias)

Para realizar este teste, primeiro foi realizado o teste de *Fischer-Snedecor* de acordo com as equações 11 e 12, por forma a seleccionar o teste estatístico *t-student* correcto.

Teste estatístico

- **Caso I:** $s_1^2 = s_2^2$

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}} \quad (\text{Equação 13}) \text{ e } t_{crit} = (2T; p = 0.05; \nu = n_1 + n_2 - 2)$$

onde:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (\text{Equação 14})$$

- **Caso II:** $s_1^2 \neq s_2^2$

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Equação 15}) \text{ e } \nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} C \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{(s_2^2)^4}{n_2^2(n_2 - 1)}} \quad (\text{Equação 16})$$

$$t_{crit} = (2T; p = 0.05)$$

onde:

\bar{x}_1 e \bar{x}_2 – Correspondem às médias das concentrações de ferro obtidas na amostra matrizada e não matrizada respectivamente;

s_1^2 e s_2^2 – Correspondem às variâncias associadas às concentrações do ferro na amostra matrizada e não matrizada respectivamente;

n_1 e n_2 – Correspondem às réplicas da determinação do ferro na amostra matrizada e não matrizada respectivamente.

A selectividade foi considerada satisfatória quando fosse obedecida a condição $t_{cal} < t_{crit}$, ou seja, quando fosse aceite a hipótese nula.

As soluções das amostras foram preparadas acrescentando uma quantidade de padrão de ferro com concentração conhecida à solução da amostra não fortificada que contém naturalmente 20 mg/kg, para que se obtivesse soluções com os três níveis de concentração (20; 35 e 70 mg/kg).

3.3.2.5. Precisão

A precisão do método analítico foi determinada através do coeficiente de variação (CV), obtido pela equação 5 a partir das medidas das concentrações de ferro em seis réplicas das amostras

de farinha fortificadas com ferro em três níveis de concentração correspondentes a 20, 35 e 70 mg/kg, conforme sugerido por Ermer & Nethercote (2015). Essas medidas foram experimentalmente realizadas pelo método empregado na secção anterior, contudo, empregou-se a equação 17 com o objectivo de obter os valores das concentrações em mg/kg.

$$C_{mg/kg} = \frac{c^{(mg/L)} * V_{bal\tilde{a}o(L)} * f d * 1000}{m_{amostra}} \quad \text{(Equação 17)}$$

Este parâmetro foi avaliado em um nível que corresponde à repetibilidade, a qual foi avaliada a partir dos valores de concentração do ferro determinados no mesmo dia, sob as mesmas condições de análise.

3.3.2.6.Exactidão

Para a avaliação deste parâmetro seguiu-se o método proposto por Skoog *et al.* (2017) que propõe a comparação do valor médio da concentração (\bar{x}) do ferro experimental, com o valor tido como verdadeiro (x_v) pelo método de referência em cada nível de concentração. Para que se efectuasse tal comparação, realizou-se o teste estatístico *t-student*, nos termos da equação 8, tendo antes formulado as hipóteses com as designações H_0 e H_1 para a hipótese nula e alternativa respectivamente, tal como é apresentado abaixo:

$H_0: \bar{x} = x_v$ (não há diferença significativa entre a média e o valor verdadeiro)

$H_1: \bar{x} \neq x_v$ (há diferença significativa entre a média e o valor verdadeiro)

A exactidão é considerada satisfatória quando for obedecida a condição seguinte:

$$t_{cal} < t_{crit} \text{ onde: } t_{crit} = (2T; \alpha = 0.05; v = n - 2)$$

Para a determinação da concentração do ferro pelo método de referência usou-se o método em vigor no Laboratório Nacional de Higiene de Águas e Alimentos (LNHAA) para a determinação de ferro em alimentos fortificados (EAM), que consiste em:

❖ Digestão da amostra

Para iniciar, os cadinhos de porcelana foram calcinados a 110°C por 1 hora e depois arrefecidos em exsiccador por 30 minutos. Pesaram-se 6 gramas de farinha de milho e de trigo, ambas em duplicado. As amostras foram carbonizadas até as cinzas começarem a esbranquiçar. Então, foram calcinadas a 550°C na mufla até ficarem totalmente brancas. De seguida, adicionaram-se 40 mL de HCl 4M às cinzas em cada cadinho, agitou-se com vareta de vidro e transferiu-se para copo de precipitação. Os cadinhos foram lavados com 60 mL de água destilada em 3 porções, juntando ao copo. A solução evaporou a baixa temperatura por 20 minutos. Depois de

arrefecer, a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada. Destes balões, 10 mL de cada amostra foram transferidos para outros balões de 100 mL, rotulados conforme código do LNHHA acrescentando "D" para diluído.

❖ Preparação dos padrões e soluções

Para a preparação dos padrões para a curva de calibração, pipetou-se 5 mL da solução padrão stock contendo 0,2 mg de ferro/mL em uso no LNHHA para um balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume com água destilada. De seguida pipetou-se 1; 2; 3; 4 e 5 mL desta solução e colocou-se em balões volumétricos de 25 mL acrescentando-se alguns cristais de ácido ascórbico, agitou-se muito bem até que os cristais se dissolvessem por completo. Posto isto, adicionou-se 5 mL da solução tampão 4 %, 2 mL de α dipiridilo e fez-se o volume com água destilada obtendo-se soluções com as seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mg de ferro por 25 mL, tal como se pode verificar na Figura 6.



Figura 6. Padrões usados para curva de calibração no método de referência.

Para a preparação da solução das amostras seguiu-se todo o procedimento descrito para a preparação dos padrões, porém a quantidade tomada das soluções das amostras foi 10 mL da solução diluída. Leram-se as concentrações das soluções das amostras no mesmo comprimento de onda.

❖ **Leitura das absorvâncias dos padrões e soluções das amostras no espectrofotómetro**

Depois de muito bem agitadas, deixou-se repousar as soluções por 30 minutos e fez-se as leituras no espectrofotómetro no comprimento de onda de 515 nm, e fez-se a curva de calibração. A concentração fornecida pelo espectrofotómetro é dada em mg/25 mL de ferro.

Para a conversão, a fórmula usada é a seguir apresentada:

$$Fe \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{Fe \left(\frac{mg}{25ml} \right) * f * 100 * 4}{m} \quad (\text{Equação 18})$$

onde: f é o factor de diluição

m é a massa da amostra

3.3.2.7. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para a determinação destes dois parâmetros usando o método analítico teve-se como base a curva de calibração do ferro pelas equações 9 e 10. No que se refere à curva de calibração, fez-se anteriormente o cálculo do desvio padrão associado ao declive (s_b) da curva de calibração.

3.3.2.8. Robustez

A robustez do método analítico usado avaliou-se com base na variação de um parâmetro a saber: a estabilidade dos padrões usados para a construção da curva de calibração.

❖ **Estabilidade dos padrões**

No que diz respeito à avaliação da estabilidade dos padrões, foi determinada a concentração de ferro na amostra de farinha de milho fortificada, contendo 40 mg/kg de ferro, nos intervalos de 10, 30, 60, 120 e 180 minutos, em triplicado. A estabilidade foi avaliada pela comparação das concentrações de ferro obtidas nos cinco grupos de tempo, utilizando-se o teste estatístico de análise de variância com factor único (ANOVA unimodal). Desta forma, foi possível verificar se as diferenças observadas nas concentrações de ferro entre os grupos eram estatisticamente significativas ou decorrentes da variabilidade aleatória inerente ao processo de amostragem e análise.

Para realizar este teste foram formuladas antecipadamente as hipóteses, que foram designadas H_0 e H_1 para as hipóteses nula e alternativa, respectivamente.

Hipóteses

$$H_0 = s_{10}^2 = s_{30}^2 = s_{60}^2 = s_{120}^2 = s_{180}^2$$

$$H_1 \neq s_{10}^2 \neq s_{30}^2 \neq s_{60}^2 \neq s_{120}^2 \neq s_{180}^2$$

A estabilidade dos padrões foi julgada satisfatória quando se obedecesse a condição $F_{cal} < F_{crit}$.

3.3.3. Determinação do ferro nas farinhas de trigo e milho

Concluído o processo de validação do método, prosseguiu-se com a determinação do teor de ferro nas amostras de farinhas de milho e de trigo pelos métodos de EAM e FAAS, descritos a seguir. Para a determinação do ferro por estes métodos primeiro fez-se a digestão das amostras, preparação dos padrões e soluções e posteriormente a leitura das concentrações das mesmas no espectrofotómetro.

a) Digestão das amostras

- Para a digestão das amostras, pesou-se cerca de 100 g de cada farinha, moeu-se em um almofariz e pistilo e peneirou-se em uma peneira, cuja granulometria era 0,5 mm;
- Nos cadinhos de porcelana, pesou-se cerca de 5g da amostra previamente homogeneizada, em triplicado. Queimou-se as amostras na mufla, aquecendo-a gradualmente até 550°C, tendo-se deixado nessa temperatura por um período de seis horas (tempo necessário para obter as cinzas esbranquiçadas). Retirou-se da mufla e deixou-se arrefecer em um exsiccador.

b) Preparação das soluções das amostras

- Para a preparação das soluções das amostras de farinha de trigo e milho, humedeceu-se as cinzas com água desionizada e adicionou-se 1 mL de HNO₃.
- Aqueceu-se até à secura na placa aquecedora, dissolveu-se as cinzas utilizando o ácido clorídrico, e transferiu-se quantitativamente com água destilada e desionizada para balão volumétrico de 25 mL. Preparou-se as amostras em triplicado e um branco dos reagentes em paralelo.

c) Leitura no espectrofotómetro

- Para a leitura no espectrofotómetro preparou-se os padrões para a curva de calibração e as soluções das amostras seguindo o procedimento descrito no Anexo 2: Preparação de soluções, alínea e).

3.3.3.1. Comparação dos resultados obtidos por EAM e FAAS

Para a comparação dos resultados obtidos experimentalmente por espectrofotometria de absorção molecular e por espectrofotometria de absorção atómica, realizou-se o teste t – emparelhado o qual foi antecedido pelas hipóteses nula e alternativa.

H₀: Não existe diferença entre as médias dos resultados obtidos pelos métodos FAAS e EAM quando $\mu_d \neq 0$;

H₁: Existe diferença entre as médias dos resultados obtidos pelos métodos FAAS e EAM quando $\mu_d = 0$, onde μ_d é a diferença das médias das concentrações.

4. Capítulo IV: APRESENTAÇÃO, DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1. Apresentação dos resultados

Apresentar-se-ão neste subcapítulo, os resultados concernentes à validação do método analítico de EAM e do teor de ferro nas farinhas de trigo e milho pelos 3 métodos (EAM, método de referência em uso no LNHA e FAAS).

4.1.1. Resultados da validação do método analítico

Todos os parâmetros seleccionados e determinados para a validação do método analítico da EAM foram avaliados estatisticamente em um intervalo de confiança de 95%.

4.1.1.1. Análise de Homogeneidade dentro da faixa de trabalho

São apresentadas na Tabela 6 as médias das absorvâncias dos padrões 1 e 7, obtidas nos três dias em que foram lidas, as quais foram empregues para a determinação das variâncias usadas na realização do teste de *Fisher-Snedecor* com o intuito de avaliar a homogeneidade dentro da faixa de trabalho.

Tabela 6. Absorvâncias dos padrões P1 e P7 e das respectivas variâncias

Padrão	P1	P7
Absorvâncias	0,007	0,212
	0,005	0,212
	0,005	0,210
	0,007	0,214
	0,005	0,214
	0,003	0,214
	0,005	0,212
	0,005	0,210
	0,005	0,210
	0,005	0,212
Variâncias	$1,16 \cdot 10^{-6}$	$2,40 \cdot 10^{-6}$

Com os valores obtidos das variâncias na Tabela 6 fez-se o cálculo do valor do F_{cal} pela equação 12, obtendo-se 2,068. Comparativamente ao valor tabelado de F_{crit} disponível na distribuição de *Fisher-Snedecor* 4,28, o F_{cal} mostrou-se inferior a 95% do nível de confiança, indicando que não há evidência de falta de homogeneidade significativa dentro da faixa de trabalho avaliada.

4.1.1.2. Parâmetros avaliados a partir da regressão linear

Uma vez que a avaliação da faixa de trabalho segundo o teste de *Fischer-Snedecor* feito na secção 4.1.1.1 foi satisfatória, prosseguiu-se com a avaliação de outros parâmetros que dependiam da curva de calibração. Desta forma a curva de calibração definida está ilustrada na Figura 7, onde cada ponto é correspondente à média de três leituras das absorvâncias de cada padrão.

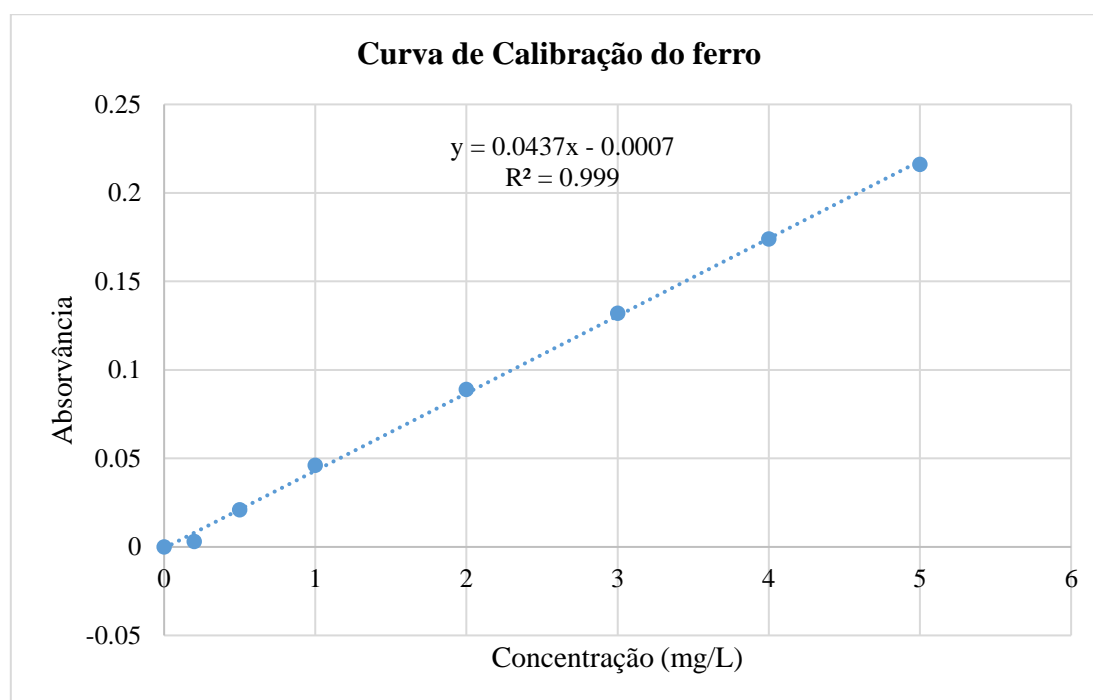


Figura 7.: Curva de Calibração do Ferro

Com a curva de calibração definida prosseguiu-se com o cálculo dos outros parâmetros a saber: selectividade, sensibilidade, linearidade, exactidão, precisão, LD, LQ. Antes da avaliação destes parâmetros prosseguiu-se com a determinação de alguns parâmetros da curva de calibração obtida, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros da curva de calibração de ferro

Parâmetro	Símbolo	Valor
Coefficiente de correlação	r	0,999
Coefficiente de determinação	R ²	0,999
Declive	b	0,044
Desvio padrão do declive	s _b	0,0005
Intersecção	a	-0,0007
Desvio padrão da intersecção	s _a	0,0009

Os resultados dos parâmetros para validação do método de espectrofotometria de absorção molecular anteriormente mencionados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da avaliação dos parâmetros de validação do método analítico (EAM)

Parâmetro	N.C (mg/kg)	Valor	CV (%)	t _{cal}	t _{crit}	Observação
Linearidade	---	---	---	83325	3,790	t _{cal} > t _{crit}
Sensibilidade	---	0,044	---	1675,231		t _{cal} > t _{crit}
Selectividade	20	---	---	0,157	2,776	t _{cal} < t _{cri}
	35	---	---	0,555		t _{cal} < t _{cri}
	70	---	---	0,046		t _{cal} < t _{cri}
Exactidão	20	---	---	2,061	4,303	t _{cal} < t _{cri}
	20	---	---	0,769		t _{cal} < t _{cri}
Repetibilidade	20	---	0,623	---	---	---
	35	---	0,920	---	---	---
	70	---	4,003	---	---	---
LQ	---	0,124	---	---	---	---
LD	---	0,037	---	---	---	---

onde: NC – Corresponde ao nível de concentração em que a análise foi feita

Na Tabela 9, são apresentadas as concentrações de ferro determinadas para a avaliação da exactidão. É importante mencionar que, para o método de referência, as análises foram realizadas em duplicado, enquanto para a Espectrofotometria de Absorção Molecular (EAM), as análises foram feitas em triplicado. As análises foram conduzidas em duas amostras distintas: uma de farinha de trigo e outra de farinha de milho. As concentrações, designadas por “C” são expressas em unidades de mg/kg, acompanhadas pelo respectivo intervalo de confiança (IC) a 95% de nível de confiança.

Tabela 9. Resultado das concentrações de ferro usadas para o cálculo da exactidão do método de EAM

Código da Amostra	EAM		Método de referência (EAM)	
	Equação da curva	C (mg/kg) ± IC	Equação da curva	C (mg/kg) ± IC
AXS	y=37,502x+0,157	20,412±0,648	y=6,376x + 0,005	20,021±0,071
ACS		20,401±0,649		20,460±0,174

Para a avaliação de outros parâmetros, como a precisão e selectividade, são apresentadas as concentrações de ferro em mg/kg com o respectivo intervalo de confiança na Tabela 10. Importa referir que as concentrações foram determinadas em seis réplicas e três níveis de concentração distintos, a saber: 20; 35 e 70mg/kg, durante três dias.

Tabela 10. Resultados das concentrações de ferro usados na validação da EAM

NC (mg/kg)	Dia	Equação da curva	Concentração (mg/kg) ± IC	
			AM	ANM
20	1	$y = 37,502x + 0,157$	20,035±6,230	20,144±0,536
35			37,083±0,920	37,604±0,007
70			74,645±4,003	74,851±3,808

onde: AM e ANM significam amostra matrizada e amostra não matrizada respectivamente.

4.1.1.3. Robustez

De seguida são apresentados na Tabela 11 os resultados do estudo da robustez do método analítico de EAM, onde o parâmetro seleccionado foi a estabilidade dos padrões.

Tabela 11. Resultado das concentrações determinadas para a realização do teste ANOVA

Concentração (mg/kg)				
10 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos	180 minutos
38,98	38,68	38,51	39,01	38,98
39,68	39,05	38,89	38,92	38,76
39,02	38,89	38,86	38,97	38,97
Equações das curvas				
10 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos	180 minutos
$y = 0,034x - 0,007$	$y = 0,034x - 0,005$	$y = 0,033x - 0,008$	$y = 0,033x - 0,005$	$y = 0,034x - 0,003$

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de análise de variâncias apresentados na Tabela 12, a análise da estabilidade dos padrões mostrou que $F_{cal} (1,843) < F_{crit} (3,478)$. aceitando desta forma a hipótese nula, que determina que os padrões são estáveis dentro da faixa de trabalho avaliada, indicando que as possíveis variações observadas na resposta dos padrões não são

estatisticamente significativas, o que evidencia uma adequada estabilidade e robustez dos padrões utilizados de acordo com o critério do teste.

Tabela 12. Tabela ANOVA para avaliação da estabilidade dos padrões

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	Valor P	F crítico
Entre grupos	0,370	4	0,093	1,843	0,197	3,478
Dentro de grupos	0,502	10	0,050			
Total	0,872	14				

4.1.2. Resultados da determinação do ferro nas amostras de farinha de trigo e farinha de milho

Na tabela 13 serão apresentados os resultados referentes à determinação do teor de ferro em farinhas de trigo e milho fortificadas, colhidas na Shoprite de Zimpeto, Shoprite da Praça da Paz, no mercado grossista do Zimpeto, na padaria Guebo e em uma amostra de farinha de milho não fortificada. As concentrações são expressas em mg/kg, juntamente com os respectivos intervalos de confiança (IC).

Na Tabela 14, são apresentados os resultados do teste t – emparelhado, também realizado para avaliar se há diferença entre os dois métodos. Por fim, serão expostas as observações relevantes.

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

Tabela 13. Concentrações de farinha de milho e trigo obtidas por EAM e FAAS

Método analítico			
Código da amostra	Local de amostragem	Absorção Atómica	Absorção Molecular
		Concentração (mg/kg) ±IC	Concentração (mg/kg) ±IC
AWM	Mercado	19,987±0,337	19,880±0,287
ANF	Moageira	20,202±0,320	19,511±0,829
APP	Shoprite	20,531±0,355	20,035±0,623
ATS	Shoprite	74,645±4,003	78,525±0,460
ACS	Shoprite	20,594±0,192	20,401±0,649
AWS	Shoprite	19,873±0,194	19,157±0,754
AIS	Shoprite	20,227±0,660	20,907±0,242
ASM	Mercado	35,442±0,457	37,083±0,920
AXM	Mercado	20,109±0,088	20,744±0,390
AFM	Mercado	40,035±0,057	40,415±0,987
AXS	Shoprite	20,479±0,900	20,412±0,648
AFS	Shoprite	40,957±0,781	40,018±0,901

Tabela 14. Teste t - Emparelhado

Teste de amostras emparelhadas					t_{cal}	t_{crit}	gl	Significância (2 extremidades)
Diferenças emparelhadas								
Média	Desvio Padrão	Desvio padrão da diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença					
			Inferior	Superior				
-0,313	1,340	0,387	-1,164	0,539	-0,808	2,201	11	0,436

4.2. Discussão e Interpretação dos Resultados

4.2.1. Validação do método analítico

Todos os parâmetros avaliados para a validação do método analítico mostraram-se satisfatórios, à excepção da sensibilidade.

❖ Faixa de trabalho

Adoptou-se uma faixa de trabalho que abrangesse os limites mínimo (20 mg/kg) e máximo (140 mg/kg) das farinhas de trigo e milho, conforme os valores estabelecidos pela legislação moçambicana para a fortificação de alimentos. Nesse contexto, o teste estatístico de *Fischer-Snedecor* validou a hipótese nula, indicando que a faixa de trabalho definida se ajusta adequadamente para a determinação de ferro nas farinhas de trigo e milho, empregando a (EAM) no nível de confiança adoptado. Dessa forma, pode-se concluir que a faixa de trabalho estabelecida é apropriada para a análise em questão.

❖ Linearidade

De acordo com a Tabela 8, o teste estatístico *t-student* para a linearidade do método analítico (EAM), corroborou a hipótese alternativa (H_1). De forma geral, pode-se concluir que a linearidade é satisfatória ao nível de confiança de 95%, isto é, há uma correlação significativa entre x e y , podendo assim assegurar-se que o sinal dado pelo instrumento é directamente proporcional a concentração do analito na amostra dentro da faixa de trabalho adoptada.

❖ Sensibilidade

De acordo com os resultados da Tabela 8, a sensibilidade do método analítico, representada pelo declive constante da curva de calibração ao longo da faixa de trabalho avaliada, segue um modelo linear. O teste *t-student*, aplicado para avaliar se essa sensibilidade é estatisticamente significativa, validou a hipótese alternativa (H_1), chegando-se à conclusão de que o método não possui a capacidade de distinguir pequenas variações na concentração do analito dentro da faixa estudada, ao nível de confiança adoptado.

Contudo, ressalta-se que a avaliação da sensibilidade foi complementada com outros estudos, como a determinação dos limites de detecção e quantificação, para garantir uma compreensão mais completa do desempenho do método analítico, dado que factores como efeitos de matriz, interferências ou limitações instrumentais podem influenciar a capacidade real de discriminação de concentrações muito próximas.

❖ Selectividade

No que diz respeito à selectividade, o método analítico mostrou-se satisfatório de acordo com os resultados do teste estatístico *t-student*, que validou a hipótese nula (H_0) nos três níveis de concentração adoptados. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a matriz das farinhas de trigo e milho não apresenta um efeito estatisticamente significativo sobre o sinal instrumental de absorção do complexo tris (2,2'-bipiridina) ferro II, formado pelo complexo e o ferro disponível nas amostras na determinação do ferro. Pode-se desta forma concluir que o método é capaz de determinar o analito de interesse de forma selectiva, sem sofrer interferências significativas dos componentes presentes nas matrizes avaliadas

❖ Exactidão

O método analítico mostrou-se satisfatório relativamente à exactidão, avaliada através da comparação da concentração com o método de referência (no LNHA), nas duas amostras submetidas a análises. De acordo com os resultados do teste estatístico *t-student*, apresentados na Tabela 8, o teste sustentou a hipótese nula (H_0), com a qual se pode concluir que não há diferenças significativas entre o valor obtido pela EAM e pelo método de referência, ao nível de confiança adoptado.

Com esta observação, pode-se esperar que o emprego do método analítico de EAM para a determinação do ferro nas amostras de farinha de trigo e milho produza resultados que não diferem significativamente do método de referência em uso no LNHA.

❖ Repetibilidade

A repetibilidade do método analítico foi avaliada em três níveis de concentração: 20, 35 e 70 mg/kg. Os valores de coeficiente de variação (CV) obtidos em cada nível (Tabela 8) foram inferiores a 20%, demonstrando repetibilidade aceitável de acordo com os critérios estabelecidos que consideram a faixa de 10 a 100 mg/kg.

Os baixos valores de CV indicam excelente repetibilidade dentro da faixa avaliada, ou seja, sob as mesmas condições de análise, os resultados gerados tendem a ser estatisticamente próximos, com pouca variação aleatória. Essa adequada repetibilidade é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados, permitindo distinguir pequenas diferenças entre amostras. Ao atender aos critérios, o método demonstrou ter a precisão necessária para gerar dados repetíveis e confiáveis na determinação de ferro em farinhas fortificadas.

❖ **LD e LQ**

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método analítico, determinados a partir da curva de calibração para o ferro, apresentaram valores de 0,0372 mg/L e 0,1238 mg/L, respectivamente, indicando que o método permite detectar a presença de ferro acima de 0,0372 mg/L e quantificá-lo com precisão e exactidão aceitáveis a partir de 0,1238 mg/L, o que é desejável, especialmente ao trabalhar com amostras contendo o analito em baixas concentrações.

❖ **Robustez**

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da estabilidade de padrões ao longo do tempo, a robustez do método mostrou-se satisfatória. O teste de análise de variâncias (ANOVA) validou a hipótese nula (H_0), evidenciando, desta forma não haver diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de ferro obtidas durante um intervalo de 3 horas, conforme os resultados da Tabela 11 e Tabela 12. Pode-se assegurar que, dentro deste intervalo de tempo, o método analítico de EAM produz resultados satisfatórios, empregando a mesma curva de calibração.

4.2.2. Análise das amostras

Os resultados mostraram que as farinhas tanto de trigo quanto de milho fortificadas apresentaram teores de ferro variando de 20 a 70 mg/kg, enquanto a farinha não fortificada apresentou $20,202 \pm 0,320$ e $19,511 \pm 0,829$ mg/kg para análises feitas por FAAS e EAM respectivamente. Portanto, pode-se afirmar que a adição de compostos de ferro durante a etapa de fortificação foi eficiente em elevar as concentrações desse mineral em algumas farinhas analisadas, comprovando a efectividade do processo tanto nas farinhas processadas a nível nacional quanto a nível das farinhas importadas.

4.2.2.1. Comparação dos resultados obtidos pelo método de EAM e FAAS

Com base nos resultados do teste t – emparelhado, observou-se que a diferença das médias associada ao teste (0,327) foi diferente de zero, a um nível de confiança de 95%, portanto, não há evidências estatisticamente significativas para rejeitar a hipótese nula de que não existe diferença entre as concentrações medidas pelos métodos FAAS e EAM. Assim, com base nos resultados deste teste, conclui-se que os métodos produzem resultados comparáveis para a medição de concentrações de ferro nas amostras analisadas. Isso sugere que ambos os métodos são igualmente adequados para essa finalidade, proporcionando uma base confiável para as análises realizadas.

4.2.2.2. Comparação dos teores obtidos com os limites estabelecidos

Apresentar-se-ão a seguir gráficos que representam as comparações dos valores do teor de ferro obtido pela EAM e FAAS, com os limites estabelecidos pela lei moçambicana para fortificação de alimentos. Nestes gráficos não se faz a distinção das farinhas de trigo e milho.

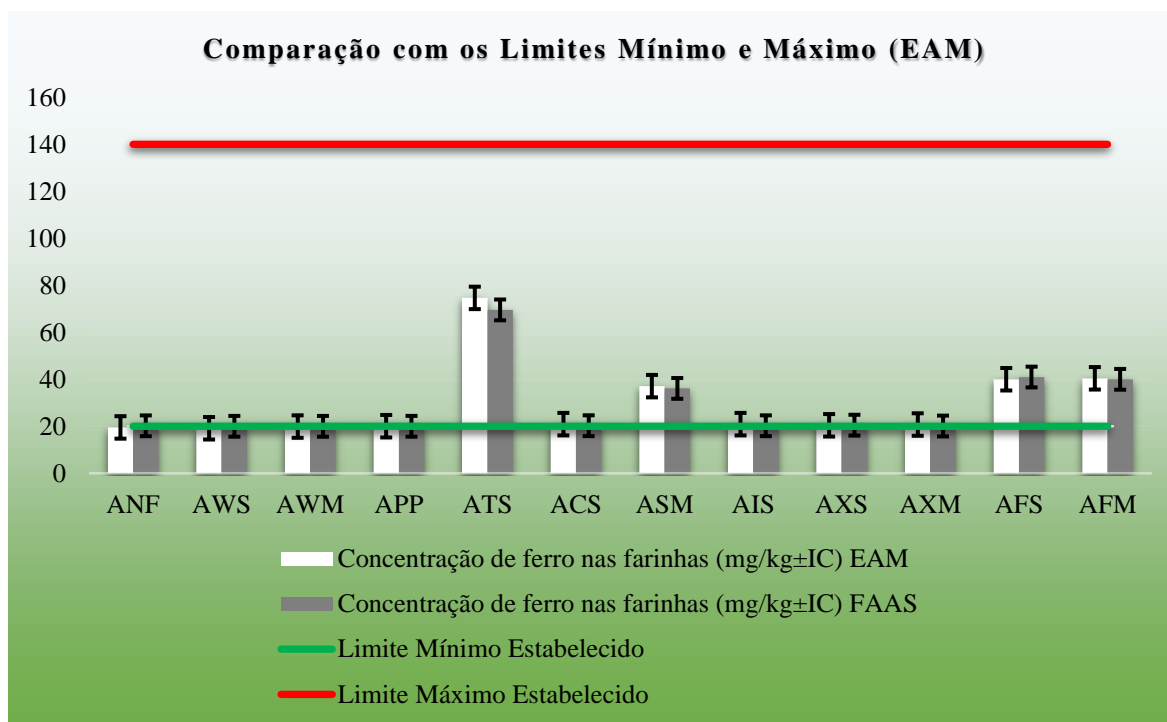


Figura 8. Comparação do teor de ferro com os limites estabelecidos pela lei

Ao analisar a Figura 8, percebe-se que todas as amostras de farinhas de trigo e milho apresentaram teores de ferro dentro da faixa de 20 a 140 mg/kg, que corresponde aos limites estabelecidos pela legislação nacional vigente. Esse resultado indica que essas farinhas contêm níveis adequados de ferro para o consumo humano, não representando riscos à saúde dos consumidores.

Na figura pode-se perceber ainda que as amostras AWS, AWM, AXM, AXS, APP, ACS, e AIS apresentam teores de ferro no limite mínimo estabelecido, que também se equipara ao teor de ferro determinado na farinha de milho não fortificada (ANF), o que de certa forma pode constituir uma preocupação, do ponto de vista de saúde pública, uma vez que a fortificação de farinhas com apenas 20 mg/kg de ferro, mesmo atendendo ao limite mínimo legal, pode ser insuficiente para suprir as necessidades nutricionais de grupos vulneráveis como crianças e mulheres em idade fértil, caso não consumam outros alimentos ricos em ferro, devido à baixa biodisponibilidade e variabilidade de ingestão (Hurrell & Egli, 2010; Baltussen *et al.*, 2004). Esse nível também pode ser afectado por interações com outros componentes da dieta, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade segundo Teucher (2004). Além disso, estudos

indicam que níveis mais elevados, geralmente acima de 30-40 mg/kg, são necessários para produzir impactos significativos na redução da deficiência de ferro, podendo desta forma estas farinhas não responder aos objectivos da fortificação.

4.2.2.3. Comparação das concentrações obtidas com os valores rotulados

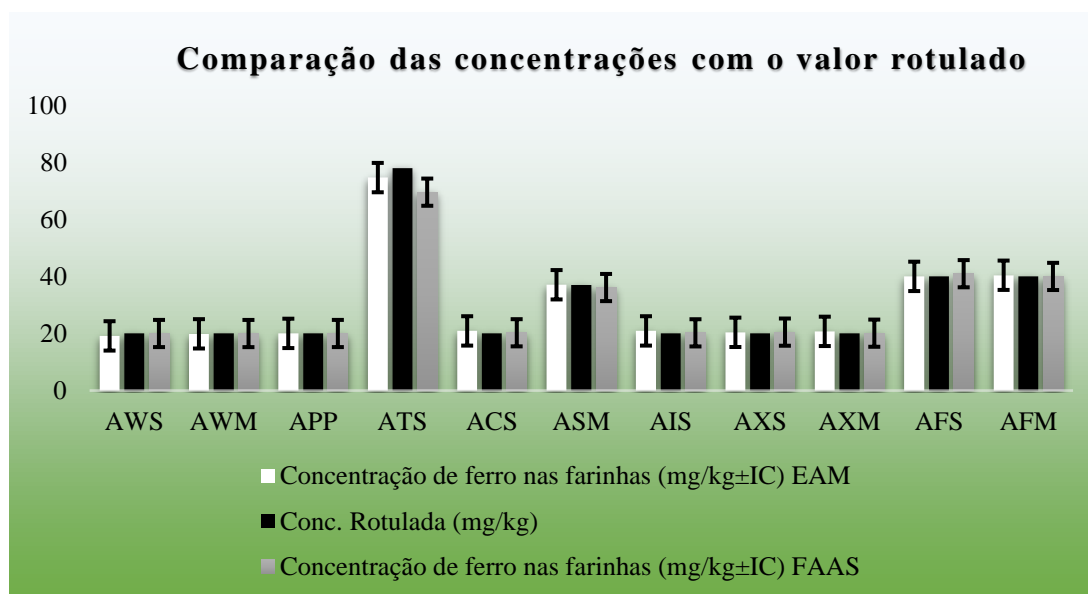


Figura 9. Comparação das concentrações obtidas com o valor rotulado

Segundo a Figura 9, os teores de ferro obtidos a partir dos métodos de espectrofotometria de absorção molecular e espectrometria de absorção atômica para as amostras analisadas convergem com os valores declarados nos rótulos dos respectivos produtos.

A concordância observada entre os teores de ferro obtidos pelos métodos analíticos de espectrofotometria de absorção molecular e espectrometria de absorção atômica e os valores declarados nos rótulos das farinhas analisadas sugere que os processos de fortificação com ferro estão sendo realizados adequadamente pelos fabricantes desses produtos.

Essa constatação indica ainda que os requisitos legais de adição de ferro estão sendo cumpridos, os procedimentos de controle de qualidade na produção e fortificação dessas farinhas estão funcionando satisfatoriamente, e os consumidores podem ter confiança nas informações nutricionais rotuladas.

4.2.2.4. Comparação das concentrações de ferro entre farinhas da mesma marca

Neste subcapítulo far-se-á a comparação das amostras de farinhas da mesma marca que foram colhidas tanto no mercado quanto no supermercado. As amostras cujo código termina com “M” são as amostras que foram colhidas no mercado, as que foram colhidas no supermercado são as que o código termina com S.

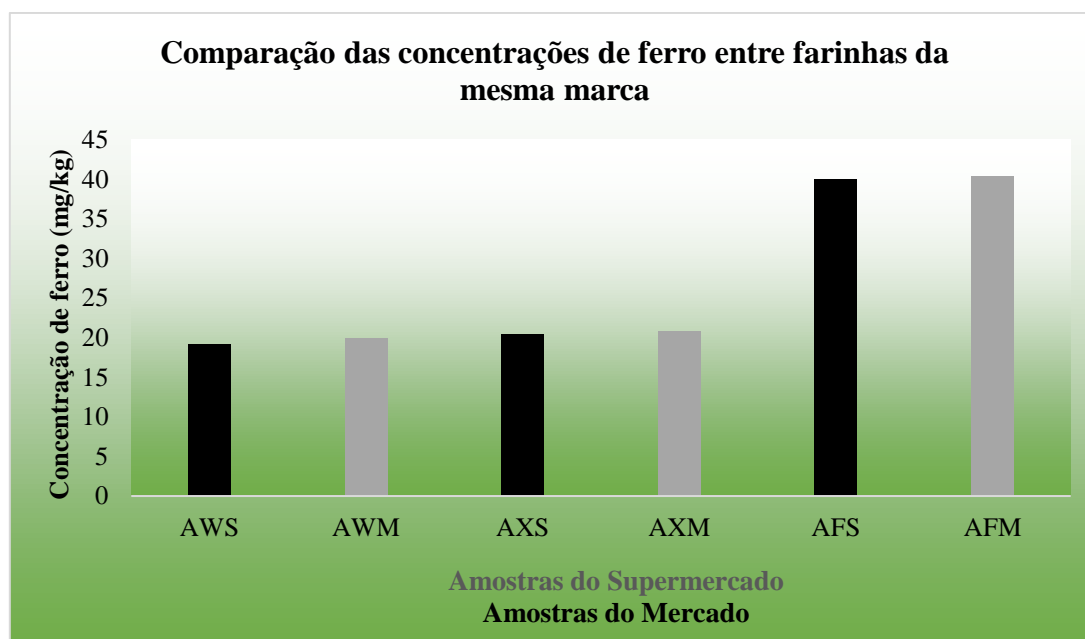


Figura 10. Comparação das concentrações de ferro entre farinhas da mesma marca

Como se pode verificar na Figura 10, não há diferenças significativas das concentrações de ferro entre farinhas da mesma marca colhidas no mercado e no supermercado. Apesar de factores como a exposição à luz e à humidade concorrerem para a degradação do ferro adicionado às farinhas fortificadas, autores como Sadihi *et al.*, (2005) e Kruger *et al.*, (2015) afirmam que apesar de alguma degradação poder ocorrer mais cedo, diferenças significativas nos teores de ferro geralmente tornam-se evidentes a partir de 3-6 meses de armazenamento inadequado, com exposição prolongada à luz e/ou alta humidade.

É importante ressaltar que esses períodos podem variar dependendo de factores como a intensidade da luz, níveis exactos de humidade, tipo de embalagem e forma química do ferro utilizado na fortificação. Assim, embora não sejam imediatas, as condições adversas de armazenamento podem comprometer gradualmente a qualidade do produto fortificado ao longo da sua vida útil, exigindo cuidados específicos para manter os níveis adequados de ferro até ao momento do consumo.

Desta forma, pode-se constatar que o fumarato ferroso, utilizado na fortificação de farinhas em Moçambique, é considerado uma fonte de ferro com boa estabilidade em relação à exposição à luz e humidade. Estudos recentes corroboram essa característica, tal como Abbasi & Azari (2015) que avaliaram a estabilidade de diversas fontes de ferro durante o armazenamento e constataram que o fumarato ferroso apresentou as menores perdas, inferiores a 5%, mesmo em condições de alta humidade (75% HR). Além disso, investigaram o efeito da luz solar directa em farinhas fortificadas com fumarato ferroso e observaram uma retenção de até 92% do teor inicial após 6 meses de exposição.

5. Capítulo V: CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1. Conclusões

Respondendo aos objectivos traçados neste trabalho, pode-se afirmar, com base nos resultados obtidos, que:

- Das amostras analisadas, 58,54% (APP, AWM, AWS, ACS, AIS, AXM e AXS) apresentaram teores de ferro de ± 20 mg/kg, o qual equipara-se ao teor de ferro da farinha de milho não fortificada (ANF), em análises feitas pelos dois métodos, tendo se obtido $20,202 \pm 0,320$ mg/kg e $19,511 \pm 0,829$ mg/kg para FAAS e EAM respectivamente.
- Não se verificou diferenças significativas nos resultados obtidos pela EAM e FAAS em quase todas as amostras, com excepção da amostra ATS que apresentou um teor de ferro de $74,645 \pm 4,003$ mg/kg e $78,525 \pm 0,460$ mg/kg para análises feitas por FAAS e EAM respectivamente.
- As amostras analisadas apresentaram teores de ferro que variam de 20 a 70 mg/kg de ferro, os quais encontram-se em conformidade com os limites mínimo e máximo estabelecidos pela legislação nacional, que variam de 20 a 140 mg/kg de ferro em farinhas de milho e trigo fortificadas.

5.2. Recomendações

- Recomenda-se, principalmente a mulheres grávidas e crianças a consumir regularmente alimentos que sejam fontes de ferro biodisponível, como carnes, leguminosas, ovos, nozes, sementes e vegetais verde-escuros, combinados com alimentos ricos em vitamina C, de modo a garantir uma ingestão adequada de ferro, sobretudo para os que consomem farinhas com o teor mínimo de ferro admissível pela legislação nacional (20 mg/kg) e farinhas não fortificadas;
- Desenvolver campanhas de conscientização pública sobre a importância da fortificação de farinhas e da ingestão adequada de ferro, incentivando o consumo das farinhas de milho e trigo fortificadas, e demais alimentos que contêm ferro;
- Realizar estudos adicionais sobre os factores que influenciam a biodisponibilidade e estabilidade do ferro nas farinhas fortificadas, como o efeito de diferentes condições de armazenamento, processamento e tipo de embalagem;
- Considerar a implementação de programas complementares, como a biofortificação do milho e do trigo com ferro, criando uma abordagem abrangente para combater a deficiência de ferro.

Referências Bibliográficas

- 1 Abbasi, S. & Azari, S. (2015). *Estudando a Estabilidade de Compostos de Ferro em Farinhas Fortificadas Durante o Armazenamento*. Food Chemistry, 173, 315-322.
- 2 Baltussen, R., Knai, C. & Sharan, M. (2004). *Iron Fortification And Iron Supplementation Are Cost-Effective Interventions To Reduce Iron Deficiency In Children*. Journal of Nutrition, 134 (10) 2597-2602.
- 3 Bortoline, G. & Fiesberg, M. (2010). *Orientação Nutricional do Paciente Com Deficiência de Ferro*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 32, 105-113.
- 4 Cardoso, W. S., Pinheiro, F. A., Machado, F. P., Borges, J. T. & Raios, S. A. (2011). *Indústria do milho*. In: Borém, A., Rios, S. de A. (Ed.). *Milho Biofortificado*. Visconde Branco:Suprema, p. 173-195, São Paulo.
- 5 Carvalho, S. W., Bacarat, E. C. & Sgarbieri, V. C. (2006). *Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro*. Segurança Alimentar e Nutricional, 13(2): 54-63, Campinas, 2006.
- 6 Chamuço, T. (25 de Setembro de 2017). *Fortificação de Alimentos Pode Reduzir Índices de Desnutrição no País*. O País. Maputo.
- 7 Cohen, Y. & Cohen, J. Y. (2008). *Statistics and Data with R. An Applied Approach Through Examples (1st Edition)*. New Jersey: Wiley & Sons.
- 8 Ermer, J. & Nethercote, P. (2015). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis (2nd ed.)*. Winheim-Germany: WILEY-VCH.
- 9 FDA. (October de 2019). *Guidelines For The Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, And Veterinary Products*. Obtido de FDS's Foods Program Methods website: https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/b-Chemical-Methods-Validation-Guidelines_3rd-ed_RSSC-508_final_12_06_19.pdf
- 10 Giacomelli, D., Monego, B., Delagustin, M. G., Borba, M. M., & Ricalde, S. R. (2012). *Composição Nutricional das Farinhas de Milho Pré-Cozida, Moída à Pedra e da Preparação Culinária "Polenta"*. Revista Alimentar Nutricional Araraquara, v. 23, n. 3, p. 415-420.
- 11 Hurrell, R. F. (15 de Fevereiro de 2020). *Práticas de Fortificação de Ferro e Implicações para Adição do Ferro ao Sal*. o Jornal de Nutrição-sociedade Americana de Nutrição, 3S-14S.

- 12 Hurrell, R. F., & Egli, I. M. (2010). *Iron Bioavailability and Dietary Reference Values*. American Journal of Clinical Nutrition, 91(5), 1461S-1467S.
- 13 Klein, C., & Philpotts, A. R. (2017). *Earth materials: Introduction to Mineralogy and Petrology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- 14 Kruger, J., Taylor, J. R., & Genet, R. A. (2015). *Losses of Iron and Zinc From Plain Maize Flour and Whole Maize Meal During Household Storage and Preparation in South Africa*. Food Chemistry, 184, 180-185.
- 15 Marques, M. F., Marques, M. M., Xavier, E. R., & Gregório, E. L. (2012). *Fortificação de Alimentos: Uma Alternativa para Suprir as Necessidades de Micronutrientes no Mundo Contemporâneo*. HU Revista, Juiz de Fora, 38, 26-36.
- 16 Martínez, H. (2006). *Nutrição com Ferro em Escolares do Oeste do México: O Efeito da Fortificação com Ferro*. Ecologia da Alimentação e Nutrição, 45, 431-447.
- 17 MISAU. (2021). *Inquérito de Indicadores de Imunização, Malária e HIV/SIDA em Moçambique (IMASIDA) 2015*. Maputo: Ministério da Saúde de Moçambique. Obtido de https://www.ins.gov.mz/index.php/publicacoes/cat_view/2-inqueritos-nacionais
- 18 Moreno, M. L., Espadas-Aldana, G., Vasquez-Aguilar, A. A., Hernandez-Madrigal, M. V., J. U.-B. M., Tortora-Feliz, M. & Arriola-Guevara, E. (2010). *Comparison of two Analytical Methods for Iron Quantification in Fortified Food Samples: UV-vis vs Atomic Absorption*. (I. Publishing, Ed.) Journal of Physics: Conference Series, 012011.
- 19 Nievisnki. (2009). *Trigo: do grão à farinha (Uma Revisão Sobre Deoxinivalenol)*. Monografia para obtenção do título de engenheiro de alimentos, Porto Alegre.
- 20 Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kris, G. S. & Vyvyan, J. R. (s.d.). *Introdução à Espectroscopia* (4th north american edition). São Paulo: Cengage Learning.
- 21 Peixoto, E. C. (2017). *Avaliação do Uso Industrial de Enzimas da Diminuição de Tempo de Maceração na Moagem do Milho Por Via Húmida*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo. Dissertação para obtenção do título de mestre. São Paulo.
- 22 Pereira, E. R., Oliva, I. C. & Nunes, A. M. (2021). *Flame Absorption Spectrometry For Cu, Zn, Fe And Mn Determination In Wheat Flour Samples: A Performance Comparison Using Aqueous Calibration and Slurry Sampling*. Food Chemistry, 344. Amsterdam.
- 23 Raiswell, R. C. (2012). *The Iron Biogeochemical Cycle Past and Present*. Geochemical Perspectives, Vol. 1, No. 1, p.1-2. United Kingdom. Obtido de https://www.geochemicalperspectives.org/wp-content/uploads/GPv1n1_online.pdf

- 24 Relacre, G. (2000). *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Lisboa: Relacre.
- 25 Ribani, M. (2004). *Validação em Métodos Cromatográficos e Electroforéticos*. Química Nova, Vol. 27, No. 5, p. 771-780. Obtido de <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>
- 26 Rich, S. (2016). *Situação Nutricional em Moçambique. Programa Nutrição para cada Criança*. Maputo: UNICEF/MOZA.
- 27 Rocha, F. R., & Oliveira, A. M. (2021). *Validação de Métodos Analíticos: uma revisão Crítica*. Química Nova.
- 28 Rudnick, R., & Gao, S. (2003). *Composition of the Continental Crust*. Treatise on Geochemistry. Elsevier, Amsterdam, p. 1-64.
- 29 Sadihi, J., Sheikholislam, R., Mohammad, K., Pourreza, J., & Damavandi, R. (2005).. *Effectiveness of photostabilizers on preventing the loss of vitamins under UV radiation*, 41-48.
- 30 Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Princípios de Análise Instrumental* (7ª ed.). Cengage Learning. São Paulo.
- 31 Teucher, B. (2004). *Enhancers of Iron Absorption: Ascorbic Acid and Organic Acids*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 74 (6), 403-419.
- 32 Umbelino, D. C., & Rossi, E. A. (2006). *Deficiência De Ferro: Consequências Biológicas E Propostas De Prevenção*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 27, 103-112.
- 33 UNICEF. (2022). *Situação Mundial da Infância 2022 - Resumo Estatístico por País - Moçambique*. UNICEF. Obtido de <https://www.unicef.org/mozambique/media/3806/file/Mozambique%20Country%20Statistical%20Summary.pdf>
- 34 Vellozo, E. P., & Fiesberg, M. A. (2010). *Contribuição dos Alimentos Fortificados na Prevenção da Anemia Ferropriva*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 32, p. 140-147. São Paulo.
- 35 Welz, B., & Sperling, M. (2008). *Atomic Absorption Spectrometry* (3rd ed.). Wiley-VCH.
- 36 WHO. (2006). *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*. World Health Organization. Obtido de https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43412/9241594012_eng.pdf?sequence=1

- 37 WHO. (2010). *Recommendations on wheat and maize flour fortification. meeting report: interim consensus statement*. Geneva: World Health Organization.
- 38 Xia, X., Teng, Y., & Zhai, Y. (2022). *Biogeochemistry of Iron Enrichment in Groundwater: An Indicator of Environmental Pollution and its Management*. *Sustainability*, 14(12) 7059. Obtido de <https://doi.org/10.3390/su14127059>
- 39 Zancul, M. S. (2004). *Fortificação De Alimentos Com Ferro e Vitamina A*. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. São Paulo

Anexos

Anexo 1. Equipamentos usados para realização da parte experimental

Na figura A 1 estão apresentadas imagens que ilustram os equipamentos usados para destilar e desionizar a água, e para tarar o material.



Figura A 1: (a) destilador; (b) desionizador(c) Estufa

Na figura A 2 estão representados equipamentos utilizados para aquecer soluções, medir o pH e incinerar as amostras



Figura A 2 (a) placa aquecedora com agitador magnético; (b) pH-metro; (c) mufla

Na figura A 3 estão representados os equipamentos usados para medir o teor de ferro por EAM e FAAS.



Figura A 3. **Espectrofotómetro** de Absorção Molecular à esquerda; **Espectrofotómetro** de Absorção Atómica à direita

Na figura A 4 está representado o equipamento usado para pesar as amostras e as substâncias usadas para preparar as soluções.



Figura A 4. Balança analítica

Anexo 2: Preparação de soluções

a) Solução de cloridrato de hidroxilamina (10%)

Em um copo de Becker pesou-se com o auxílio de uma balança analítica, 10 g de cloridrato de hidroxilamina, dissolveu-se com um pouco de água desionizada, e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Lavou-se o copo de Becker com água desionizada e perpez-se o volume de 100 mL.

b) Solução tampão (pH = 4,64)

Pesou se 68 gramas de acetato de sódio em um copo de Becker de 500 mL e dissolveu-se em 100 mL de água desionizada. De seguida, acrescentou-se 60 mL de ácido acético glacial, misturou-se com ajuda de uma vareta de vidro e transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL e perpez-se o volume com água desionizada.

c) Solução indicadora (2,2'-bipiridina $6,4 \cdot 10^{-3}$)

Em um copo de Becker de 50 mL, pesou-se 0,1 g de 2,2'-bipiridina, dissolveu-se com um pouco de água desionizada. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL, e perpez-se o volume com água desionizada.

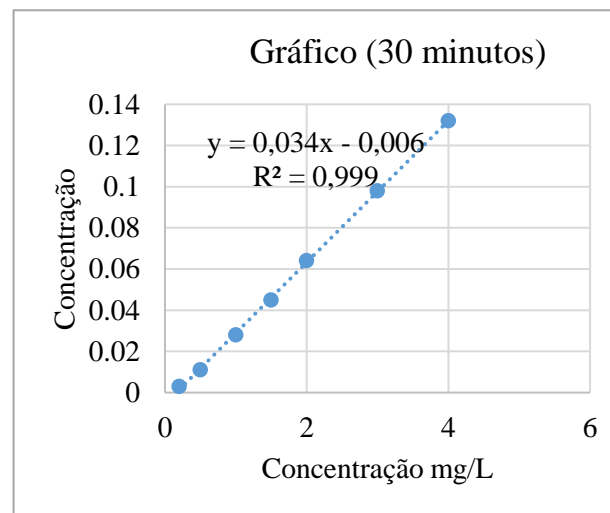
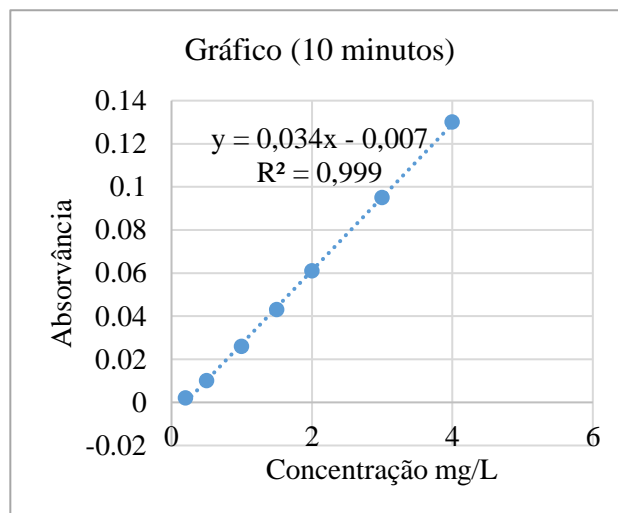
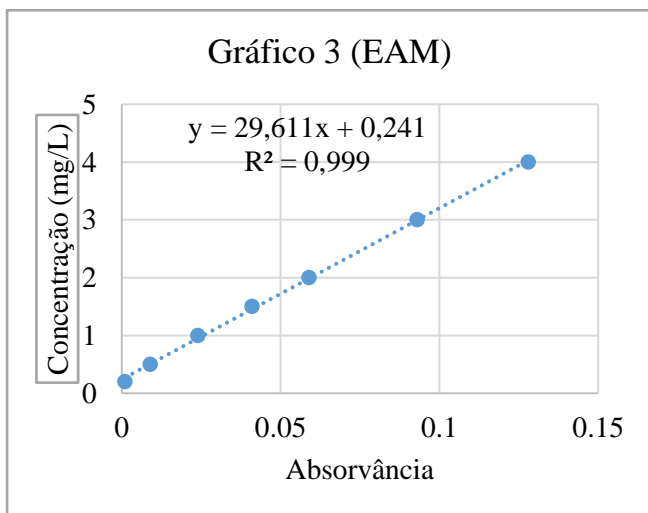
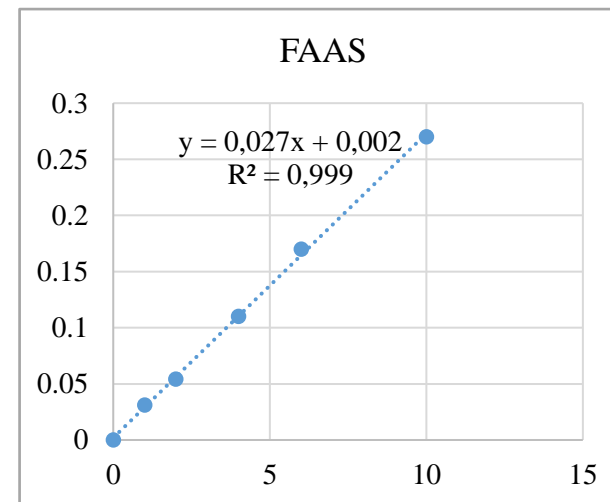
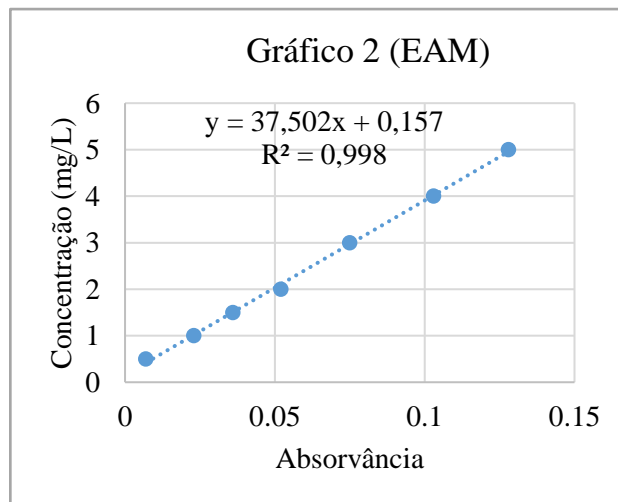
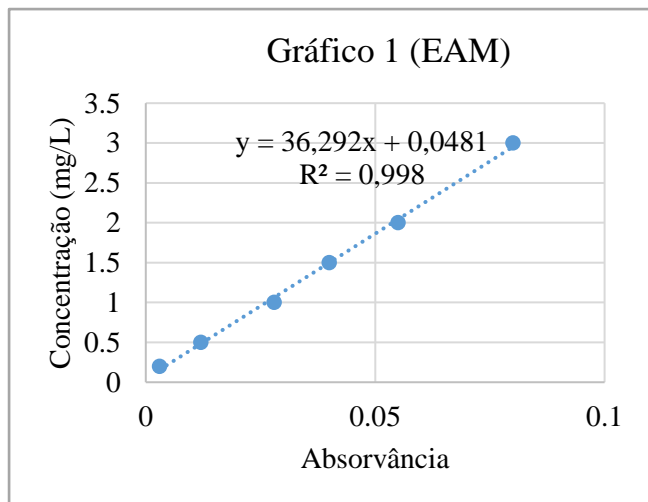
d) Solução padrão secundária (10 mg/L)

Pipetou-se 5 mL da solução padrão primária de ferro e colocou-se em um balão volumétrico de 500 mL, de seguida adicionou-se 2 mL ácido clorídrico e perpez-se o volume com água destilada.

e) Soluções padrão

- Em balões volumétricos (devidamente rotulados) de 100 mL, pipetou-se 0 (para o branco), 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mL da solução padrão secundária e perpez-se o volume com água desionizada.
- Destes balões, tomou-se alíquotas de 10 mL para balões de 25 mL onde se adicionou 1 mL da solução de cloridrato de hidroxilamina, e deixou-se repousar por 5 minutos;
- De seguida adicionou-se 5 ml da solução tampão e 1 mL do indicador tendo-se aguardado 30 minutos para que a cor desenvolvesse, e por fim perpez-se o volume com água desionizada.

Anexo 3: Curvas de calibração empregues para validação do método do método analítico de EAM e para determinação da concentração do ferro.



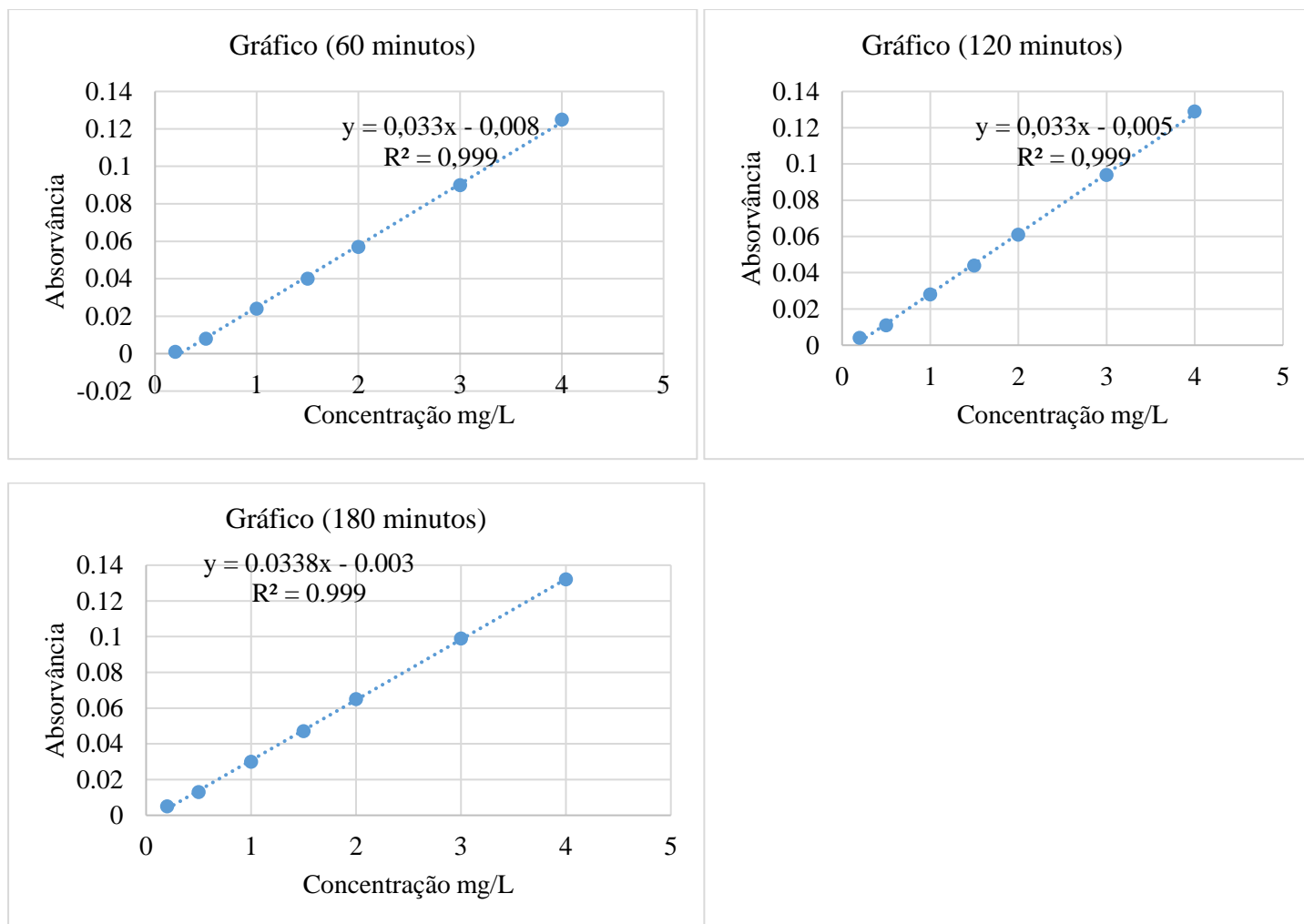


Figura A 5. Curvas de calibração (EAM e FAAS)

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

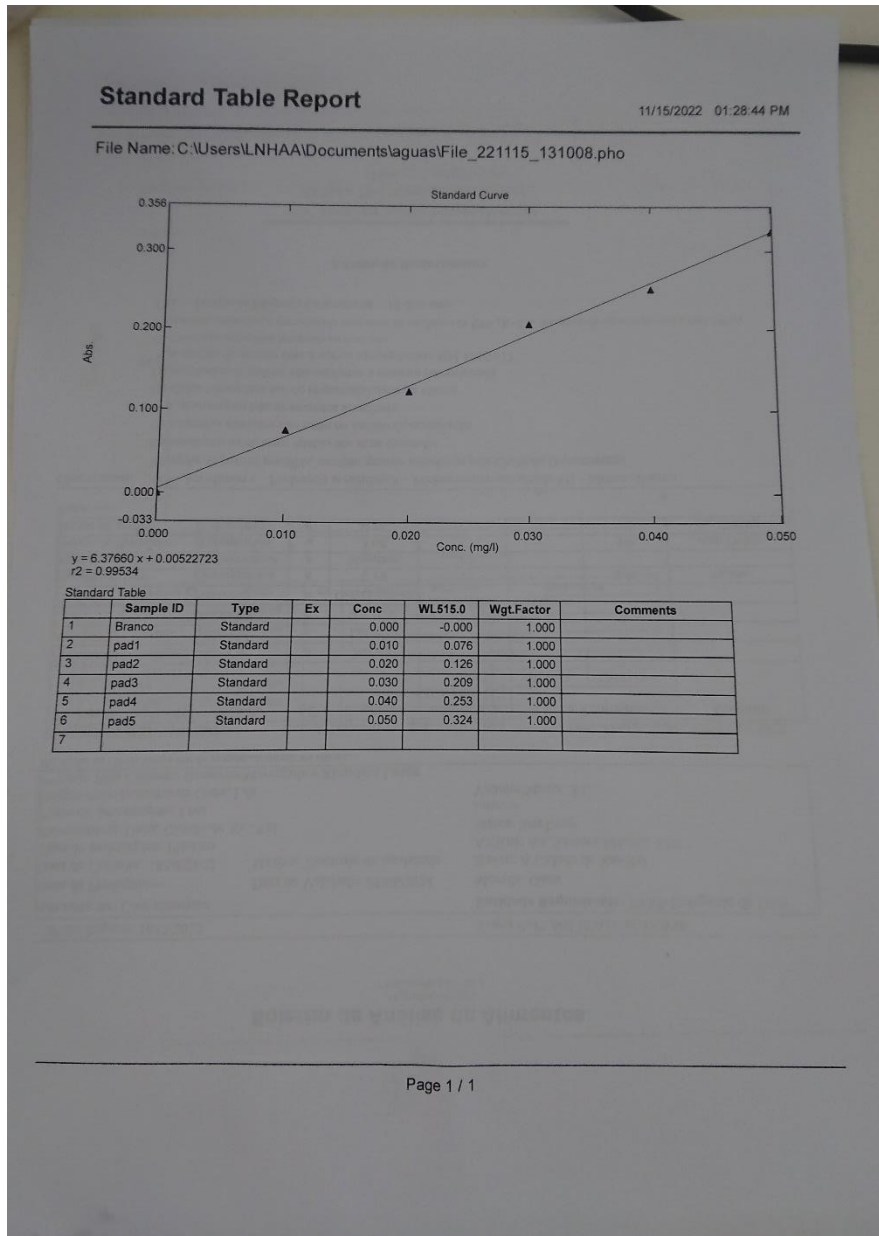


Figura A 6. Curva de calibração do método de referência (LNHAA)

Anexo 4: Valores Críticos da Distribuição de *Fischer-Snedecor* e *t Student*

CRITICAL VALUES for the "F" Distribution, ALPHA = .05.										
Denominator	Numerator DF									
DF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.448	199.500	215.707	224.583	230.162	233.986	236.768	238.883	240.543	241.882
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.330	19.353	19.371	19.385	19.396
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165
31	4.160	3.305	2.911	2.679	2.523	2.409	2.323	2.255	2.199	2.153
32	4.149	3.295	2.901	2.668	2.512	2.399	2.313	2.244	2.189	2.142
33	4.139	3.285	2.892	2.659	2.503	2.389	2.303	2.235	2.179	2.133
34	4.130	3.276	2.883	2.650	2.494	2.380	2.294	2.225	2.170	2.123
35	4.121	3.267	2.874	2.641	2.485	2.372	2.285	2.217	2.161	2.114
36	4.113	3.259	2.866	2.634	2.477	2.364	2.277	2.209	2.153	2.106
37	4.105	3.252	2.859	2.626	2.470	2.356	2.270	2.201	2.145	2.098
38	4.098	3.245	2.852	2.619	2.463	2.349	2.262	2.194	2.138	2.091
39	4.091	3.238	2.845	2.612	2.456	2.342	2.255	2.187	2.131	2.084
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077
41	4.079	3.226	2.833	2.600	2.443	2.330	2.243	2.174	2.118	2.071
42	4.073	3.220	2.827	2.594	2.438	2.324	2.237	2.168	2.112	2.065
43	4.067	3.214	2.822	2.589	2.432	2.318	2.232	2.163	2.106	2.059
44	4.062	3.209	2.816	2.584	2.427	2.313	2.226	2.157	2.101	2.054
45	4.057	3.204	2.812	2.579	2.422	2.308	2.221	2.152	2.096	2.049
46	4.052	3.200	2.807	2.574	2.417	2.304	2.216	2.147	2.091	2.044
47	4.047	3.195	2.802	2.570	2.413	2.299	2.212	2.143	2.086	2.039
48	4.043	3.191	2.798	2.565	2.409	2.295	2.207	2.138	2.082	2.035
49	4.038	3.187	2.794	2.561	2.404	2.290	2.203	2.134	2.077	2.030
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026

Figura A 7. Valores Críticos da Distribuição de Fischer-Snedecor

Avaliação da Conformidade com as Directrizes Nacionais dos Níveis de Ferro em Farinhas de Trigo e Milho Fortificadas Comercializadas em Maputo

gl\P	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
01	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
02	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
03	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,541	12,924
04	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
05	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
06	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
07	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,365	3,499	5,408
08	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
09	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883

Figura A 8 Tabela de valores críticos de t *Student* bilateral