

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Samantha Leite da Trindade

**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO  
EM FRUTAS REGIONAIS**

BELÉM  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Samantha Leite da Trindade

**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS - TRAÇO  
EM FRUTAS REGIONAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada para a  
obtenção de grau de mestre em Química.  
Programa de Pós-Graduação em Química.  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais.  
Universidade Federal do Pará.  
Área de concentração Analítica.  
Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly das Graças  
Fernandes Dantas

Belém

2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central da Universidade Federal do Pará, Belém/PA**

---

Trindade, Samantha Leite da, 1981–

Determinação e distribuição de elementos-traço em frutas regionais / Samantha Leite da Trindade; orientadora, Kelly das Graças Fernandes Dantas. – 2010.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, Belém, 2010.

1. Elementos traços. 2. Frutas – Amazônia. 3. Especificação (Química). 4. Análise cromatográfica. 5. Análise espectral. I. Título.

CDD - 22. ed. 543

---

Samantha Leite da Trindade

**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS - TRAÇO  
EM FRUTAS REGIONAIS**

Dissertação apresentada para a obtenção de grau de mestre em Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal do Pará.

Data da aprovação: Belém – PA. 29 - 04 - 2010

**Banca examinadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly das Graças Fernandes Dantas  
Faculdade de Química – UFPA – Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Celi Sarkis Müller  
Faculdade de Química – UFPA – Membro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulcidéia da Conceição Palheta  
Instituto de Saúde e Produção Animal – UFPA- Membro

*Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, Edson Vasconcelos , Eliana Maria e Raimundo Pimentel que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas três pessoas, com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada Sr.Edson e D.Eliana por serem meus pais e Raimundo Pimentel por ser meu fiel companheiro. Obrigada por serem profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.*

## **Agradecimentos**

À Deus por iluminar meu caminho e me dar força para seguir sempre em frente.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

Às minhas irmãs (Eliane, Penélope e Rebeca), e sobrinhos (Ana Carolina e Samuel Henrique) que amo tanto.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas, por sua dedicação, paciência, sensibilidade, apoio e, acima de tudo, exigência durante esta jornada.

À UFRA, em especial à professora Dra. Dulcidéia Palheta por ceder os equipamentos para as análises.

À professora Dra. Regina Celi Sarkis Müller por ceder o seu laboratório para a digestão das amostras.

Ao professor Dr. Alberdan Silva, pelas análises realizadas em seu laboratório.

À minha querida amiga e irmãzinha do coração Samara Mescouto pelo seu apoio, incentivo e paciência.

Aos meus grandes amigos Aline, Diomar, Emanuelle, Larissa, Lúcia Marcela, Kelly, Rosângela, Vanessa, Marcelo, Fábio Mota, D.Francisca, Raimundinho, D. Hero, Kiara, Natália, Flávio, Antônio, Silvana, minha querida Dorazilma, que sempre me incentivaram e proporcionaram momentos de laser, imprescindíveis ao bom andamento deste estudo.

À todo grupo de Espectrometria Analítica Aplicada pelo agradável convívio \_ pelo verdadeiro espírito de grupo e em especial à Patrícia Nunes e Júnior Batista pela grande força que me deram nas férias para o encerramento do trabalho experimental.

À banca pelas valiosas sugestões e trabalho dedicado à avaliação do presente trabalho.

Ao órgão financiador FAPESPA pela ajuda financeira para a execução do presente trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta dissertação torna-se realidade, o meu MUITO OBRIGADA.



“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário”  
(Albert Einstein)

## RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos envolvendo a determinação e distribuição de elementos-traço em amostras de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*), bacurí (*Platonia insignis Mart.*), castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*) e pupunha (*Bactris gasipaes H.B.K*) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Nos resultados obtidos para Cu, Fe, Mn e Zn nos digeridos das amostras por FAAS, o ferro foi encontrado em maior teor (23,4 a 46,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) seguido do zinco (6,3 a 46,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e cobre (2,9 a 47,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Baixos níveis de manganês foram encontrados nas frutas estudadas. O bacuri apresentou um elevado nível de Fe (46,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) enquanto a castanha-do-pará e pupunha mostraram elevados níveis de zinco (46, 1 e 46,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). O fracionamento de Cu, Fe e Zn nas frações lipídicas, protéicas e nos resíduos foi realizado usando extração sólido-líquido combinada com FAAS. Os valores encontrados mostraram um teor considerável desses elementos nas frações lipídicas e protéicas de bacuri e pupunha. Os maiores níveis de cobre, ferro e zinco na amostra de açaí foram obtidos no resíduo. A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) com detecção UV e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) foram usados para investigar a associação de cobre as proteínas presentes na polpa de açaí. A concentração de cobre nos digeridos e no extrato de proteínas foram 10,5 e 0,81  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Cobre foi encontrado associado às frações de proteínas correspondentes à 0,45, 3,8 e 64,5 kDa. Os níveis de Cu nessas frações variaram de 0,46 a 17,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados obtidos na polpa de açaí por cromatografia de exclusão por tamanho com off-line detecção GFAAS mostraram que cobre está associado às proteínas de alta massa molecular, baixa massa molecular e compostos não protéicos.

Palavras-chave: elementos-traço, frutas regionais, especiação, SEC, GFAAS.

## ABSTRACT

In this present work, studies involving the determination and distribution of trace elements in açai (**Euterpe oleracea Mart.**) Bacuri (**Platonia insignis Mart.**) Brazil-nut (**Bertholletia excelsa**), cupuassu (**Theobroma grandiflorum**) and pupunha (**Bactris gasipaes HBK**) samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). In the results obtained for Cu, Fe, Mn and Zn in digests samples, the iron was found in highest content (23.4 to 46.2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) followed by zinc (6.3 to 46.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and copper (2.9 to 47.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Low levels of manganese were found in the fruits studied. Bacuri showed a high level of Fe (46.2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) while Brazil-nut and pupunha showed high levels of zinc (46, 1 and 46.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The Fractionation of Cu, Fe and Zn in lipidic and protein fractions and residues was carried out using solid-liquid extraction combined with FAAS. The values found showed a considerable content of these elements in lipidic and protein fractions of bacuri and pupunha. Higher levels of copper, iron and zinc were obtained in the residue of the açai sample. Size exclusion chromatography (SEC) with UV detection and furnace graphite atomic absorption spectrometry (GFAAS) were used to investigate the association of copper with the proteins present in açai pulp. The concentration of Cu in digests and extract of proteins obtained were 10.5 and 0.81  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. Protein fractions obtained by SEC-UV were collected and Cu was determined by GFAAS. Copper was found bound in protein fractions corresponding to 0.45, 3.8 and 64.5 kDa. The levels of copper in those fractions varied from 0.46 to 17.69  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Results obtained for açai pulp by size exclusion chromatography with off-line GFAAS detection showed that copper is associated to proteins of high molecular weight (HMW), low molecular weight (LMW) and non-protein compounds.

**Keywords:** Trace elements, regional fruits, speciation, SEC, GFAAS.

## LISTA DE TABELAS

	p.
<b>Tabela 1</b> - Constante de estabilidade de alguns quelatos comuns (relação 1:1 de Ligante e íon metal H <sub>2</sub> O a 20°C).....	15
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros instrumentais usados na determinação de Fe, Mn, Cu e Zn nas amostras de frutas por FAAS.....	33
<b>Tabela 3</b> - Condições operacionais para SEC usando gradiente isocrático.....	41
<b>Tabela 4</b> - Programa de aquecimento do forno de grafite.....	43
<b>Tabela 5</b> - Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em µg g <sup>-1</sup> , nas amostras de açaí, bacurí, castanha-do-pará, cupuaçu e pupunha e seus respectivos desvios - padrão ( <i>n</i> = 3).....	44
<b>Tabela 6</b> - Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn em mg/100 g.....	45
<b>Tabela 7</b> - Tabela Brasileira de composição de alimentos em mg / 100g de parte comestível – TACO Versão 2 (NEPA / UNICAMP 2006).....	46
<b>Tabela 8</b> - Tabela Brasileira de composição de alimentos em mg / 100g de parte comestível – TACO Versão 1 (NEPA / UNICAMP 2004).....	47
<b>Tabela 9</b> - Contribuição das frutas analisadas como fonte de Cu, Fe, Mn e Zn para a dieta diária (%VD)* de um adulto.....	48
<b>Tabela 10</b> - Limites de detecção (mg L <sup>-1</sup> ) e quantificação (mg L <sup>-1</sup> ) para Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.....	48
<b>Tabela 11</b> - Concentração total de proteínas, em mg g <sup>-1</sup> , nas frações protéicas de açaí, bacurí e pupunha e seus respectivos desvios-padrão ( <i>n</i> = 2).....	49
<b>Tabela 12</b> - Concentrações de Cu, Fe e Zn e a somatória das frações das amostras de açaí, bacurí e pupunha com seus respectivos desvios-padrão ( <i>n</i> = 3).....	52

**LISTA DE ABREVIATURAS**

SDS	Dodecil sulfato de sódio
HPLC	Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
SEC – UV	Cromatografia de Exclusão por Tamanho com detecção no Ultravioleta- Visível
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
rpm	Rotação por minuto
HMW	High Molecular Weight
LMW	Low Molecular Weight
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
TACO	Tabela de Composição de Alimentos

## LISTA DE FIGURAS

p.

<b>Figura 1</b> - Minerais ligados em diferentes tipos de proteínas.....	12
<b>Figura 2</b> - Biodisponibilidade relativa de fontes de zinco e manganês.....	19
<b>Figura 3</b> - Açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	20
<b>Figura 4</b> - Bacurí ( <i>Platonia insignis</i> Mart.).....	21
<b>Figura 5</b> - Castanha-do-pará ( <i>Bertholletia excelsa</i> ).....	22
<b>Figura 6</b> - Cupuaçu ( <i>Theobroma Grandiflorum</i> ).....	23
<b>Figura 7</b> - Pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	24
<b>Figura 8</b> - Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica.....	30
<b>Figura 9</b> - Espectrofotômetro de feixe simples.....	31
<b>Figura 10</b> - Esquema de um espectrofotômetro de feixe único.....	32
<b>Figura 11</b> - Determinação dos totais de Cu, Fe, Mn e Zn nos digeridos de açaí, bacurí, castanha – do – pará, cupuaçu e pupunha por FAAS.....	36
<b>Figura 12</b> - Extração das frações lipídicas.....	37
<b>Figura 13</b> - Extração da fração protéica.....	38
<b>Figura 14</b> - Concentração de proteína total.....	39
<b>Figura 15</b> - Distribuição de Cu na fração protéica do açaí por SEC – UV e SEC - GFAAS.....	41
<b>Figura 16</b> - Esquema do sistema SEC-UV.....	42
<b>Figura 17</b> - Esquema do sistema “off-line” SEC-GFAAS.....	42
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de Cu, Fe e Zn nas frações: açaí (a), bacurí (b) e pupunha (c).....	53

<b>Figura 19</b> - Estrutura fosfolipídio (A) e do sulfolipídio (B).....	57
<b>Figura 20</b> - Perfis cromatográficos dos padrões de proteínas ferritina, albumina, mioglobina e seleno-metionina por SEC-UV a 295 nm.....	59
<b>Figura 21</b> - Perfil cromatográfico das proteínas presentes no açaí por SEC-UV a 295 nm.....	60
<b>Figura 22</b> - Níveis de cobre associados às proteínas presentes no açaí.....	61

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3 – REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1- IMPORTÂNCIAS BIOLÓGICAS DO COBRE, FERRO, MANGANÊS E ZINCO NO ORGANISMO HUMANO.....	4
3.2 - BIODISPONIBILIDADE DOS MINERAIS.....	7
3.2.1 - Biodisponibilidade do Zinco.....	8
3.2.2 – Biodisponibilidade do Ferro.....	8
3.2.3 - Biodisponibilidade de Manganês.....	9
3.2.4 – Biodisponibilidade do Cobre.....	10
3.3 – FATORES QUE INTERFEREM NA BIODISPONIBILIDADE DE ALGUNS MINERAIS.....	10
3.4 – MINERAIS QUELATADOS.....	11
3.4.1 – Formação dos minerais quelatados.....	14
3.4.2 – Absorção dos quelatos.....	16
3.4.3 – Biodisponibilidade dos quelatos.....	17
3.5 – FRUTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA.....	19
3.5.1 – Açaí.....	19
3.5.2 – Bacurí.....	21
3.5.3 – Castanha – do – Pará.....	22
3.5.4 – Cupuaçu.....	23
3.5.5 – Pupunha.....	24
3.6 – CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PROTEÍNAS.....	25
3.7 – ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....	26
3.8 – TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	29



3.8.1 – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama FAAS).....	29
3.8.2 - Espectrofotometria UV – Visível.....	30
<b>4 – METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
4.1 – INSTRUMENTAÇÃO.....	32
4.2 – REAGENTES E MATERIAIS.....	34
4.3 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	35
4.3.1 – Preparo de amostras.....	35
4.3.2 – Digestão das amostras.....	35
4.3.3 – Remoção da fração lipídica.....	36
4.3.4 – Extração seqüencial.....	37
4.3.5 – Proteína total.....	39
4.3.6 – Determinação dos teores totais de Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).....	40
4.3.7 – Teste da adição e recuperação.....	40
4.3.8 – Otimização da separação cromatográfica dos padrões de proteínas.....	40
4.3.9 – Detecção de Cu associado às proteínas presentes no açaí por SEC – UV.....	41
4.3.10 – Detecção das espécies de Cu associadas às proteínas do açaí por SEC – GFAAS.....	42
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1 – CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS NAS AMOSTRAS.....	43
5.2 – TEOR DE PROTEÍNA TOTAL.....	48
5.3 – TEOR DE Cu, Fe E Zn NA FRAÇÃO LIPÍDICA.....	50
5.4 – DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe E Zn NAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE AÇAÍ, BACURÍ E PUPUNHA.....	51
5.5 – SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS PROTEÍNAS PADRÃO E PROTEÍNAS PRESENTES NO AÇAÍ POR SEC – UV.....	59

<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade de produtos alimentícios tem recebido especial atenção devido a sua importância na nutrição e saúde humana<sup>1</sup>. Nos últimos anos, tem crescido o interesse na avaliação de macro e microelementos em uma variedade de amostras de alimentos<sup>2</sup>. Os alimentos são uma das principais fontes de metais para o corpo humano. A maior parte dos íons metálicos presentes na alimentação estão vinculados a determinadas proteínas ou enzimas e exercem os seus efeitos estruturais como sítios ativos ou centros de comando em processos como catalisadores, substrato e de ativação, transporte e armazenamento<sup>3</sup>.

Para a obtenção de uma alimentação saudável a partir das cadeias agroalimentares, destacam-se os alimentos funcionais, assim denominados por conterem substâncias capazes de promover efeitos benéficos à saúde, associados à prevenção de doenças, entre estas as cardiovasculares, câncer, diabetes e osteoporose. Dentre os grupos de alimentos que se enquadram nessa categoria encontram-se as frutas por conterem substâncias muito importantes para a saúde, tais como: antocianinas presentes no açaí; taninos no caju; carotenóides na manga; ácido ascórbico (precursor da vitamina C) no camu-camu; ferro no açaí, banana e puruí, além de outros<sup>4</sup>.

A determinação do teor total do metal ingerido pelo organismo não possibilita traçar um perfil da eficiência de sua absorção. Existe a necessidade de saber a biodisponibilidade do metal, ou seja, a proporção do nutriente que é absorvida e utilizada pelo organismo. Técnicas de especiação química, como a extração de elementos-traço usando diferentes meios extratores, podem auxiliar na avaliação da biodisponibilidade destes minerais possibilitando a obtenção de novos dados para prever sua absorção<sup>5</sup>. Neste sentido, a determinação de elementos-traço em alimentos tem se transformado em um importante campo na análise de alimentos<sup>1</sup>.

A região amazônica apresenta uma vasta disponibilidade de frutas com elevado teor nutricional, entre elas destacam-se a pupunha (*Bactris gasipaes* **H.B.K**), que é uma fruta tropical da família das palmáceas e outras frutas conhecidas da região norte como a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), o açaí (*Euterpe oleracea* **Mart**), o bacurí (*Platonia insignis* **Mart**) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* **Schum**).

Nutricionalmente, o açaí é rico em antocianinas, entretanto, no que se refere aos elementos minerais, particularmente o ferro, há muito que se estudar, uma vez que a literatura é escassa e os dados são pouco confiáveis em função da compilação, quantidade de amostras utilizadas, metodologias e variação edafoclimático<sup>6</sup>.

A pupunha potencialmente nutritiva apresenta na sua composição alguns minerais, tais como fósforo, cálcio, magnésio, zinco, entre outros. É rica em proteínas e vitaminas A, B<sub>1</sub> e C. Já as castanhas-do-pará são ricas em selênio, embora a quantidade de selênio varie consideravelmente<sup>7</sup>. São também uma boa fonte de magnésio e tiamina. Algumas pesquisas indicaram que o consumo de selênio está relacionado com uma redução no risco de câncer de próstata<sup>8</sup>. Isto levou alguns analistas a recomendarem o consumo de castanhas-do-pará como uma medida preventiva<sup>9</sup>. Estudos subsequentes sobre o efeito do selênio no câncer de próstata foram inconclusivos<sup>10</sup>.

O desenvolvimento de procedimentos analíticos que visam aperfeiçoamento do preparo de amostras para determinação de elementos-traço em amostras de frutas regionais, possibilita uma maior confiabilidade e melhores limites de detecção. Com esse estudo pode-se obter mais informações sobre as formas químicas desses elementos-traço nas amostras de alimentos regionais e proporcionar um maior valor agregado às frutas regionais.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinação e distribuição de elementos-traço em frutas regionais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ❖ Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de açaí, bacurí, castanha-do-pará, cupuaçu e pupunha;
- ❖ Distribuição de Cu, Fe e Zn em açaí, bacurí e pupunha por FAAS;
- ❖ Distribuição de Cu em açaí por SEC-UV e SEC-GFAAS.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1 Importâncias biológicas do cobre, ferro, manganês e zinco no organismo humano

Diversos minerais desempenham diferentes papéis essenciais no nosso organismo, podendo estes estar livres ou associados a outras espécies que desempenham funções fisiológicas para o bom funcionamento do organismo <sup>11</sup>.

Essenciais na nutrição humana, os minerais encontrados em maiores concentrações no corpo humano, são denominados de macrominerais, no qual estão presentes o cálcio, cloro, fósforo, potássio e o sódio.

Os elementos-traço ou microminerais são minerais que correspondem a quantidades menores que 0,01% da composição corporal. Dos elementos-traço, nove são considerados essenciais, como cobalto, cobre, cromo, iodo, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco<sup>12</sup>. Existem especulações sobre outros minerais, denominados de “novos microminerais”, descobertos desde 1990, como o alumínio, arsênio, boro, bromo, cádmio, chumbo, estanho, flúor, germânio, lítio, níquel, rubídio, silício e vanádio, que são considerados essenciais para algumas espécies <sup>13</sup>.

Um aspecto fundamental que deve ser ressaltado relaciona-se aos valores de ingestão diários de referências de minerais essenciais na nutrição humana, tais como, Cu, Fe, Mn e Zn. Segundo a Food and Drug Administration (FDA) a quantidade recomendada para Cu, Fe, Mn e Zn corresponde a 2, 18, 2 e 15 mg/Kg de massa corpórea, respectivamente<sup>14</sup>.

O manganês é um constituinte essencial do corpo humano, uma vez que está envolvido na ativação de enzimas e na formação de ossos e cartilagens. Este mineral é absorvido no intestino delgado e para ser transportado deve estar ligado a uma macroglobulina e transferrina. A deficiência deste mineral em seres humanos é bem estabelecida, tendo como os principais sintomas a perda de peso, dermatite temporária e, ocasionalmente, náusea e vômito, uma

alteração na cor do cabelo e crescimento lento de cabelo e pêlos<sup>15</sup>. De acordo com Hendler<sup>16</sup>, as melhores fontes de manganês na alimentação são os grãos integrais, nozes, frutas e hortaliças frescas. Porém, no caso de elevados índices de manganês, do ponto de vista toxicológico<sup>17, 18</sup>, deve-se suspeitar de exposição ocupacional (metalurgia e mineração), caracterizando seu potencial tóxico, resultando em anorexia, fraqueza, apatia, “loucura mangânica”, manias, comportamento violento, tremores simulando Parkinson e depressão<sup>19</sup>.

O zinco é largamente encontrado na natureza. Dietas com altas concentrações em proteínas são ricas em zinco. Por outro lado, alimentos ricos em carboidratos normalmente apresentam baixa concentração desse elemento<sup>20</sup>. Este elemento é essencial para mais de 300 enzimas em muitas espécies. As enzimas dependentes de zinco participam no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos<sup>21</sup>.

A importância do zinco na nutrição humana tem sido reportada desde 1934<sup>22</sup>, o qual é considerado um elemento-traço essencial para o homem, pois está associado à produção de insulina, componente de mais de 90 enzimas relacionadas com catálise ácido-base e está relacionado com a síntese do DNA e RNA. A deficiência deste metal no organismo pode provocar retardo no crescimento das crianças, falta de apetite, lesões de pele, alopecia, dificuldades de cicatrização, etc. A ingestão de grandes quantidades deste metal resulta em febre, náuseas, vômitos e diarreia.

O ferro é um metal de transição, considerado um micronutriente essencial para os humanos desde 1860. A extensão da sua utilidade biológica está na capacidade de existir em diferentes estados de oxidação e de formar muitos compostos na forma de complexos<sup>23</sup>. Constituinte da hemoglobina, o ferro é requerido para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, estando assim, ligado diretamente no processo de respiração celular<sup>24, 25</sup>. Os compostos de ferro presentes no organismo humano podem ser agrupados em duas categorias: os que exercem funções metabólicas ou enzimáticas (hemoglobina, mioglobina e enzimas) e os associados com o ferro de reserva. O ferro catalisa

a produção de radicais livres através da reação de Fenton, induzindo a peroxidação lipídica. Para exercer sua ação catalítica, o íon férrico precisa ser liberado da proteína que o carrega e reduzido para  $Fe^{2+}$ , a forma ferrosa. O ferro corporal é encontrado em maior proporção na hemoglobina, e em menor na mioglobina, na transferrina e na ferritina. Radical superóxido ( $O_2$ ) é capaz de reduzir o  $Fe^{3+}$ , ligado à ferritina, a  $Fe^{2+}$ , que então é liberado e se torna disponível para catalisar uma reação de oxidação autopropagativa <sup>26, 27</sup>. Estudos de Salonen *et al* <sup>28</sup> forneceram as primeiras evidências em humanos de que a sobrecarga de ferro, medida como concentrações elevadas de ferritina, é fator de risco para doença coronariana isquêmica. Hirano *et al.* <sup>29</sup> verificaram que a incubação de homocisteína com íons férricos resulta em peroxidação lipídica semelhante à causada por homocisteína e íons cúpricos. Aproximadamente 67% do ferro total presente no organismo se encontra na hemoglobina, que é constituída por quatro subunidades, sendo que cada subunidade está associado a um grupo heme. Essa molécula tem somente quatro átomos de ferro, considerados essenciais, pois quando combinados com o oxigênio em nível dos pulmões, estes são liberados nos tecidos <sup>30,31</sup>. O ferro atua também em processos metabólicos, como na síntese de purinas (compostos estruturais do DNA e RNA), carnitina, colágenos e neurotransmissores (dopamina, serotonina e norepinefrina) <sup>31</sup>.

As funções do cobre estão ligadas a utilização do ferro na síntese de hemoglobina, absorção de ferro do intestino delgado e mobilização do ferro nos tecidos. A oxidação do ferro permite que ele se ligue a proteína que o transporta. O cobre é essencial para síntese da camada de mielina que recobre o sistema nervoso central. Uma amino-oxidase que contém cobre (lisil oxidase) está envolvida nas ligações cruzadas de cadeias polipeptídicas na elastina e colágeno. Enzimas contendo cobre são necessárias na conversão de tirosina e requerem cobre para ter atividade biológica. O cobre está envolvido na formação de tecido ósseo e reprodução <sup>32</sup>. Não se deve ter níveis de molibdênio superior a 3 mg/L da dieta total, pois esse mineral reduz a absorção



do cobre, pela formação do tiomolibdato de cobre <sup>33</sup>. A deficiência manifesta-se com os seguintes sintomas: ataxia, incoordenação muscular, paralisia parcial, anemia, redução no crescimento, despigmentação, fragilidade óssea, diarreia e perdas reprodutivas <sup>33</sup>.

### 3.2 Biodisponibilidade dos minerais

Um dos fatores que interferem na biodisponibilidade dos minerais diz respeito às interações que ocorrem entre os mesmos <sup>34</sup>. De acordo com Couzi *et al.*<sup>34</sup>, as interações podem ser diretas ou indiretas. As diretas são geralmente fenômenos competitivos que ocorrem durante a absorção intestinal ou utilização tecidual, enquanto que as indiretas ocorrem quando um mineral está inibindo o metabolismo do outro, de maneira que a deficiência de um acarreta em prejuízo da função do outro <sup>34</sup>.

Algumas interações parecem estar bem estabelecidas e, sob algumas circunstâncias, podem ter implicações profundas na saúde humana <sup>34</sup>. Com tudo deve-se considerar que uma simples presença de um mineral na fórmula ou dieta não garante a sua absorção pelo organismo, pois estes possuem várias interações entre si. A biodisponibilidade deles, ou seja, a proporção de nutrientes que é realmente utilizada pelo organismo, depende de vários fatores, tais como, a forma química que eles se encontram, a quantidade na dieta e a matriz que ele está incorporado como, fitatos, oxalatos, entre outros <sup>35</sup>.

O metabolismo dos minerais não pode ser considerado separadamente, pois fatores fisiológicos e nutricionais podem interferir na absorção, no transporte e no armazenamento. Dessa forma, pode ocorrer tanto deficiência, por má absorção, quanto toxicidade, devido ao acúmulo do produto no organismo <sup>36</sup>.

### 3.2.1 Biodisponibilidade do Zinco

Existem muitos fatores que podem modificar a absorção de zinco, sendo que estes podem ser considerados como ativadores ou inibidores deste processo de absorção.

Entre os ativadores da absorção do zinco estão o citrato e aminoácidos como glicina, histidina, lisina e metionina. Encontram-se também o ácido picolínico, secretado pelo pâncreas e a vitamina B<sub>6</sub> que aumenta a secreção de ácido picolínico. Entre os inibidores da absorção do zinco estão os ácidos oxálico e fítico, taninos, fibra, selênio, ferro e cálcio. A eficiência do processo de absorção deste mineral está entre 15 a 40%, portanto, o zinco é pouco absorvido, sendo excretado em grandes proporções pelas fezes. Por outro lado, na forma orgânica, o zinco está protegido do ácido clorídrico e passa para o duodeno, onde é eficientemente absorvido pelas células da mucosa, carregadas negativamente. Os complexos orgânicos são prontamente absorvidos para a corrente sanguínea, tornando-os altamente biodisponíveis às necessidades orgânicas e funcionais.

Os resultados da biodisponibilidade de zinco utilizando fontes orgânicas e inorgânicas são variados. Pimentel *et al.*<sup>37</sup> não observaram diferença na biodisponibilidade de zinco, na forma de zinco metionina, quando comparado com a forma inorgânica de zinco. Entretanto Wedekind *et al.*<sup>38</sup> realizando estudo sobre a biodisponibilidade de diversas fontes de zinco, observou uma biodisponibilidade do metal de 117%, na forma de zinco metionina, em uma dieta purificada, 177% em uma dieta com soja isolada e 206% em uma dieta composta por milho e soja, comparada com 100% de biodisponibilidade do zinco para o sulfato de zinco.

### 3.2.2 Biodisponibilidade do Ferro

Segundo Underwood<sup>39</sup>, a absorção de ferro é afetada pela idade, níveis de ferro no organismo, condições do trato intestinal (sítios de absorção),

quantidade e forma química do ferro ingerido e quantidade e proporção de outros minerais e compostos na dieta, os quais podem interagir com o ferro. Os metais bivalentes que afetam a absorção de ferro na dieta são o cobre, manganês, cobalto, cádmio, os quais podem competir pelo sítio de absorção do ferro. Poucos estudos foram conduzidos para determinar a biodisponibilidade de fontes orgânicas de ferro. Spears *et al.*<sup>40</sup> comparando fontes de ferro metionina com fontes inorgânicas concluíram por meio da concentração de hemoglobina que a biodisponibilidade do ferro orgânico foi de 180% quando comparado às formas inorgânicas consideradas como 100%. Geralmente, os resultados são pobres quando se utilizam fontes inorgânicas. Por outro lado, a utilização de ferro na forma de quelatos tem melhorado o nível de ferro hepático, formação de hemoglobina e o crescimento dos recém-nascidos<sup>41</sup>. Uma possível explicação para estes resultados é que o ferro na forma de quelato passa melhor pelas barreiras placentárias e mamárias.

### 3.2.3 Biodisponibilidade de Manganês

Com base na deposição óssea, Baker e Halpin<sup>42</sup> não observaram diferença na biodisponibilidade de fontes organometálicas e inorgânicas de manganês. Entretanto, Henry *et al.*<sup>43</sup> observaram que a biodisponibilidade da fonte orgânica de manganês foi significativamente maior do que as fontes inorgânicas (óxido e sulfato de manganês). Comparando a biodisponibilidade do quelato de manganês ao óxido de manganês, em dieta composta por milho e farelo de soja, Fly *et al.*<sup>44</sup> verificaram que a forma orgânica apresentou biodisponibilidade de 147% comparada a forma de óxido (100%). Compilando dados sobre a biodisponibilidade de fontes de manganês, Ammerman *et al.*<sup>45</sup> concluíram que a biodisponibilidade relativa para o manganês- metionina (Mn-metionina) e manganês proteinado foram de 120 e 110%, respectivamente, quando comparadas ao sulfato de manganês (100%).

### 3.2.4 Biodisponibilidade do cobre

Um aumento na biodisponibilidade do cobre de fontes orgânicas, comparadas às fontes inorgânicas foi observado por Baker *et al.*<sup>46</sup> por meio de comparações da quantidade de cobre acumulado no fígado. Aoyagi e Baker<sup>47</sup> também demonstraram uma melhor biodisponibilidade do cobre na forma orgânica, principalmente devido à molécula do quelato proteger o mineral contra interações com outras substâncias como a L-cisteína e glutathione redutase, que são capazes de reduzir a absorção de cobre no intestino. Em outro estudo, Aoyagi e Baker<sup>47</sup> concluíram que a biodisponibilidade aparente do quelato de cobre foi de 120% quando comparada à forma inorgânica de sulfato de cobre (100%). Guo *et al.*<sup>48</sup> verificaram uma biodisponibilidade de 111% e 109% para cobre lisina e cobre proteínato, respectivamente, quando comparados com o sulfato de cobre (100%).

### 3.3 Fatores que interferem na biodisponibilidade de alguns minerais

O tanino, um adstringente encontrado em certos vegetais, possui a capacidade de ligação às proteínas inibindo enzimas digestivas e reduzindo a biodisponibilidade do ferro e da vitamina B12. Em altas doses pode lesar a pele, principalmente o epitélio, e o fígado. Dá coloração amarronzada em muitos vegetais quando são cortados. Está presente em altas doses no chá, no café, no chocolate, nas bananas, no espinafre, na chicória, na maçã, no ruibarbo, na cebola, na uva, no milho e na cenoura<sup>49</sup>.

Outros inibidores da absorção e da biodisponibilidade do ferro são as substâncias fenólicas como os polifenóis, os fitatos dos cereais (os mais importantes inibidores) e fibras como a celulose, hemicelulose e lignina, a albumina da clara (a retirada da clara pode aumentar em mais de 10% a absorção do ferro) do ovo, a fosfitina da gema do ovo, as proteínas das leguminosas e elementos inorgânicos como cálcio, manganês, cádmio, cobre e

cobalto. Um dos mais importantes capítulos dos fatores antinutricionais são os inibidores das enzimas (substâncias, que são capazes de modificar a velocidade de uma reação química, servindo como catalisadores biológicos).

A caseína, proteína do leite, inibe a absorção do zinco, o mesmo ocorrendo com o fitato.

Dois outros antagonistas dos minerais encontrados em muitas plantas é o ácido oxálico, ácido orgânico dicarboxílico, que se liga firmemente ao cálcio e outros minerais-traços não deixando que sejam aproveitados pelo organismo. É encontrado em maiores quantidades em chás, no ruibarbo, no espinafre e em menores teores na beterraba, nos morangos, no nabo, ervilha, alface e na beterraba.

O ácido fítico derivado do ácido fosfórico é abundantemente encontrado nos cereais, legumes e sementes de oleaginosas. É um forte quelante, substâncias químicas que se ligam firmemente os metais como ferro, cálcio e zinco formando complexos inaproveitáveis para os seres humanos. Os quelantes também atuam para remover substâncias tóxicas do organismo e são usados em muitos medicamentos como o ferro quelato. O ácido fítico é encontrado em legumes, grãos de cereais, tanto no germe como no farelo, noz e, em menor quantidade, nos feijões verdes, cenoura, brócolis, batatas, batatas doces e morangos.

O EDTA, um aditivo alimentar, também apresenta sua função inibidora de alguns minerais. Além disso, existe alguns minerais que influenciam na má absorção de outros minerais<sup>50</sup>.

### 3.4 Minerais Quelatados

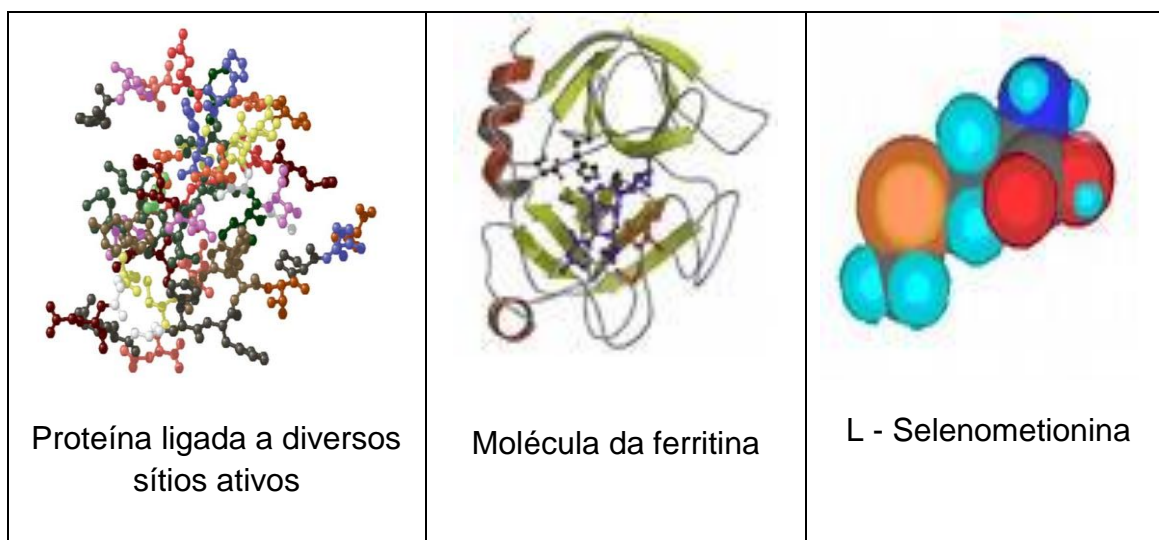
Os microminerais possuem baixa biodisponibilidade, o que segundo Mabe<sup>51</sup> pode estar relacionado com a formação de complexos com outras substâncias no trato digestivo diminuindo a solubilidade desses elementos, o que justifica o

interesse em explorar fatores que aumentem a absorção ou metabolização de elementos-traço.

Neste sentido, fontes quelatadas ou orgânicas de minerais têm sido utilizadas devido apresentarem maior biodisponibilidade. Os minerais quelatados ou orgânicos são assim denominados por serem constituídos por íons metálicos ligados a substâncias orgânicas.

São denominados quelatos, os compostos constituídos por íons metálicos que se ligam com substâncias orgânicas como aminoácidos, peptídeos ou complexos polissacarídeos que proporcionam a esses íons alta disponibilidade biológica, alta estabilidade e solubilidade <sup>52</sup>.

Os quelatos são o resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante. Ligante é a substância orgânica que está ligada ao metal <sup>53</sup>. O ligante geralmente é um ânion ou uma molécula que tenha um átomo com um par de elétrons com valências disponíveis. Os ligantes comuns contêm nitrogênio, oxigênio, enxofre, halogênios ou uma combinação deles devido às suas estruturas eletrônicas. Os ligantes são não- metálicos, portanto, orgânicos <sup>54</sup>. Na Figura 1 são apresentadas estruturas, representando minerais quelatados.



**Figura 1** – Minerais ligados a diferentes tipos de proteínas

Segundo Kratzer e Vohra <sup>55</sup>, o quelato é um complexo metálico, onde o metal apresenta mais ligações do que sua valência e este é ligado a um ligante doador. O complexo possui um átomo de um elemento no centro da molécula e um ligante ao seu redor. Quando o ligante possui mais de um átomo doador o complexo se torna um anel heterocíclico chamado de anel quelato.

Os minerais quelatados são definidos por Leeson e Summers <sup>56</sup> como sendo uma mistura de elementos que são ligados a algum tipo de carreador o qual pode ser um aminoácido ou polissacarídeo que possuem a capacidade de se ligar a metal por ligações covalentes através de grupamentos amino ou oxigênio, formando assim uma estrutura cíclica.

Por sua vez, Ensminger e Oldfield <sup>57</sup> definem que esses quelantes têm o papel de aumentar a absorção e a disponibilidade desse mineral no organismo, além de aumentar a sua estabilidade física reduzindo assim a tendência do micronutriente de se separar do alimento.

Segundo Leeson e Summers <sup>53</sup>, existem três grupos de quelatos que são reconhecidos pelo sistema biológico:

- ❖ **Grupo I:** Quelatos que servem de transportadores e de armazenamento para íons metálicos. Com este tipo de quelato o metal requer um ligante com propriedades químicas e físicas que o quelato é capaz de ser absorvido, transportado no sangue e passar pela membrana celular, enquanto o íon metálico é utilizado no local em que é exigido.  
Ex: aminoácidos, especialmente a cisteína e a histidina; etilenodiaminotetracético (EDTA).
- ❖ **Grupo II:** Quelatos que são essenciais no metabolismo. Há um número de quelatos no organismo com estrutura na qual o íon metálico está presente na forma quelatada, a qual é necessária para desempenhar funções metabólicas. A hemoglobina é um exemplo deste grupo de quelatos.

- ❖ **Grupo III:** Interferem na utilização de cátions essenciais e não possuem nenhum valor biológico. Dentre este o ácido fítico (quelato de zinco) que pode interferir com o metabolismo normal por tornar esse mineral essencial indisponível para as funções metabólicas.

#### 3.4.1 Formação dos Minerais Quelatados

Para a formação dos quelatos pode-se lançar mão de numerosas moléculas como ligantes que têm função específica no metabolismo. Elas são de baixo peso molecular e a capacidade oxidativa ou "ligante" depende do tamanho da molécula e da presença de radicais carboxílicos. As principais são os ácidos aminado, ascórbico, cítrico, glucônico e EDTA. Normalmente, um mineral pode fazer a ligação com uma, duas ou várias dessas moléculas para formar um "composto mineral organicamente ligado" ou quelato, podendo assim ser vendido como fonte de mineral. A afinidade de um quelato com o íon metálico pode ser expressa quantitativamente como sendo uma constante de estabilidade. Na Tabela 1 são apresentadas relações de constantes de estabilidade de alguns ligantes. Observa-se que os quelatos formados com o cobre possuem a maior constante de estabilidade e que para cada ligante a estabilidade dos quelatos varia em ordem decrescente para o cobre, níquel, cobalto, ferro, manganês e magnésio, respectivamente.



**TABELA 1:** Constante de estabilidade de alguns quelatos comuns (relação 1:1 de Ligante e íon metal H<sub>2</sub>O a 20°C)

Ligante	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Glicina	8,5	6	5	5	4	3	2
Cisteína	-	10	10	-	6	4	4
Histidina	10,5	9	7	7	5	4	4
Histamina	10	7	5	5	4	-	-
EDTA	19	18	16	16	14	13,5	9
Guanosina	6	4	4,5	3	4	3	-
Ácido oxálico	6	5,5	5	4,5	4,5	4	3
Ácido salicílico	11	7	7	7	6	6	-
Tetraciclina	8	6	5	5	5	4	4

Fonte: Leeson e Summers (2001)

A "Association of American Feed Control Officials" – AAFCO<sup>58</sup> define esses produtos minerais orgânicos da seguinte forma:

- ❖ **Quelato metal-aminoácido** é resultante da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos na proporção molar, isto é, um mol do metal para um a três moles (preferencialmente dois) de aminoácidos na forma de ligação covalente coordenada. O peso molecular médio dos aminoácidos hidrolisados pode ser, aproximadamente, de 150 dáltons e o peso molecular resultante do quelato não deve exceder a 800 dáltons;
- ❖ **Complexo aminoácido-metal** é resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácido(s);
- ❖ **Metal (Complexo aminoácido específico-metal)** é resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico;
- ❖ **Metal proteinado** é resultante da quelação de um sal solúvel com uma proteína parcialmente hidrolisada;
- ❖ **Complexo metal-polissacarídeo** é resultante da complexação de um sal solúvel com polissacarídeo.

### 3.4.2 Absorção dos quelatos

As fontes minerais, mais comumente utilizadas na nutrição são as inorgânicas como sulfatos, fosfatos, carbonatos, cloretos e óxidos. Quando estas fontes chegam ao estômago, ocorre uma dissociação das moléculas, liberando os íons metálicos como  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e entre outros <sup>59</sup>.

No intestino, o transporte dos íons para o interior das células dá-se pela difusão passiva ou pelo transporte ativo, ou seja, para que esses íons sejam absorvidos, e atinjam a corrente sangüínea, órgãos e tecidos, eles necessitam estar atrelados a um agente ligante ou molécula transportadora, que permita a passagem através da parede intestinal. Muitas vezes estes íons não encontram o agente ligante e acabam sendo excretados. Nessas condições podem ocorrer perdas pela reação com compostos, como colóides insolúveis ou no processo de competição pelos sítios de absorção entre os elementos minerais, com interações antagônicas que inibem a absorção <sup>60</sup>.

Existe também um efeito de inibição da absorção de minerais por outras substâncias ou nutrientes quando apresentadas nas formas inorgânicas, dentre elas o ácido oxálico e fítico, taninos, fibras e entre outras. Por sua vez, os minerais quelatados apresentam absorção superior aos inorgânicos, pois geralmente, usam as vias de absorção das moléculas orgânicas que se ligam a eles, o que faz com que não tenham problemas de interações com outros minerais.

A absorção dos minerais quelatados pode ocorrer sob duas formas: o mineral pode ser ligado à borda em escova sendo absorvido pela célula epitelial ou como ocorre na maioria das vezes onde o agente quelante é absorvido levando junto consigo o metal <sup>55</sup>.

Segundo Kratzer e Vohra <sup>55</sup>, o mecanismo pelo qual o agente quelante melhora a atuação do mineral, depende da capacidade do ligante em seqüestrar o mineral, ou de sua habilidade em competir com outros ligantes, formando complexos solúveis com o mineral.

Para Clydesdale <sup>61</sup>, um ligante forma um composto solúvel com o mineral sendo com isso melhor absorvido pela mucosa intestinal. Conforme Spears <sup>62</sup>, o ligante pode formar um complexo estável no trato intestinal, evitando com isso que o mineral forme complexos insolúveis, dificultando a sua absorção. No caso dos aminoácidos quelatados, o elemento mineral metálico na molécula é quimicamente inerte por causa da forma de ligação. Esta ligação é estável, não sofrendo dissociação das moléculas quando atingem o estômago.

No jejuno, o aminoácido do mineral quelatado, age como agente transportador, permitindo a passagem do mineral através da parede intestinal para a corrente sanguínea (diretamente para o plasma). A separação do aminoácido quelante dá-se no local onde o elemento mineral metálico será utilizado <sup>63</sup>.

### 3.4.3 Biodisponibilidade dos quelatos

A biodisponibilidade também pode ser definida como a fração do mineral que realmente é absorvida e utilizada pelo organismo <sup>59</sup>.

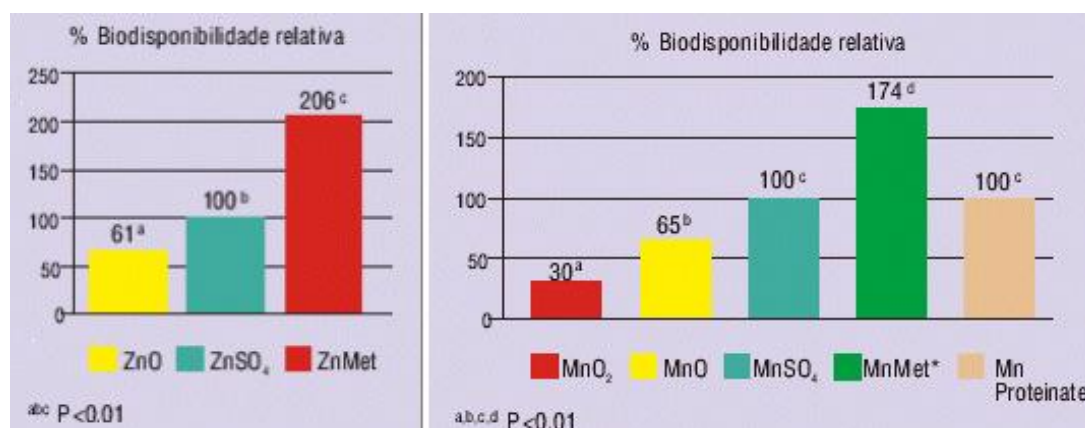
Existem muitos fatores que influenciam a biodisponibilidade dos minerais, especialmente dos minerais - traço, tais como: nível de consumo do mineral, forma química, digestibilidade da dieta, tamanho da partícula, interações com outros minerais e nutrientes, agentes quelantes, inibidores, qualidade da água, condições de processamento e idade <sup>64</sup>.

A partir da observação dos resultados de estudos nos últimos 20 a 30 anos torna-se claro a superioridade de biodisponibilidade dos quelatos quando comparados aos sais. Entretanto, qualquer avaliação que queira realçar a biodisponibilidade como característica de importância dos quelatos deve ter fontes mais solúveis; como os sulfatos, como parâmetro de comparação, uma vez que a disponibilidade de cobre e zinco a partir de óxidos é mínima para aves e suínos <sup>46, 66, 67</sup>.

Além disso, as respostas aos minerais quelatados são mais aparentes quando os níveis de fitatos das dietas são elevados <sup>38</sup>.

Desta forma, a vantagem dos minerais quelatados sobre as fontes inorgânicas pode não ser tão evidente em todas as situações, o que pode confundir a interpretação dos resultados. Da mesma forma, quando oferecidos na forma inorgânica, os minerais passam a ter forte interferência entre si. Em geral a biodisponibilidade dos minerais na forma quelatada é dependente de três condições básicas na estrutura do composto:

- a) Da forma de ligação com o metal** - Nos quelatos formados com dois ou três aminoácidos, o íon metálico fica inerte na molécula, entrando com facilidade nas vias metabólicas, pois assume a característica da molécula orgânica;
- b) Do peso molecular do quelato** - O baixo peso molecular é a chave para a absorção como molécula intacta. Se o peso molecular de um quelato for maior do que 800 dáltons, certamente sofrerá prévia hidrólise na luz do trato digestivo e a absorção pela mucosa não será garantida <sup>58</sup>;
- c) Da constante de estabilidade do quelato** - Deve ser constituído de dois ou três anéis de aminoácidos quelantes para serem estáveis. Se a constante de estabilização dos aminoácidos é grande, estes irão resistir à ação de peptidases que quebram as ligações peptídicas internas, liberando o átomo de metal na molécula <sup>63</sup>. Além disso, a biodisponibilidade dos minerais também varia de acordo com o tipo de fonte mineral (Figura 2).



**FIGURA 2:** Biodisponibilidade relativa de fontes de zinco e manganês. Adaptado de Polli (2002).

### 3.5 Frutas da região amazônica

Algumas frutas de origem amazônica, como a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*) e açaí (*Euterpe oleracea Mart*) são hoje amplamente comercializados em todo o mundo, e algumas delas ainda são produzidos em diferentes continentes longe da América do Sul. No entanto, muitos outros frutos são consumidos apenas a nível local ou regional e sua composição química ainda é desconhecida. O interesse em frutas regionais tem aumentado bastante nos últimos anos, por causa da incessante busca de novos produtos e sabores exóticos e, por outro lado, devido a sua produção e comercialização que são considerados uma boa maneira de aumentar a renda do pequeno produtor. Neste contexto, dados da composição mineral são necessários como uma primeira indicação do valor nutritivo das frutas amazônicas <sup>1,2</sup>.

#### 3.5.1 Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea Mart.*) é nativo da Amazônia brasileira e o Estado do Pará é o principal centro de dispersão natural dessa palmácea.

Populações espontâneas também são encontradas nos Estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e em países da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana) e da América Central (Panamá) <sup>67, 68</sup>.



**Figura 3** – Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

O açazeiro se destaca, entre os diversos recursos vegetais, pela sua abundância e por produzir, importante alimento para as populações locais, além de ser a principal fonte de matéria-prima para a agroindústria de palmito no Brasil <sup>69, 70</sup>.

Também ocorre em áreas de terra firme, principalmente quando localizadas próximas às várzeas e igapós.

Dos frutos do açazeiro é extraído o vinho, polpa ou simplesmente açai, como é conhecido na região. Com ele são fabricados sorvetes, licores, doces, néctares e geléias, podendo ser aproveitado, também, para a extração de corantes e antocianina <sup>71</sup>.

O caroço, do qual a borra é utilizada na produção de cosméticos, as fibras em móveis, placas acústicas, compensados, indústria automobilística, entre outros. A polpa representa 15% e é aproveitada, de forma tradicional, no consumo alimentar, sorvetes e outros produtos derivados <sup>72</sup>.

O açaí é considerado um alimento de elevado valor calórico, com alto percentual de lipídeos, e nutricional, pois é rico em proteínas e minerais <sup>73</sup>.

### 3.5.2 Bacurí

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie arbórea nativa da Amazônia Oriental Brasileira <sup>75, 76, 73</sup>. Os frutos dessa Clusiaceae ocupam posição de destaque na preferência dos consumidores dos Estados do Pará, Piauí e Maranhão, onde se encontram densas e diversificadas populações naturais <sup>77</sup>. Sendo o bacurizeiro uma árvore de usos múltiplos (fruto, madeira, látex) e com alto valor econômico, deve ser mantido em seu ambiente natural, bem como ser plantado ou manejado em áreas degradadas.

Existe pouca informação sobre a composição química de *P. insignis*, sendo que os estudos existentes referem-se à composição da polpa do bacuri e sementes <sup>77, 78</sup>.



**Figura 4 – Bacuri (*Platonia insignis* Mart.)**

O seu desenvolvimento é ideal em áreas litorâneas, não exigindo grandes cuidados operacionais e possibilitando o cultivo de baixo custo em virtude do aproveitamento de solos desgastados por culturas anuais. Sua propagação ocorre pelas sementes ou por brotações que surgem, espontaneamente, nas

raízes das plantas adultas<sup>80, 79, 73</sup>. Alguns tipos, de ocorrência rara, apresentam frutos desprovidos de sementes<sup>77</sup>, os quais têm despertado pouco interesse, pois apresentam tamanho diminuto e baixo teor de sólidos solúveis totais na polpa<sup>81</sup>. A polpa do bacuri é muito utilizada na alimentação para a produção de sucos, sorvetes, musses, dentre outras formas.

### 3.5.3 Castanha-do-pará

A castanha-do-pará ou castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é a semente da castanheira, uma árvore da família botânica Lecythidaceae, nativa da Floresta Amazônica que chega a atingir entre 30 a 45 metros de altura. Ela ocorre em árvores espalhadas às margens do Rio Amazonas, Rio Negro, Rio Orinoco, Rio Araguaia e Rio Tocantins.



**Figura 5** – Castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*)

As sementes ou “castanhas” são de forma angulosa, tendo no seu interior a “amêndoa”, de alto valor econômico e nutricional. O “ouriço” permanece na árvore por 15 meses, quando chega a pesar cerca de 1,5 Kg<sup>82</sup>.

Seu valor biológico é grande para fins alimentícios, pois contém em torno de 17% de proteína – cerca de cinco vezes o conteúdo protéico do leite bovino in natura. Seu teor de gordura é extremamente elevado, em torno de 67%, com



somente 7% de carboidrato (fibras), além das vitaminas A, C, B1, B2 e B5. Rica em fósforo e cálcio é o alimento do planeta mais rico em selênio.

Alguns estudos mostraram que essa oleaginosa ajuda a prevenir câncer, esclerose múltipla e mal de Alzheimer. Sua fração oleosa é rica em ácido graxo monoinsaturado (48%) sendo indicados na prevenção de doenças cardiovasculares, controles glicêmicos e de peso. Fonte riquíssima de selênio, a castanha-do-pará cuida da força do sistema imunológico, ou seja, na prevenção do câncer, ajuda no equilíbrio do hormônio ativo da tireóide e age como antioxidante, protegendo o organismo contra os danos provocados pelos radicais livres <sup>83</sup>.

#### 3.5.4 Cupuaçu

A fruta *Theobroma Grandiflorum*, mais conhecida como cupuaçu, é nativa da Amazônia Oriental, sendo consumida em larga escala em toda a região norte do Brasil <sup>84</sup>. O cupuaçuzeiro é uma árvore do bosque tropical úmido atingindo até 18 metros de altura, sendo cultivado desde o estado de São Paulo, no Sudeste, até Roraima, no extremo norte do País. Mas outros países como Equador, Guiana, Martinica, Costa Rica, São Tomé, Trinidad e Tobago, Gana, Venezuela e Colômbia também cultivam o cupuaçu. Polpa e sementes são as partes mais utilizáveis do fruto <sup>85</sup>.



**Figura 6** – Cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*)

Da polpa, são produzidos sucos, cremes, doces, compotas, sorvetes, biscoito e iogurtes, além de licores deliciosos. Das sementes o mundo pôde conhecer o "cupulate", um subproduto que tem características nutritivas, sabor e aroma parecidos ao chocolate. Ele pode ser produzido tanto em pó como em tabletes <sup>86</sup>. Em termos nutricionais, a polpa do cupuaçu é pobre em proteínas e gorduras, mas apresenta uma grande quantidade de fósforo, cálcio e vitamina C. Já as sementes são ricas em proteínas, gorduras, carboidratos e fibras <sup>87</sup>.

### 3.5.5 Pupunha

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma planta perene, nativa da Amazônia, que possui grande importância econômica para a região, sendo cultivada para produção de frutos e palmito, tanto em monocultivo como em sistemas agroflorestais.

A pupunha, da família das Palmáceas, foi cultivada pelos ameríndios pré-colombianos na região neotropical úmida. Atualmente, essa espécie encontra-se distribuída desde Honduras até a Bolívia.



**Figura 7** – Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)

Seus frutos, de sabor muito apreciado, estão integrados nos hábitos alimentares da área que cobre os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará,

Maranhão, Mato Grosso, Rondônia e Roraima. Na região ainda predomina o consumo do fruto, mas a produção de palmito a partir do cultivo da pupunheira começa a aumentar, com plantios em escalas consideráveis no Pará, Acre, Rondônia e Mato Grosso.

A inflorescência aparece nas axilas das folhas senescentes. Após a polinização, os cachos podem conter entre 50 e 1000 frutos. Diversos fatores, tais como nutrição ou polinização deficiente, estiagem, competição, e ataque de insetos e doenças podem causar o aborto e contribuir para o baixo peso médio do cacho.

Floresce quase o ano inteiro, porém com maior intensidade durante os meses de agosto a dezembro. A maturação de seus frutos ocorre principalmente nos meses de dezembro a julho. Atualmente, sua importância como alimento e o seu potencial tecnológico têm sido incentivados através de pesquisas realizadas no Brasil, Colômbia, Peru e Costa Rica <sup>88</sup>.

### 3.6 Considerações sobre as proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes e importantes nas células e perfazem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares <sup>89</sup>. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada para uma função biológica diversa. Além disso, a maior parte da informação genética é expressa pelas proteínas.

Todas contêm carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, e quase todas contêm enxofre. Algumas contêm elementos adicionais, particularmente fósforo, ferro, zinco e cobre. Seu peso molecular é extremamente elevado <sup>90</sup>.

A proteína é um macronutriente com muitas funções. Fornecem aminoácidos, que são os elementos que compõem as proteínas e são usados para a formação de músculos e outros componentes do corpo que contêm

proteínas, incluindo imunoglobulinas, albumina, enzimas e hormônios. O organismo sintetiza aminoácidos não essenciais, enquanto outros que são essenciais precisam ser fornecidos por fontes alimentares. As proteínas e outros compostos contendo nitrogênio são constantemente degradados e reconstruídos. Todas essas perdas devem ser repostas por um suprimento contínuo de aminoácidos fornecidos pela dieta <sup>91</sup>.

As proteínas são responsáveis pela formação e manutenção dos tecidos celulares e pela síntese dos anticorpos contra infecções. Produzem ainda energia e ajudam na formação da hemoglobina do sangue e de variadas enzimas. Em casos de carência, a falta de proteínas causa debilidade, edemas, insuficiência hepática, apatia e até baixa das defesas do organismo. Em caso de excesso, existe o risco de acidificação sanguínea, gota e doenças renais e reumáticas <sup>92</sup>.

Nem todas as proteínas vegetais são iguais e as proteínas de soja são as únicas proteínas de base vegetal que têm uma qualidade protéica igual à da carne, leite e ovos. Essa proteína de alta qualidade vem em três formas principais para máxima flexibilidade nas aplicações alimentares: farinhas de soja, proteína concentrada de soja e proteína isolada de soja <sup>93</sup>.

### 3.7 Especificação Química

Recentemente, grandes esforços no campo da biologia e ciências ambientais têm sido centrados na área de especificação química. Cada vez mais, se tem confirmado que a mobilidade, disponibilidade e distribuição das espécies químicas, não dependem somente de suas concentrações, mas principalmente das associações químicas e físicas que ocorrem no ambiente. Mudança no ambiente quer seja de origem antropogênica ou natural, pode influenciar o comportamento tanto de elementos essenciais, como de elementos tóxicos através da alteração das formas com que estes se apresentam no meio <sup>94</sup>.

Nas recomendações da IUPAC 2000, o termo “espécie química” é definido como uma forma específica de um elemento definido com relação à composição isotópica, estado de oxidação ou eletrônico, e/ou estrutura molecular ou complexada. Foi estabelecida “análise de especiação” como a atividade analítica de identificação e/ou quantidade medida de uma ou mais espécie química individual, assim concluindo que “especiação” envolve a distribuição entre espécies químicas definidas em um sistema<sup>94, 95</sup>. Nas últimas décadas, um grande número de metodologias analíticas tem sido publicado para separação e determinação de diferentes espécies químicas de selênio<sup>96</sup>, cromo<sup>97</sup>, mercúrio<sup>98</sup>, arsênio<sup>99</sup>, entre outros, presentes em diferentes tipos de amostras.

Segundo, Takács e colaboradores<sup>100</sup>, a complexação do cobre pela matéria orgânica dissolvida pode alterar sua especiação e solubilidade. McGeer e colaboradores<sup>101</sup> evidenciaram que a complexação por substâncias húmicas aquáticas atenuou a biodisponibilidade do cobre para peixes submetidos à exposição crônica com o metal. No caso do cobre, sua disponibilidade à biota é governada pela presença do íon livre em solução<sup>102, 103</sup>. Howarth e Sprague<sup>104</sup>, por exemplo, observaram que a toxicidade do cobre para peixes está fortemente relacionada com a concentração do íon livre. Pagenkopf e colaboradores<sup>105</sup> e Sunda e Guillard<sup>106</sup> demonstraram que a toxicidade do cobre está relacionada à concentração do íon livre em solução e não a sua concentração total. Mais recentemente, entretanto, Meylan e colaboradores<sup>107</sup> avaliaram a acumulação de cobre por algas em resposta a mudanças na especiação do metal em águas superficiais e concluíram que a concentração intracelular de cobre variou em função da forma trocável do metal, ou seja, a somatória entre as concentrações do íon livre e de complexos inorgânicos fracos. Todos estes estudos evidenciam que a especiação de metais é, portanto, uma questão da maior relevância uma vez que seu conhecimento pode ter implicações diretas sobre aspectos ecotoxicológicos.

É bem sabido que elementos como Fe, Cu e Zn, apresentam afinidade com enxofre e por tanto tendem a formar complexos com aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos <sup>108</sup>.

A função de muitas biomoléculas e, em particular, metaloproteínas, criticamente depende de sua interação com os elementos, principalmente com metais de transição <sup>109</sup>. Algumas proteínas (por exemplo, metalotioneínas) são produzidas sob estresse de metais pesados durante a poluição como por exemplo a albumina e a transferrina, que são transportadores de íons de nutrientes essenciais, e atuam como ativadores de enzimas <sup>109</sup>.

A especiação de metais traço, em amostras ambientais, biológicas, industriais, requer o emprego de métodos de determinação com elevada sensibilidade e seletividade. Por isso métodos como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) <sup>110</sup>, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) <sup>111</sup>, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) <sup>112</sup>, e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) <sup>113</sup>, têm sido preferencialmente usados. Dependendo do analito de interesse, da matriz da amostra e da técnica utilizada, esses elementos podem ser quantificados em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ .

Técnicas cromatográficas baseiam-se na separação de componentes de uma determinada amostra presente em um solvente (fase móvel) devido as diferentes interações com a coluna, fase estacionária. A cromatografia de exclusão por tamanho fornece a separação em função do peso molecular dos compostos, sendo que não ocorre interação entre esses e a coluna. O mecanismo de separação é mecânico. Existem dois diferentes procedimentos de separações de exclusão por tamanho, a permeação e a filtração em gel. Na filtração em gel os componentes e a fase móvel são polares, enquanto na permeação deseja-se separar espécies apolares. O tamanho do poro da coluna é responsável pela separação dos compostos de uma amostra. As espécies de baixo peso molecular penetrarão nesses poros, tornando a eluição mais

demorada, tendo assim um maior tempo de eluição. O contrário ocorre com espécies de maior peso molecular <sup>114, 115, 116</sup>.

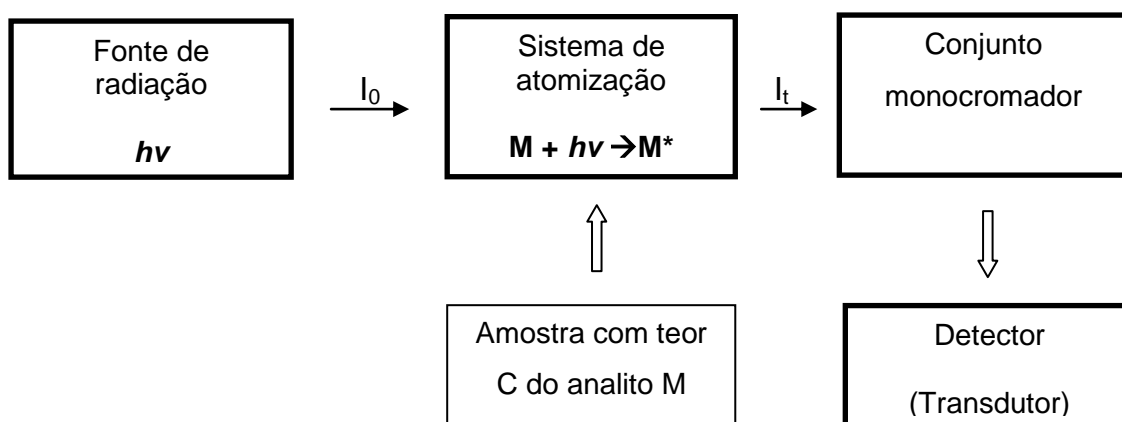
### 3.8 Técnicas analíticas

#### 3.8.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A constante busca por métodos analíticos capazes de proporcionarem, ao mesmo tempo, alta taxa de amostragem com baixo custo operacional, repetibilidade e reprodutibilidade apropriadas, limites de detecção da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou melhores, além de produzirem resultados com confiabilidade metrológica sem prejuízos ao ambiente e sem geração de resíduos (química limpa), representa elevado interesse para as indústrias de equipamentos, para os pesquisadores da área de química analítica (em especial), para os laboratórios de controle de qualidade e para as instituições responsáveis pelo monitoramento ambiental ou de outra natureza <sup>117</sup>. A espectrometria de absorção atômica com chama reúne quase todas estas características, mas os limites de detecção são inapropriados para a determinação de muitos analitos. Neste sentido, procedimentos automatizados, empregando-se injeção em fluxo para separação e/ou pré-concentração dos analitos em espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), tem sido apresentados como alternativas de sucesso, podendo ser aplicado para uma extensa variedade de amostras.

O método baseia-se na absorção de radiação eletromagnética, normalmente na região do visível e ultravioleta, por átomos neutros no estado gasoso <sup>118</sup>.

O espectrômetro de absorção atômica é um equipamento que permite a análise quantitativa de elementos metálicos em soluções líquidas, gasosas e sólidas <sup>119</sup>. Os componentes básicos de um espectrômetro incluem a fonte de radiação, sistema de atomização, conjunto monocromador, detector e processador (Figura 8).



**Figura 8** – Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica

A atomização pode ser feita em chama, em tubo aquecido acoplado a gerador de hidretos, através da geração de vapor frio e eletrotermicamente em forno de grafite, ou em outros sistemas alternativos.

### 3.8.2 Espectrofotometria UV - Visível

A Espectrofotometria é um dos métodos instrumentais de análise de espécies químicas. É o método de análise óptica mais usada nas investigações físico – químicas.

O espectrofotômetro (Figura 9) é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida por uma solução que contém uma concentração desconhecida do analito, selecionar o comprimento de onda da radiação adequada à análise de um determinado componente do analito, medir a intensidade  $I$  do feixe emergente que corresponde a um determinado feixe incidente  $I_0$ , convertendo o sinal recebido no detector em medida de absorbância para o comprimento de onda da análise e por fim determinar a concentração de várias soluções a partir do gráfico da variação de absorbância em função da concentração de várias soluções – padrão <sup>120</sup>.





**Figura 9:** Espectrofotômetro de feixe simples.

A espectroscopia de absorção molecular é baseada na medida da transmitância  $T$  ou absorbância  $A$  de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de  $b$ , dado em cm. A concentração  $c$  de um analito absorvente está relacionada linearmente com a absorbância, conforme representado na equação.

$$A = -\log T = \log P_0 / P = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A Lei de Beer se aplica a um meio contendo mais de uma espécie de substância absorventes. Esta lei é bem sucedida ao descrever o comportamento da absorção de meios contendo concentrações de analito relativamente baixas, neste sentido a Lei de Beer é limitada <sup>121</sup>.

Os componentes do instrumento são fonte, seletores de comprimentos de onda, recipientes para amostra, transdutores de radiação e processadores de sinal e dispositivos de leitura <sup>122</sup>.

O esquema abaixo mostra claramente o funcionamento de um Espectrofotômetro de feixe simples (Figura 10).

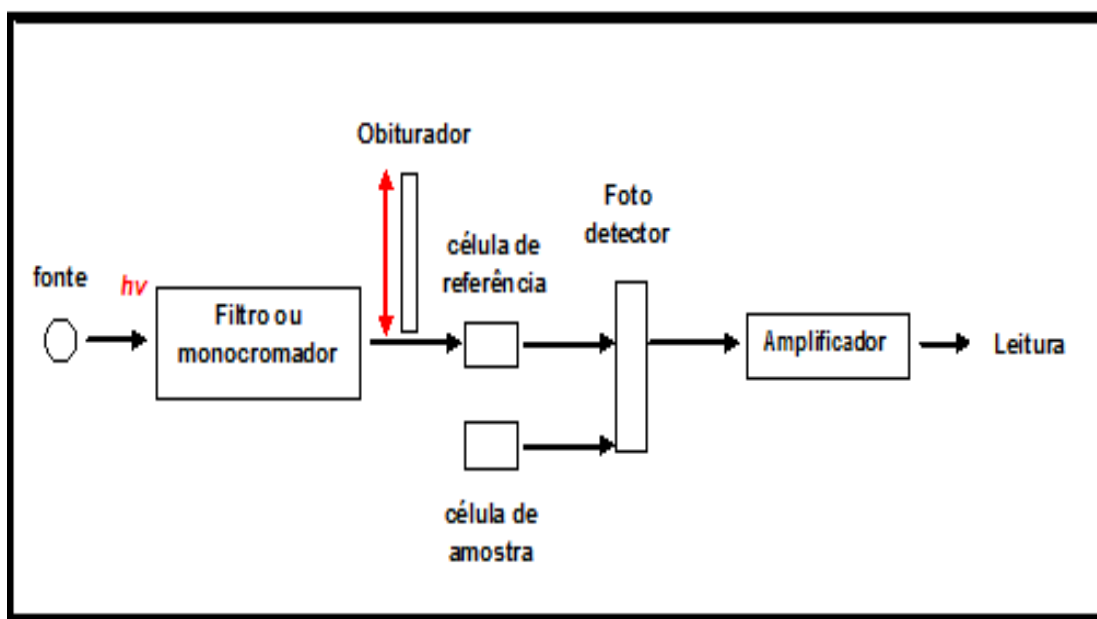


Figura 10: Esquema de um espectrofotômetro de feixe único.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Instrumentação

A determinação dos teores totais dos metais e nas proteínas de cada fração utilizando reagentes extratores foi realizada no Laboratório de Análises de Minerais da UFRA e foram conduzidas em um espectrômetro de absorção atômica com chama (SpectrAA 220, Varian) e sistema de aquisição de dados em plataforma Windows. Lâmpadas de catodo oco (HCL) de Cu, Fe, Mn e Zn foram usadas como fontes de radiação.

Os parâmetros instrumentais usados para a determinação de Fe, Cu, Mn e Zn por FAAS são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros instrumentais usados na determinação de Fe, Mn, Cu e Zn nas amostras de frutas por FAAS

<b>Parâmetros</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
Comprimento de onda (nm)	248,3	279,5	324,8	213,9
Corrente da lâmpada (mA)	10,0	5,0	7,0	5,0
Resolução espectral (nm)	0,5	0,2	0,5	0,5

Na digestão das amostras foi utilizado um bloco digestor Tecnal (Modelo TE-040/25-1).

Um espectrofotômetro de feixe simples com caminho ótico de 1 cm foi utilizado na determinação de proteínas totais nas amostras de amêndoas da castanha-do-pará e polpas de açaí, bacurí, cupuaçu e pupunha.

Na determinação do pH foi utilizado um peagâmetro (marca WTW, Modelo pH 330i).

Um agitador por efeito vórtex foi utilizado no procedimento de extração seqüencial.

Uma centrífuga (Centribio, modelo 80 – 2B) foi utilizada na separação das frações protéicas.

Um cromatógrafo líquido de alta resolução (Varian) equipado com válvula de injeção Rheodyne (Modelo 7125, Cotati, CA, EUA) e uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho foi utilizado na separação cromatográficas das proteínas presentes no extrato de açaí.

Um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (SpectrAA 220, Varian) equipado com amostrador automático (GTA 110), com corretor de fundo de lâmpada de deutério, tubo de grafite com aquecimento longitudinal (HGA Varian) e sistema de aquisição de dados em plataforma Windows foi usado na determinação de cobre. Lâmpada de catodo oco (HCL) de cobre foi usada como fonte de radiação. O gás argônio foi utilizado como gás de purga em uma vazão de 3 L min<sup>-1</sup> de argônio. Todas as medidas

foram obtidas por absorvância integrada (integração do sinal transiente de absorvância em função do tempo).

#### 4.2 Reagentes e Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Empregou-se água destilada - desionizada em sistema de purificação ELGA (resistividade 18,2 M $\Omega$ .cm), permitindo-se assim obter água com elevado grau de pureza. O ácido nítrico (Quimex, São Paulo, Brasil) utilizado na preparação das soluções analíticas e na digestão ácida, foi purificado em subdestiladores de quartzo (Marconi, modelo MA 075). Na digestão das amostras também foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quimex, São Paulo, Brasil). Os padrões dos elementos Fe, Cu, Mn e Zn foram preparados em meio HNO<sub>3</sub> 7,8 % (m/v). Ar e acetileno foram utilizados como gás oxidante (3,5 L/min) e combustível (1,5 L/min) na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

Os materiais plásticos de polietileno, vidrarias e as ponteiros das micropipetas após usados foram lavados com água, depois com água desionizada e, em seguida, foram imersos em um banho de solução de 10% (v/v) de HNO<sub>3</sub> por 24 h. Posteriormente, esses materiais foram lavados abundantemente com água desionizada e secos.

Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos de polietileno.

No procedimento de extração seqüencial foram utilizados CHCl<sub>3</sub> (Quimex, São Paulo, Brasil), CH<sub>3</sub>OH (Quimex, São Paulo, Brasil), NaOH (Synth, São Paulo, Brasil), HCl (Synth, São Paulo, Brasil), Tris-HCl (Sigma Aldrich) em pH = 8,0, SDS em Tris-HCl em pH = 8,0 (Sigma Aldrich). Acetona 80% (v/v) foi utilizada na precipitação das proteínas.

As amostras das frutas utilizadas neste trabalho foram coletadas no Mercado do Vêr-o-Peso, na cidade de Belém (PA).

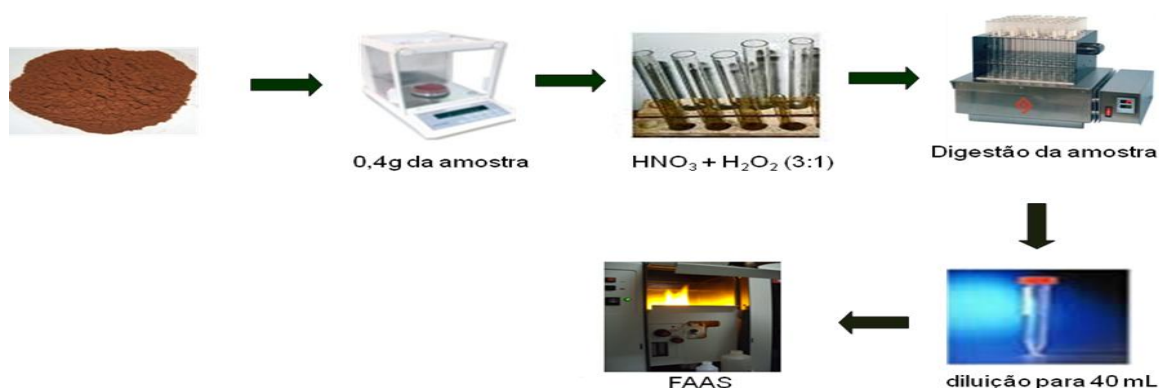
### 4.3 Procedimento analítico

#### 4.3.1 Preparo de amostras

As amostras (amêndoa da castanha-do-pará e polpas de açaí, bacurí, cupuaçu e pupunha) foram inicialmente secas em estufa a uma temperatura de aproximadamente 35 °C durante 3 dias, até peso constante. Em seguida, foram pulverizadas com o auxílio de um processador de alimentos. Após essa etapa, uma parte da amostra foi armazenada em frasco de polietileno, em temperatura ambiente no dessecador.

#### 4.3.2 Digestão das amostras

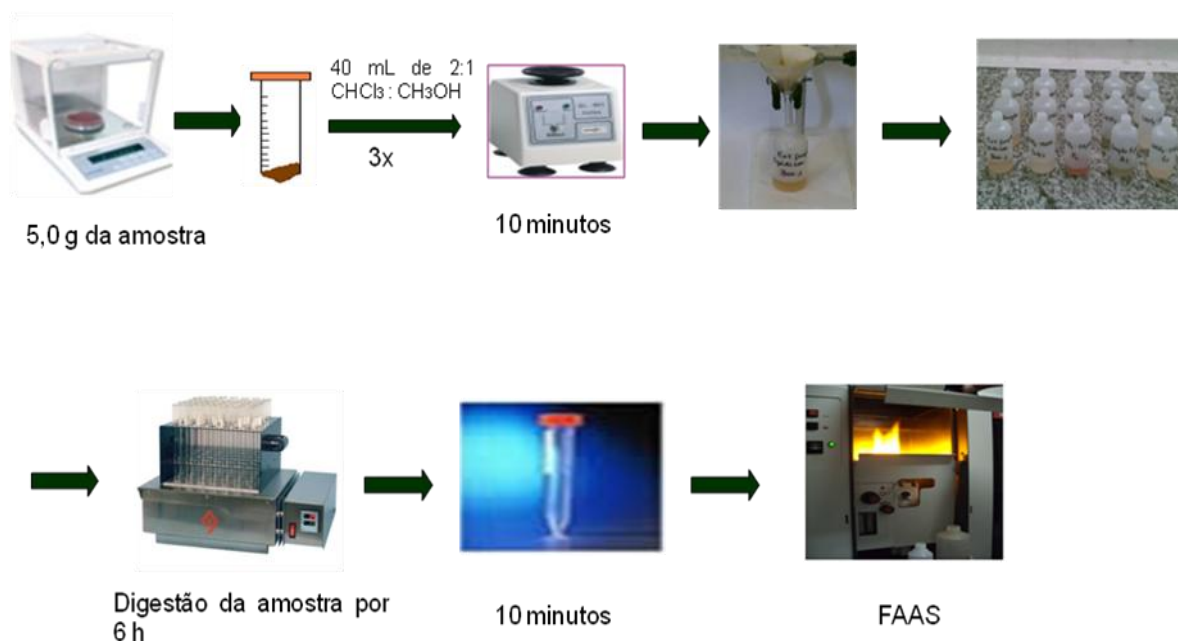
A digestão das polpas e amêndoas foram realizadas em triplicatas ( $n=3$ ). Sub-amostras de cerca de 0,4 gramas foram pesadas e transferidas para tubos de digestão, sendo em seguida adicionados 1,0 mL  $\text{HNO}_3$  concentrado (14,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ). A mistura foi mantida em *overnight*. Antes de ser colocado os tubos com a mistura no bloco digestor foram adicionados 2,0 mL  $\text{HNO}_3$  concentrado (14,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (m/m) e em seguida as amostras foram colocadas no bloco digestor a temperatura de 130 °C. Transcorrido 3 horas do início do processo de digestão, a temperatura foi elevada a 150 °C. Verificado a diminuição da formação de gases após 2 horas nesta temperatura e finalmente para garantir que toda gordura presente nas amostras fosse digerida, a temperatura foi elevada para 180 °C e mantida durante 1 h. Os tubos de digestão foram retirados do bloco e resfriados a temperatura ambiente. Após o resfriamento, os digeridos obtidos foram transferidos para frascos volumétricos e os volumes ajustados para 25 mL com água desionizada. O branco analítico foi preparado pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra. A acidez final foi de 7,8% (v/v). A figura abaixo ilustra o procedimento para a determinação total de Cu, Fe, Mn e Zn nos digeridos de açaí, bacurí, castanha – do – pará, cupuaçu e pupunha por FAAS.



**Figura 11:** Esquema referente ao procedimento de preparo de amostra para a determinação total de Cu, Fe, Mn e Zn nos digeridos de açai, bacurí, castanha – do – pará, cupuaçu e pupunha por FAAS

#### 4.3.3 Remoção da fração lipídica

A fração lipídica foi obtida pesando em frascos volumétricos uma massa de aproximadamente 5,0 g de cada amostra previamente pulverizada. Em seguida foram adicionados 40 mL da solução extratora de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e metanol (CH<sub>3</sub>OH) (2:1 v/v). O frasco contendo a solução extratora e a amostra foram submetidos a agitação por efeito vórtex durante 10 minutos. Este procedimento foi feito em triplicata ( $n= 3$ ). A separação dos sobrenadantes foi feita através de uma filtração simples. O sólido final foi seco em estufa a uma temperatura de 30 °C por 20 minutos. O sobrenadante rico em lipídeos foi submetido a evaporação à temperatura ambiente.. A fração lipídica obtida foi submetida a uma digestão ácida em bloco digestor como realizado para determinação total dos elementos estudados. Após a digestão, as soluções obtidas foram analisadas por FAAS. O procedimento de extração dos lipídeos é mostrado na Figura 12.



**Figura 12:** Extração das frações lipídicas.

#### 4.3.4 Extração seqüencial

Aproximadamente 1,0 g das amostras pulverizadas sem lipídeos foram pesadas em frascos de polietileno e 20 mL de solução extratora foram adicionadas. As soluções de NaOH 0,05 mol/L, HCl 0,05 mol/L, solução tampão de Tris-HCl (pH= 8,0) 0,05 mol/L, solução tampão de Tris-HCl (pH= 8,0) 0,05 mol/L em 1% (m/v) SDS e água à 60 °C foram empregadas como agentes extratores no procedimento de extração seqüencial.

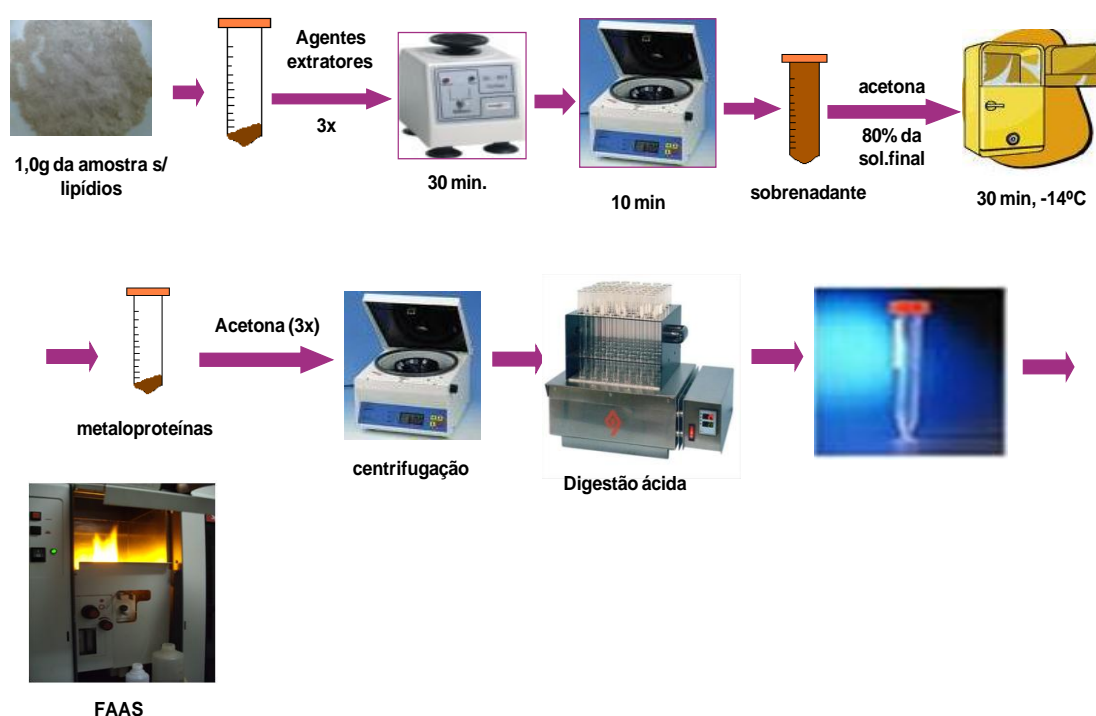
Para a extração de proteínas de alta massa molecular (HMW: high molecular weight) e baixa massa molecular (LMW: low molecular weight) foi utilizada uma solução de NaOH 0,05 mol/L. As proteínas de baixa massa molecular foram extraídas usando uma solução de HCl 0,05 mol/L. A solução tampão de Tris – HCl (pH = 8,0) e água desionizada à 60 °C foi usada na extração das proteínas solúveis. Com a adição de um surfactante aniônico à

solução de Tris – HCl (pH = 8,0), como o SDS (Dodecil sulfato de sódio), foram extraídas as proteínas insolúveis.

O resíduo da extração de NaOH foi submetido a extração com HCl e assim sucessivamente. Em seguida foram agitadas em vórtex por 30 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtros de *nylon* com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para a última extração foram adicionados 20 mL de água desionizada no resíduo e levados a banho Maria à 60 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm.

Para a purificação das frações durante a extração seqüencial, as proteínas foram precipitadas com 80% (v/v) de acetona a -14 °C durante 30 minutos. Os precipitados obtidos foram centrifugados durante 10 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi eliminado e os resíduos foram submetidos a uma digestão ácida conforme apresentado no item 4.2.2. O procedimento de extração seqüencial é apresentado na Figura 13.



**Figura 13:** Extração das frações protéicas

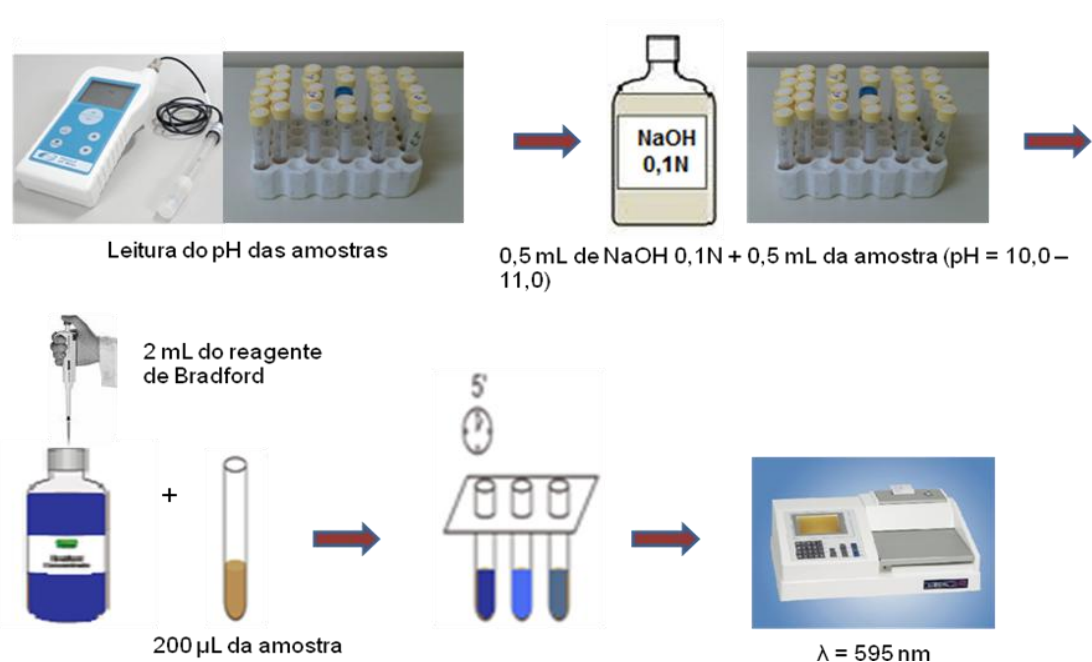


#### 4.3.5 Proteína total

Para a quantificação de proteínas nas diferentes frações protéicas obtidas durante a extração seqüencial das amostras de açaí, bacurí, castanha-do-pará, cupuaçu e pupunha foi utilizado o método de Bradford.

As amostras foram inicialmente submetidas à leitura de pH e posteriormente foi adicionado 0,5 mL da solução de NaOH 0,1 mol/L em 0,5 mL de cada amostra para obter um pH na faixa de 10,0 a 11,0. Após adição da solução de NaOH 0,1 mol/L, foi retirada uma alíquota de 200  $\mu$ L da amostra e acrescentado 2mL do reagente de Bradford. As amostras foram deixadas para reagir por um período de 5 minutos. Após este tempo a proteína foi quantificada através de um espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 595 nm (Figura 14).

O método de Bradford consiste em um método analítico simples, preciso e rápido sendo indicado para quantificação de proteínas. O principal componente do reagente é o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 que em solução ácida, ao ligar-se com proteínas apresenta absorvância alterada de 465 nm para 595 nm. A faixa de linearidade do método é de 2 a 20  $\mu$ g /mL de proteína.



**Figura 14:** Determinação de proteína total

#### 4.3.6 Determinação dos teores totais de Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Para a determinação dos teores totais dos metais nos digeridos da amêndoa da castanha-do-pará e nas polpas do cupuaçu, bacurí, pupunha e açaí por FAAS, foram construídas curvas analíticas de 5 a 15 mg/L Fe, 1,0 a 4,0 mg/L Mn e 0,5 a 1,5 mg/L Zn e 1 a 4 mg/L Cu em meio HNO<sub>3</sub> 7,8% (v/v).

#### 4.3.7 Teste da adição e recuperação

O teste de adição e recuperação foram realizados nos digeridos das amostras e nas frações obtidas na extração seqüencial. Nos digeridos e nas frações foram adicionados de 2,0 mg L<sup>-1</sup> Cu, 5,0 mg L<sup>-1</sup> Fe e 1,0 mg L<sup>-1</sup> Zn.

#### 4.3.8 Otimização da separação cromatográfica dos padrões de proteínas

As soluções das proteínas foram preparadas através da dissolução de 2 mg mL<sup>-1</sup> ferritina, 2 mg mL<sup>-1</sup> albumina, 2 mg mL<sup>-1</sup> mioglobina e 2 mg mL<sup>-1</sup> selenometionina em 0,0025 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4) contendo SDS (0,5% m/v). A fase móvel foi sonicada durante 20 min a fim de remover completamente o oxigênio dissolvido antes de iniciar os experimentos.

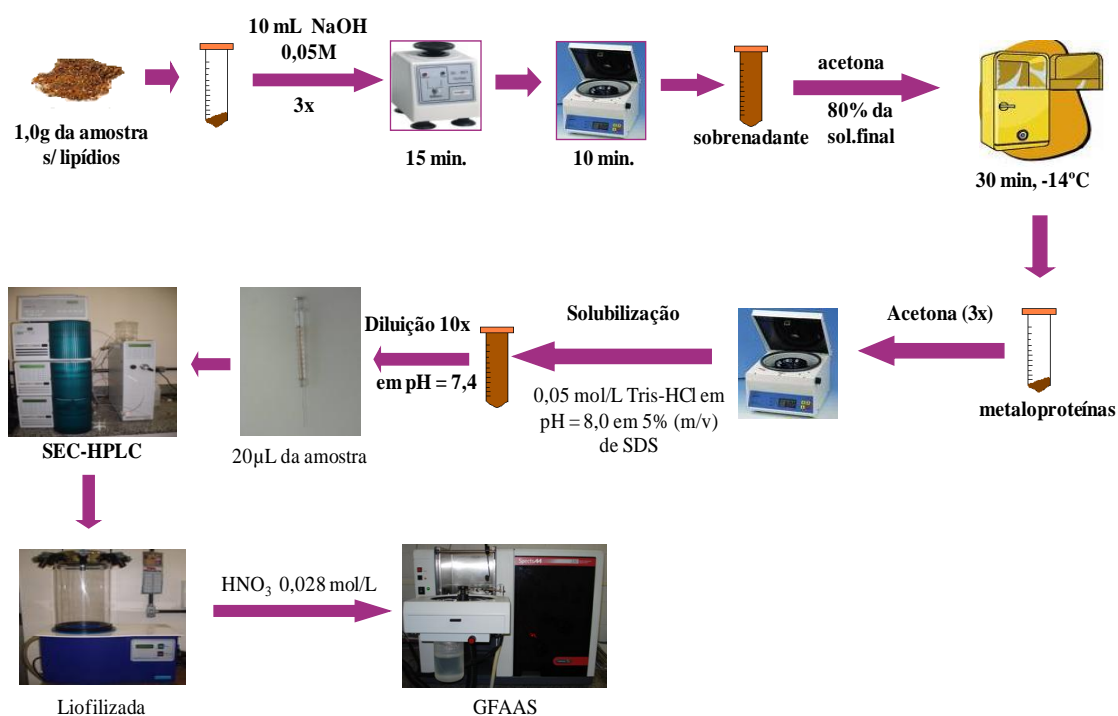
As condições cromatográficas usadas para a separação das proteínas padrão por cromatografia de exclusão por tamanhos (SEC) são apresentadas na Tabela 3. A separação foi realizada usando um gradiente isocrático de SDS (0,5% m/v) em 0,0025 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4). O pH foi ajustado com 50% (v v<sup>-1</sup>) ácido clorídrico. O eluente da coluna de exclusão por tamanhos foi passado por um detector UV e o comprimento de onda de 295 nm foi selecionado para monitoramento das proteínas. O cromatograma obtido foi registrado.

**Tabela 3** - Condições operacionais para SEC usando gradiente isocrático.

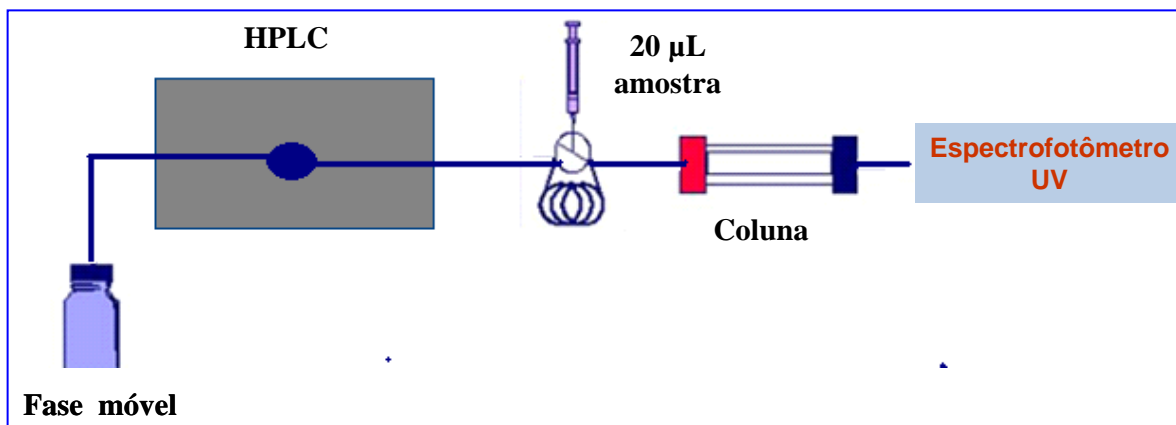
<b>Coluna</b>	Biosep - SEC - S 3000 (300 mm x 7.8 mm)
<b>Alça de amostra (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	20
<b>Vazão do eluente (<math>\text{mL min}^{-1}</math>)</b>	0,6
<b>Eluente</b>	0,0025 mol L <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4) em SDS (0,5% m/v).
<b>Deteção das proteínas</b>	UV a 295 nm

## 4.3.9 Deteção de Cu associado às proteínas presentes no açaí por SEC-UV

O extrato obtido no item 4.2.4 em meio NaOH para amostra de açaí foi injetada no sistema SEC-UV (Figura 15).

**Figura 15:** Esquema do procedimento para detecção de Cu na fração protéica do açaí por SEC – UV e SEC – GFAAS

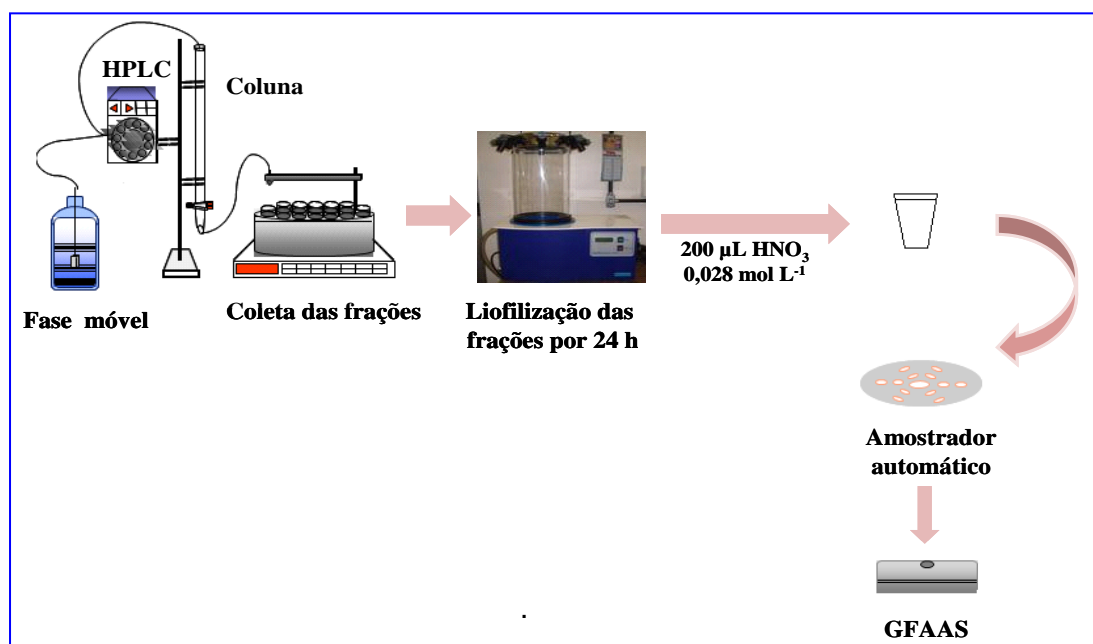
As condições usadas para a separação das proteínas são as mesmas detalhadas na Tabela 3. O esquema referente ao sistema SEC on-line UV é mostrado na Figura 16. O perfil cromatográfico obtido foi registrado.



**Figura 16** - Esquema do sistema SEC on-line UV.

#### 4.3.10 Detecção das espécies de Cu associadas às proteínas do açaí por SEC-GFAAS

O extrato obtido no item 4.2.4 em meio NaOH para amostra de açaí foi injetada no sistema SEC-UV e as frações foram coletadas de 1,0 em 1,0 min em copos do amostrador automático do forno de grafite (Figura 17).



**Figura 17** - Esquema do sistema "off-line" SEC-GFAAS

As condições usadas para a separação das proteínas são as mesmas detalhadas na Tabela 3. As frações coletadas foram liofilizadas. Após a liofilização, as frações foram solubilizadas em  $0,028 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ . Em seguida, cobre foi determinado nas frações por GFAAS. As condições instrumentais para determinação de Cu por GFAAS são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Programa de aquecimento do forno de grafite

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (s) (rampa, patamar)	$\phi$ gás purga (L min $^{-1}$ )	Leitura
1	95	5, 40	3,0	Não
2	120	10, 30	3,0	Não
3	1000 ( $T_p$ )	5,20	3,0	Não
4	2300 ( $T_a$ )	2, 0	0	Sim
5	2400	1,3	3,0	Não

$T_p$ : Temperatura de pirólise;  $T_a$ : Temperatura de atomização.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Concentração dos elementos nas amostras

A presença de carbono residual nas soluções das amostras digeridas é crítica para várias técnicas analíticas, porém o uso de soluções de ácido nítrico mais concentrado pode acarretar em melhor oxidação da matéria orgânica<sup>123</sup>.

A possibilidade de se diminuir a quantidade de reagentes é atrativa por diversos fatores, tais como redução dos resíduos gerados, custo, contaminação e da intensidade do branco analítico. Além disso, a geração de soluções com menor teor de ácidos é interessante devido a não necessidade de diluir as amostras antes de sua análise, principalmente em equipamentos cuja introdução das amostras ocorre por processos de nebulização, a qual pode estar sujeita a interferências de transporte. Soluções ácidas diluídas também diminuem a ocorrência de danos as partes instrumentais do FAAS.

A eficiência da digestão usando ácidos diluídos é explicada pela ação do  $\text{HNO}_3$  na decomposição da matéria orgânica, formando  $\text{NO}$  gasoso, o qual é removido do meio reacional aquecido e reage com o  $\text{O}_2$  presente na fase gasosa do tubo digestor. Posteriormente, o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) é gerado e reabsorvido na solução, resultando na formação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e monóxido de nitrogênio ( $\text{NO}$ ), sendo que o ciclo de reações se repete, até que não haja a presença de  $\text{O}_2$  na fase gasosa do sistema<sup>123, 124</sup>.

Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn obtidas nas amostras digeridas com seus respectivos desvios-padrão.

**Tabela 5** - Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , nas amostras de açaí, bacurí, castanha-do-pará, cupuaçu e pupunha e seus respectivos desvios-padrão ( $n = 3$ )

Elementos	Açaí	Bacurí	Castanha-do-pará	Cupuaçu	Pupunha
<b>Cu</b>	10,5 ± 0,2	14,6 ± 2,0	47,5 ± 0,2	2,9 ± 1,0	7,6 ± 0,1
<b>Fe</b>	39,4 ± 4,1	46,2 ± 8,7	23,4 ± 3,1	37,4 ± 1,0	35,5 ± 1,1
<b>Mn</b>	7,1 ± 0,1	5,1 ± 1,1	6,5 ± 0,2	8,5 ± 0,9	2,7 ± 0,1
<b>Zn</b>	20,3 ± 0,7	6,3 ± 1,5	46,1 ± 0,5	17,2 ± 1,6	46,6 ± 0,3

Dentre as frutas analisadas, o maior teor de Cu foi obtido na castanha-do-pará. O teor de Cu presente nesta amêndoa foi aproximadamente 3,0 vezes maior em relação ao bacurí, 4,0 vezes maior que no açaí, 7,0 vezes maior que

na pupunha e 16,0 vezes maior que no cupuaçu. Níveis elevados de Zn foram encontrados na pupunha e na castanha - do - pará quando comparados com outras frutas estudadas. O maior teor de Fe foi encontrado no bacurí, seguido do açaí, cupuaçu e pupunha, respectivamente. Enquanto, o menor teor de Mn foi obtido nas amostras de pupunha.

Estudos realizados em polpa de açaí liofilizado apresentaram teores de Fe, Mn, Zn e Cu respectivamente 45,0 µg/g, 107,1 µg/g, 28,3 µg/g e 21,3 µg/g <sup>125</sup>. Valores relativamente próximos foram conseguidos neste trabalho para os minerais Fe e Zn.

Os resultados obtidos nos digeridos das amostras da castanha-do-pará, açaí e cupuaçu foram comparados com valores reportados na tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). Para melhor visualização dos resultados obtidos neste trabalho e comparação com os valores da TACO, na Tabela 6 encontram-se os valores das concentrações, em mg/100g, de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de açaí, pupunha, castanha-do-pará, bacurí e cupuaçu.

**Tabela 6** – Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn em mg/100 g

<b>Elementos</b>	<b>Açaí</b>	<b>Pupunha</b>	<b>Castanha-do-pará</b>	<b>Bacurí</b>	<b>Cupuaçu</b>
<b>Cu</b>	1,05	0,68	4,75	1,46	0,29
<b>Fe</b>	3,81	3,45	2,34	4,62	3,74
<b>Mn</b>	0,71	0,27	0,65	0,51	0,85
<b>Zn</b>	2,03	4,66	4,61	0,63	1,72

A TACO somente descreve os teores de Cu, Fe, Mn e Zn para açaí, castanha-do-pará e cupuaçu, conforme a Tabela 7.

**Tabela 7** - Tabela Brasileira de composição de alimentos em mg / 100g de parte comestível – TACO Versão 2 (NEPA / UNICAMP 2006)

<b>Elementos</b>	<b>Açaí</b>	<b>Castanha-do-pará</b>	<b>Cupuaçu</b>
<b>Cu</b>	0,14	1,70	0,14
<b>Fe</b>	0,30	2,30	0,30
<b>Mn</b>	3,3	1,70	0,17
<b>Zn</b>	0,20	4,20	0,20

Comparando os valores obtidos no presente estudo para esses elementos com os valores apresentados na TACO (Tabela 7), pode-se dizer que os teores de ferro e zinco na castanha-do-pará apresentaram valores próximos aos indicados na Tabela 7 (Cu = 1,70, Fe = 2,30, Mn= 1,70 e Zn= 4,20 mg/100 g). Enquanto nas amostras de açaí e cupuaçu os valores obtidos neste trabalho foram maiores que os encontrados na TACO Versão 2- NEPA / UNICAMP 2006 (Açaí: Cu= 0,14, Fe= 0,30, Mn= 3,3 e Zn= 0,20 mg/ 100 g; Cupuaçu: Cu= 0,14, Fe= 0,30, Mn= 0,17 e Zn= 0,20 mg/ 100 g).

A variação dessas concentrações podem estar relacionadas com a origem geográfica, o uso de fertilizantes, as condições climáticas e do solo e as características das plantas que podem alterar a concentração dos elementos nos alimentos <sup>126, 127</sup>.

Analisando-se os teores de Fe, Mn, Cu e Zn obtidos nas amostras de pupunha, castanha-do-pará e açaí e comparando-se com os teores de minerais encontrados em frutas comumente consumidas pela população (Tabela 8) podemos observar que os teores de Fe e Mn no açaí foram superiores as demais frutas estudadas.



**Tabela 8** - Tabela Brasileira de composição de alimentos em mg / 100g de parte comestível – TACO Versão 1 (NEPA / UNICAMP 2004)

<b>Frutas</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
Melancia	0,04	0,20	0,10	0,10
Goiaba Vermelha	0,06	0,20	0,09	0,10
Banana Prata	0,05	0,40	0,40	0,10
Ameixa	0,06	0,10	Tr*	0,10
Tangerina	0,03	0,10	Tr*	Tr*
Laranja	0,03	0,10	0,10	0,10
Uva	0,11	0,10	0,10	Tr*

Tr\* - traço

A castanha-do-pará apresentou um elevado teor de Zn. A pupunha e a castanha-do-pará apresentaram um considerável teor de ferro, mostrando assim que as frutas estudadas no presente trabalho apresentam grandes potencialidades nutricionais.

Considerando os níveis indicados para o consumo diário pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para os minerais analisados, que é de 5,0 mg para Zn e Cu, 1,0 mg para Mn e 10 mg para Fe, observou-se que as frutas analisadas podem contribuir significativamente para a dieta alimentar diária de um homem adulto conforme mostra a Tabela 9.

**Tabela 9** – Contribuição das frutas analisadas como fonte de Cu, Fe, Mn e Zn para a dieta diária (%VD)\* de um adulto.

Minerais	Açaí	Pupunha	Castanha-do-pará	Bacurí	Cupuaçu
<b>Cu</b>	21,0	13,6	95,0	29,2	5,8
<b>Fe</b>	38,1	35,5	23,4	46,2	37,4
<b>Mn</b>	71,0	27,0	65,0	51,0	85,0
<b>Zn</b>	40,6	93,2	92,2	12,6	34,4

\* %VD: porcentagem dos valores diários recomendados

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS são apresentados na Tabela 10. O limite de detecção foi calculado como sendo 3 vezes o produto entre o desvio padrão do branco analítico dividido pelo coeficiente angular da curva analítica e o limite de quantificação como sendo 10 vezes o produto do desvio padrão do branco analítico dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

**Tabela 10** – Limites de detecção ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e quantificação ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS

Elementos	LOD	LOQ
<b>Cu</b>	0, 01	0, 04
<b>Fe</b>	0, 06	0, 19
<b>Mn</b>	0, 04	0,14
<b>Zn</b>	0, 02	0, 09

## 5.2. Teor de proteína total

A determinação da concentração total de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Este método vem sendo utilizado devido a estabilidade dos reagentes e menor tempo de reação química ( 5 min ). O procedimento se

baseia na ligação não covalente entre a forma aniônica do corante Coomassie brilliant blue (CBG-250) com as proteínas. Esse corante reage com a parte carregada positivamente da cadeia proteica, normalmente resíduo de arginina. Fracas interações são observadas com resíduos básicos (histidina e lisina) e aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina). A formação de uma solução de coloração azul corresponde à espécie que absorverá no comprimento de onda de 595 nm<sup>128, 129, 130</sup>.

A calibração do espectrofotômetro foi realizada utilizando uma solução estoque de albumina bovina. A equação da reta e o coeficiente de correlação (*r*) foram iguais a  $y = 0,0012x + 0,0135$  e 0,9979, respectivamente. As concentrações das proteínas obtidas na extração sequencial, são apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11** – Concentração total de proteínas, em mg g<sup>-1</sup>, nas frações protéicas de açaí, bacurí e pupunha e seus respectivos desvios-padrão (*n* = 2)

Frações	Açaí	Pupunha	Bacurí
NaOH	6,88 ± 0,09	7,16 ± 0,10	7,30 ± 0,12
HCl	4,12 ± 0,05	4,71 ± 0,06	5,16 ± 0,18
Tris-HCl	4,34 ± 0,08	5,03 ± 0,04	5,62 ± 0,13
Tris-SDS	4,42 ± 0,03	5,58 ± 0,18	6,21 ± 0,19
H <sub>2</sub> O	4,22 ± 0,07	4,44 ± 0,06	4,35 ± 0,05

A extração com os reagentes NaOH, HCl, Tris-HCl (pH= 8,0), Tris-HCl (pH= 8,0) em SDS e água à 60 °C, promove a extração de proteínas do grupo das glutelinas, globulinas, prolaminas e albuminas<sup>131</sup>. A solução de NaOH extrai proteínas de alta massa molecular (HMW) e baixa massa molecular (LMW) enquanto a solução de HCl apenas as proteínas de baixa massa molecular (LMW). As proteínas solúveis são obtidas após tratamento com solução tampão de Tris-HCl (pH= 8,0) ou água. Por outro lado, as proteínas insolúveis são obtidas após extração com solução tampão de Tris-HCl (pH= 8,0) em SDS.

A solubilidade de uma proteína depende da composição de aminoácidos básicos e ácidos e de suas partes não protéicas. Em geral, o pH de menor solubilidade é denominado constante isoelétrica (pI) da proteína. Para um grande número de proteínas o pI está entre o pH de 3,5 e 6,5<sup>132, 133</sup>.

É importante salientar que o uso desses extratores não evita a extração de outros compostos, além de proteínas. Etapas de purificação dessas proteínas é de suma importância para a identificação e caracterização das mesmas.

As maiores concentrações de proteínas foram encontradas nos extratos de NaOH. Isso ocorre devido ao fato da solução de NaOH não ser um extrator seletivo de proteínas<sup>134, 135</sup>. Assim, pode-se supor que outras proteínas não extraídas com HCl, Tris-HCl (pH= 8,0), Tris-HCl (pH= 8,0) em SDS e água à 60°C podem estar presentes nessa fração, não sendo constituída apenas por proteínas do grupo das glutelínas.

### 5.3. Teor de Cu, Fe e Zn na fração lipídica.

Diferentes procedimentos para a extração de proteínas são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração podem variar no intuito de aumentar o rendimento do processo<sup>2</sup>.

Kannamkumarath *et al.*<sup>136</sup> estudou o padrão de distribuição de selênio em proteínas de castanha-do-pará utilizando soluções de NaOH, HCl, Tris-HCl (pH= 8,0) , Tris-HCl ( pH = 8,0) em SDS e água à 60 °C.

De acordo com Naozuka, a remoção da fração gordurosa é muito importante, principalmente, antes da separação cromatográfica, pois a gordura da amostra pode alterar as propriedades físicas da amostra, como a viscosidade, levando a erros na separação e, até mesmo, danos aos equipamentos, como entupimento e aumento da pressão.

Após a etapa de extração com a mistura de clorofórmio e metanol, a fração gordurosa pode ser estimada considerando as massas antes e após esse

procedimento. Para as amostras estudadas a porcentagem de gordura foi de aproximadamente 43, 27 e 19% m/m para a pupunha, açai e bacurí, respectivamente.

#### 5.4. Determinação e distribuição de Cu, Fe e Zn nas frações protéicas de açai, bacurí e pupunha.

Nesta parte do trabalho foram determinados Cu, Fe, Mn e Zn em açai, bacurí, castanha-do-pará, cupuaçu e pupunha. Os resultados obtidos para as amostras de castanha-do-pará e cupuaçu não foram satisfatórias. Isso pode ser devido a ocorrência de algum problema durante o procedimento de extração seqüencial, ou seja, no momento da transferência do resíduo para passar para próximo etapa de separação. Devido aos problemas apresentados pela lâmpada de catodo oco de manganês, os resultados obtidos não foram considerados. Sendo assim, será apresentado os resultados para a determinação e distribuição de Cu, Fe e Zn nas frações (lipídica e proteica) e nos resíduos das amostras de açai, bacurí e pupunha. As concentrações de Cu, Fe e Zn nas frações lipídicas, protéicas e no resíduo de açai, bacurí e pupunha, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , são apresentados na Tabela 12. Esta tabela apresenta a concentração total dos analitos obtida nos digeridos, nas frações extraídas e dos resíduos das amostras estudadas. A soma das concentrações dos analitos concordam em um nível de 95% (*t-teste*) com a concentração total encontrada nos digeridos das amostras.

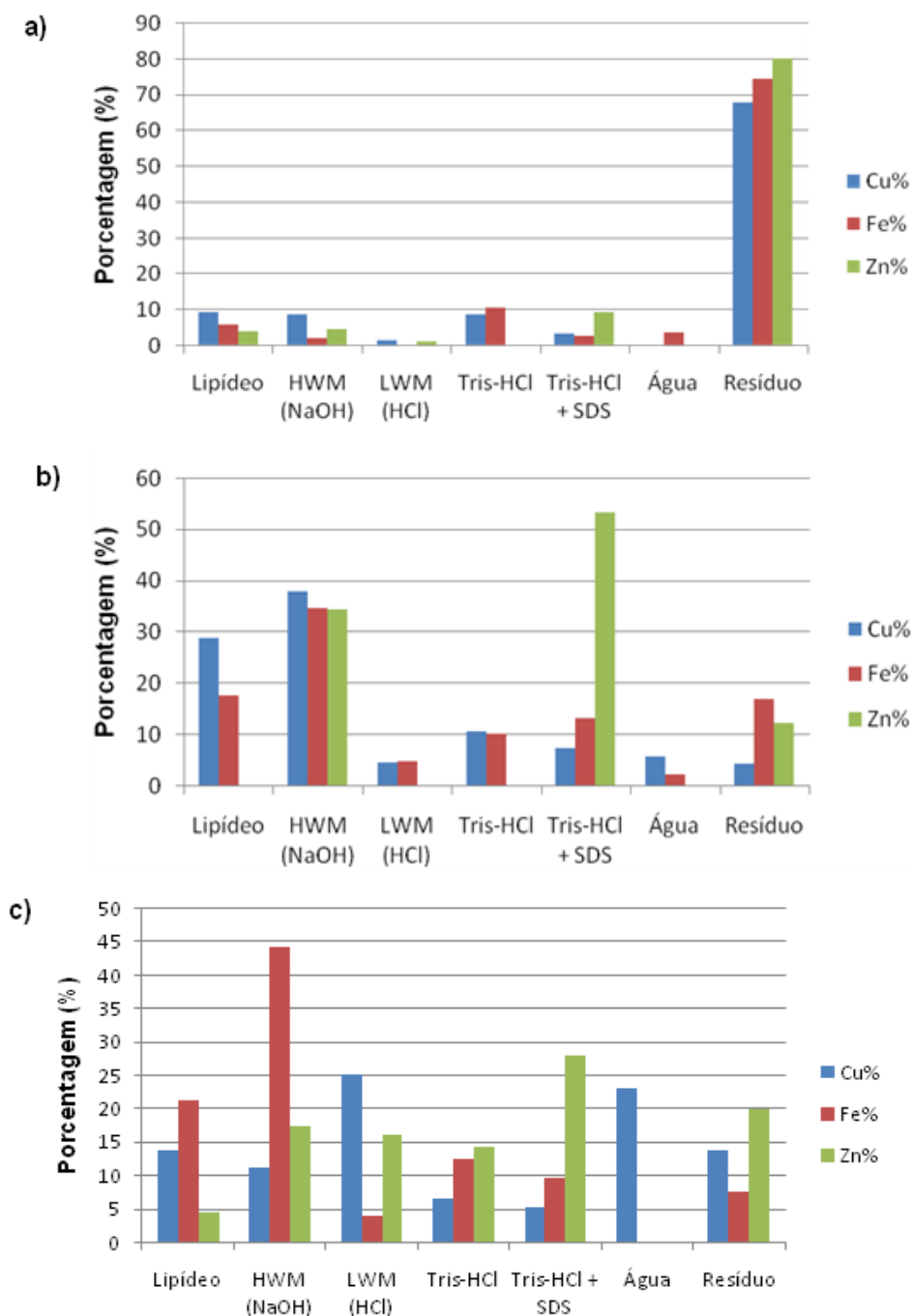
As recuperações obtidas para  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  Cu,  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  Fe e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Zn adicionado nos digeridos e nas frações variaram de 88 a 105 %, 93 a 101 % e 91 a 106 %, respectivamente.

**Tabela 12** – Concentrações de Cu, Fe e Zn e a somatória das frações das amostras de açaí, bacurí e pupunha com seus respectivos desvios-padrão ( $n = 3$ )

Frações	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	Açaí	Bacurí	Pupunha	Açaí	Bacurí	Pupunha	Açaí	Bacurí	Pupunha
Lipídio	$0,87 \pm 0,03$	$3,88 \pm 0,09$	$1,06 \pm 0,03$	$2,30 \pm 0,02$	$8,20 \pm 0,04$	$7,56 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,02$	< LOD	$2,00 \pm 0,07$
NaOH	$0,81 \pm 0,02$	$5,10 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,08$	$16,00 \pm 0,06$	$15,82 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,06$	$2,13 \pm 0,08$	$7,97 \pm 0,03$
HCl	$0,16 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,05$	$1,93 \pm 0,01$	< LOD	$2,20 \pm 0,05$	$1,36 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,01$	< LOD	$7,46 \pm 0,06$
Tris-HCl	$0,80 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,07$	$4,20 \pm 0,03$	$4,70 \pm 0,07$	$4,48 \pm 0,03$	< LOD	< LOD	$6,57 \pm 0,07$
Tris-SDS	$0,32 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,01$	$6,10 \pm 0,02$	$3,46 \pm 0,05$	$1,91 \pm 0,02$	$3,29 \pm 0,02$	$12,86 \pm 0,05$
Água	< LOD	$0,79 \pm 0,04$	$1,77 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,05$	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Resíduo	$6,25 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,08$	$29,30 \pm 0,03$	$7,80 \pm 0,02$	$2,72 \pm 0,03$	$16,23 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,02$	$9,24 \pm 0,01$
$\Sigma$ das frações	9,21	13,46	7,56	39,30	46,10	35,40	20,22	6,18	46,10
Digerido	10,50	14,60	7,60	39,40	46,20	35,50	20,30	6,30	46,60

$\Sigma$  = somatória

Para melhor visualização, na Figura 18 encontram-se as porcentagens de Cu, Fe e Zn distribuídos nas frações lipídicas, protéicas e resíduos de açaí, bacurí e pupunha.



**Figura 18** – Porcentagem de Cu, Fe e Zn nas frações: açaí (a), bacurí (b) e pupunha (c).

O procedimento de extração seqüencial mostrou um comportamento diferente para cada amostra. Os maiores níveis de cobre foram obtidos nas frações lipídica (açai), alta massa molecular (bacuri) e baixa massa molecular (pupunha). Nas extrações com NaOH (fração HMW) e ácido clorídrico diluído (frações LMW) foram extraídas as glutelinas<sup>130</sup>. Altas concentrações de Fe foram obtidas nas frações extraídas com Tris-HCl (açai) e NaOH (bacuri e pupunha). As proteínas extraídas com tampão Tris-HCl (pH 8,0) são proteínas solúveis conhecidas como globulinas<sup>130</sup>. Além disso, as maiores quantidades de Zn foram encontradas em ambas as amostras na fração extraída com tampão Tris-HCl (pH 8,0) em SDS (proteínas insolúveis).

Na Figura 18a esta representada a porcentagem de Cu, Fe e Zn em diferentes reagentes extratores na amostra de açai. Pode ser observado que os maiores teores de Cu (67,86%), Fe (74,55%) e Zn (80,26%) foram encontrados no resíduo.

Na fração lipídica, zinco (4,05%) apresentou a menor concentração nesta fração. No entanto, os maiores níveis obtidos foram para Cu (9,44%) e Fe (5,85%), respectivamente.

Cobre, Fe e Zn foram encontrados nas frações protéicas extraídas com NaOH (proteínas de HMW e LMW) e Tris-HCl (pH= 8,0) em SDS (proteínas insolúveis). Nestas frações, Fe apresentou teores de 2,29% (solução de NaOH) e 2,8% (solução tampão de Tris-HCl em SDS). Níveis mais altos de Cu (8,79%) foram encontrados associados às proteínas de HMW enquanto os níveis mais baixos (3,47%) foram obtidos para a associação de Cu as proteínas insolúveis. Por outro lado, o maior teor de zinco (9,44%) foi encontrado na fração referente as proteínas insolúveis.

Nas frações de proteínas de LWM e proteínas solúveis foram encontradas a presença de dois minerais em cada fração. Os teores de ferro e zinco apresentaram abaixo do limite de detecção nas frações de proteínas de LMW e proteínas solúveis, respectivamente. Maiores teores de Cu foram encontrados associados às proteínas solúveis (8,68%), enquanto nas frações de LWM, o valor foi de 1,73%.



Nas frações de proteínas solúveis em água, o Fe apresentou um teor de 3,8% enquanto que Cu e Zn não foram detectados, ou seja, estavam abaixo do limite de detecção.

A Figura 18b apresenta a distribuição (%) de Cu, Fe e Zn nas diferentes frações obtidas nas amostras de bacurí. Podemos observar que a presença de Cu, Fe e Zn ficou evidente nas frações de NaOH, Tris-HCl (pH= 8,0) em SDS. Altos teores de Zn aparecem associados às proteínas insolúveis (53,23%). Os maiores teores de Cu (37,89%) e teores similares para Fe (34,70%) e Zn (34,46%) foram encontrados associados às proteínas de alta massa molecular.

No resíduo (sólido final) foram encontrados altos teores de Fe (16,91%), seguido de Zn (12,29%) e Cu (4,53%).

Na fração lipídica foram encontrados níveis elevados de Cu (28,82%) e Fe (17,70%). Os níveis de zinco nesta fração estavam abaixo do limite de detecção.

Associado a fração de proteínas solúveis foram encontrados teores próximos de Cu (10,77%) e Fe (10,19%) enquanto zinco estava abaixo do limite de detecção.

Na fração de proteínas solúveis extraídas com água foram encontrados altos teores de Cu (5,86%) e Fe (2,38%). Zinco não foi encontrado (< limite de detecção).

Na Figura 18c foi possível perceber que houve maior eficiência da extração envolvendo os três minerais, com excessão da extração utilizando água.

Na fração lipídica foram encontrados os teores de 21,16, 13,86 e 4,33% para Fe, Cu e Zn, respectivamente.

Na extração utilizando solução de NaOH (proteínas de HMW) foi observado um maior teor de Fe (44,29%) e para os demais metais foi encontrado 17,28% (Zn) e 11,11% (Cu).

Na fração de proteínas solúveis (extração com solução tampão de Tris-HCl) foram encontrados os maiores teores para Zn (14,25%). Enquanto Fe e Cu foram 12,54% e 6,54%, respectivamente. Na extração com água, um teor

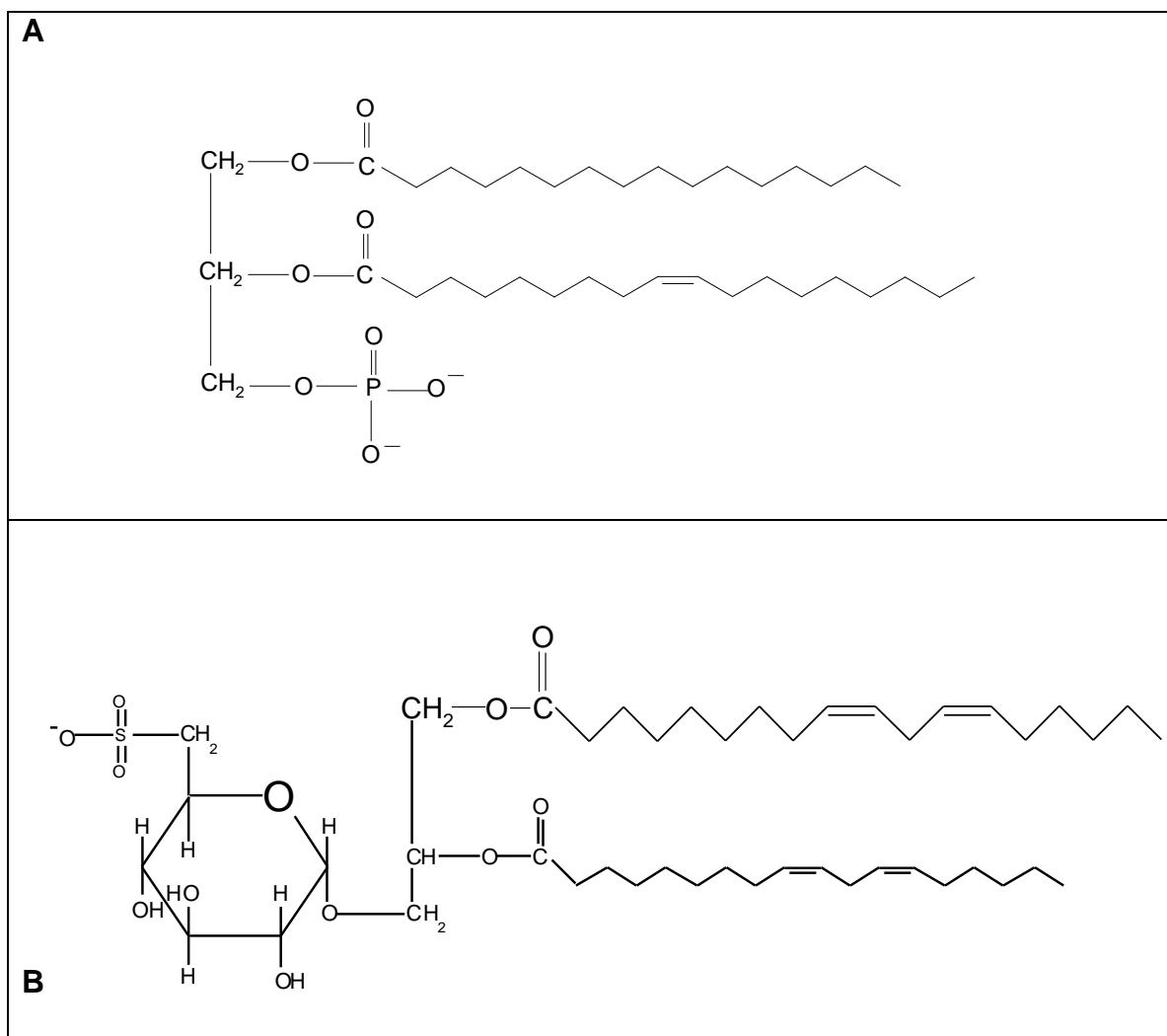
de 23,14% de Cu cobre apresentou associação com proteínas solúveis, enquanto Fe e Zn não foram detectados, pois estavam abaixo do limite de detecção.

O maior teor de cobre foi encontrado associado às proteínas de LMW (25,23%). Ferro (3,81%) foi o que apresentou o menor teor nesta fração. Para esta mesma fração, o teor de Zn encontrado foi 16,18%.

Os maiores teores de Zn aparecem associados às proteínas insolúveis. Os valores para Cu e Fe nesta fração foram 5,23% e 9,69%, respectivamente.

No resíduo foi encontrado os maiores teores de Zn (20,04%) e o menor teor para o Fe (7,61%). Teores consideráveis de Cu foram encontrados nesta fração (13,72%).

Na fração lipídica foram encontradas percentuais consideráveis de Cu (28,82%) no bacurí, Fe (21,16%) na pupunha e Zn na pupunha (4,33%) e açai (4,05%). A associação de íons metálicos com os lipídeos pode ser explicada pela presença de sulfolipídeos e fosfolipídeos (Figura 19). Os grupos apresentam dois ácidos graxos, um resíduo de galactose e um grupo sulfonato. Por outro lado, os fosfolipídeos possuem uma molécula de glicerol, duas cadeias de ácidos graxos e um grupo fosfato<sup>137, 138</sup>. O sulfonato e o fosfato são grupos altamente polares e exibem uma carga negativa capazes de interagir com espécies catiônicas, tais como os elementos de interesse.



**Figura 19** – Estrutura fosfolipídio (A) e do sulfolipídio (B) [ Nelson & Cox, 2000]

Para a maioria dos elementos e amostras de interesse foram encontradas altas porcentagens dos analitos no sólido remanescente. É possível que os elementos estejam associados a outros compostos orgânicos como também às proteínas que não foram extraídas. Etapas consecutivas de extração com o mesmo solvente e o tempo não foram otimizados, portanto do grupo das glutelinas, albuminas, prolaminas e globulinas podem estar presentes no sólido remanescente. Comparando-se a distribuição do Zn nas demais amostras, o teor deste mineral ficou evidenciado na amostra de pupunha.

A possível associação de Cu, Fe e Zn com proteínas dos grupos das albuminas, globulinas e glutelinas está relacionada à presença de aminoácidos carregados e ricos em enxofre (S), tais como metionina, cisteína, ácido

glutâmico, arginina, ácido aspártico e lisina <sup>139,140,141</sup>. Os íons metálicos apresentam alta afinidade por esses tipos de aminoácidos.

Os íons metálicos  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  geralmente apresentam a capacidade de interagir com proteínas, principalmente por estes apresentarem caráter ácido intermediário <sup>142</sup>. Os íons metálicos  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, podendo ser utilizados para separar fosfoproteínas <sup>143, 144</sup> e o íon  $\text{Ca}^{2+}$  coordena de maneira estável o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspárticos e glutâmicos, podendo ser utilizado para purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos, tais como fibrinogênio e calmodulina <sup>145</sup>.

Sulkowski <sup>142</sup> demonstrou que o par de elétrons presente no nitrogênio do anel imidazol da histidina é o principal contribuinte na interação entre a proteína e íons metálicos de transição (quando quelatados ao ácido iminodiacético, IDA) e que a presença de múltiplas histidinas expostas na superfície da proteína a ser separada aumenta o grau desta interação. Aminoácidos aromáticos, como o triptofano, também são importantes na retenção de proteínas <sup>142,146,147</sup>.

A solubilidade das proteínas é o resultado, entre outros fatores, da interação polar com o solvente, interações iônicas com sal presente na solução e de forças eletrostáticas de repulsão. O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas da proteína, por isso as proteínas apresentam diferenças de solubilidade em função do pH do solvente e, de um modo geral, esta é maior em pH alcalino, mínima na faixa de pH 4,0 a 5,0, com algumas proteínas apresentando alta solubilidade em extremos de pH ácido.

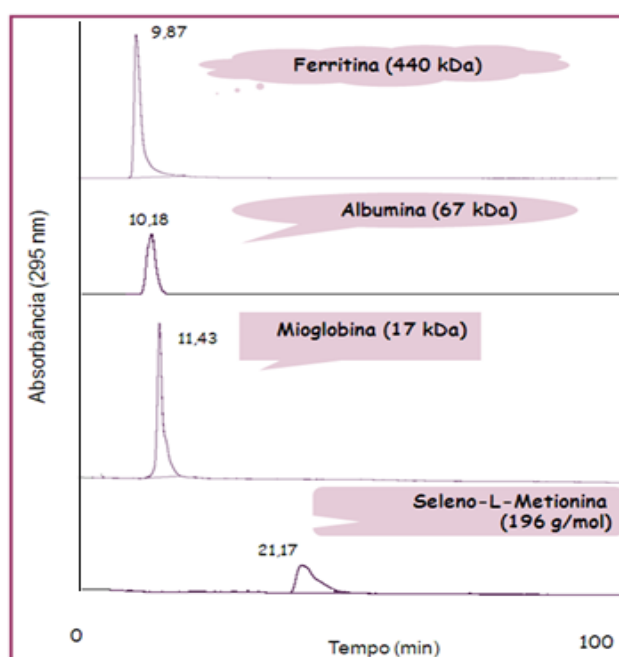
Grandes variações podem ser esperadas para essas frações numa dependência do método de extração e alguns autores <sup>148</sup> sugerem que as diferenças encontradas na literatura decorrem, possivelmente, da contaminação cruzada das proteínas hidrossolúveis e solúveis em sal o que acarreta numa dependência do método de extração utilizado.

### 5.5- Separação cromatográfica das proteínas padrão e proteínas presentes no açaí por SEC-UV.

O desenvolvimento de um procedimento para a especificação de Cu na amostra de açaí foi iniciada com a otimização da separação cromatográfica de soluções padrão das proteínas ferritina, albumina, mioglobina e seleno-metionina. A separação cromatográfica para as proteínas foi realizada utilizando uma coluna de exclusão por tamanho. Para evitar mudanças na especificação de Cu *in vivo* optou-se por trabalhar em pH fisiológico de 7,4.

A fim de otimizar a separação das proteínas foram estudados o melhor tempo de eluição, comprimento de onda, concentração da fase móvel e a vazão da fase móvel. As melhores condições cromatográficas foram obtidas para uma eluição isocrática de SDS (1% m/v) em 2,5 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH= 7,4) durante 30 min (Tabela 2) usando o comprimento de onda de 295 nm.

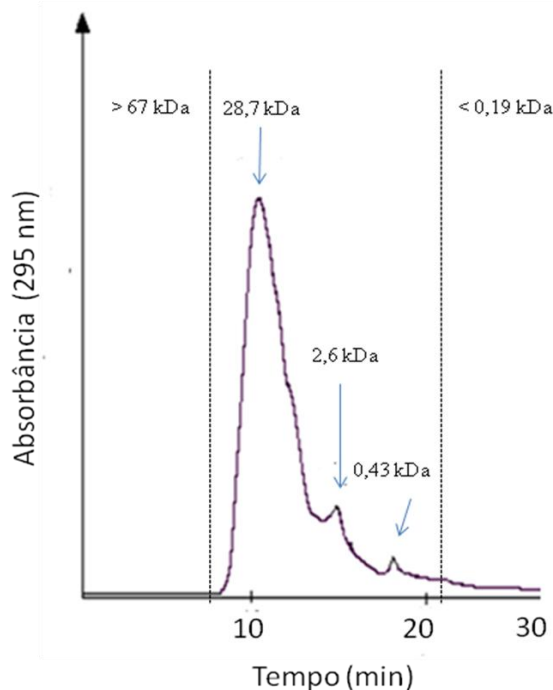
Os perfis cromatográficos dos padrões de proteínas no comprimento de onda de 295 nm usados na calibração da coluna cromatográfica são apresentados na Figura 20.



**Figura 20** - Perfis cromatográficos dos padrões de proteínas ferritina, albumina, mioglobina e seleno-metionina por SEC-UV a 295 nm.

Pode ser observado, que as proteínas foram eluídas em tempos de retenção diferentes: ferritina (9,87 min), albumina (10,18 min), mioglobina (11,43 min) e seleno-metionina (21,17 min) para um gradiente isocrático de SDS (1% m/v) em 2,5 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH= 7,4) durante 30 min.

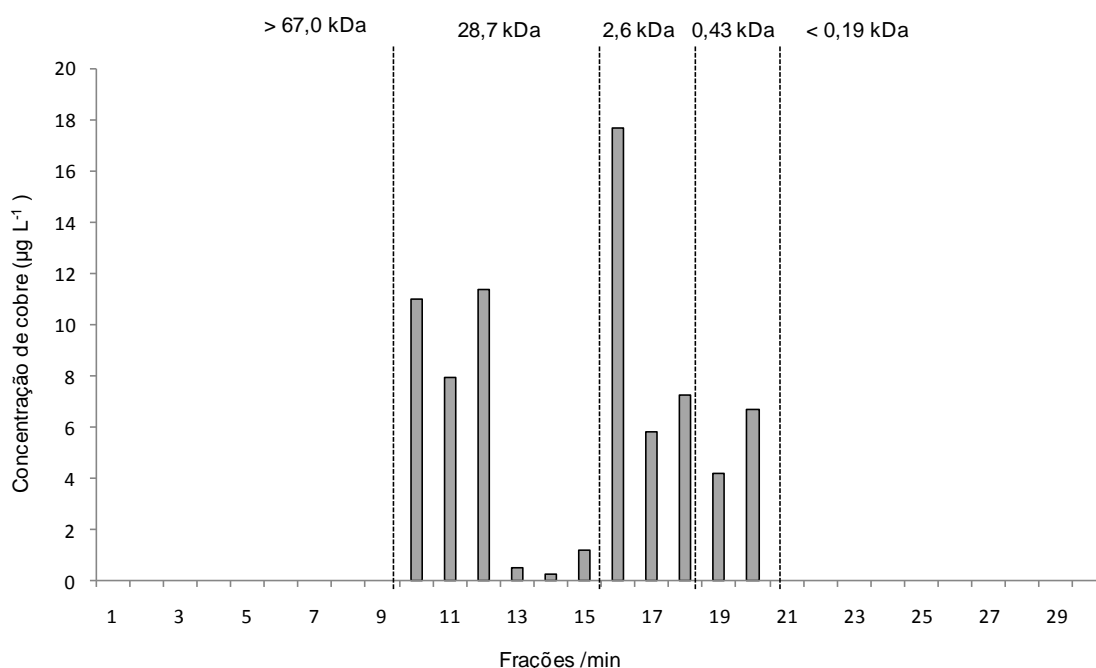
A relação entre o volume de eluição ( $V_e$ ) e o logaritmo da massa molecular foi linear na razão entre 0,196 a 67 kDa. Os coeficientes de partição ( $K_{av}$ ) obtidos durante a calibração da coluna foram 0,008 (albumina), 0,079 (mioglobina) e 0,568 (seleno-metionina) usando solução de SDS (1% m/v) em 2,5 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH= 7,4) durante 30 min. O coeficiente de partição foi calculado usando  $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_{total} - V_o)$ . O volume da coluna ( $V_o$ ) foi 5,92 mL. A equação obtida na calibração da coluna cromatográfica (log MM versus  $K_{av}$ ) foi  $\log MM = -4,3161 K_{av} + 4,7223$  ( $r = 0,9884$ ), onde MM e  $r$  são a massa molecular e o coeficiente de correlação. O perfil cromatográfico para a extração básica (NaOH) com detecção UV à 295 nm é mostrado na Figura 21.



**Figura 21** - Perfil cromatográfico obtido após extração da polpa de açaí com solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> por SEC com detecção UV a 295 nm.

Como pode ser visto, o perfil cromatográfico obtido no extrato básico da polpa de açaí mostrou a presença de compostos de HMW (28,7 kDa) e LMW (2,6 e 0,43 kDa). Os coeficientes de partição obtidos para as massas moleculares de 28,7, 2,6 e 0,43 kDa foram 0,061, 0,300 e 0,484, respectivamente. Como era esperado, a solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> extraiu compostos de HMW e LMW (Wuilloud, R. G.; Kannamkumarath S. S.; Caruso J. A., 2004). A massa molecular de 28,7 kDa pode ser proteínas devido as suas altas quantidades em alimentos. Por outro lado, as espécies de LMW encontradas podem ser peptídeos contendo metal ou outros compostos de LMW que foram extraídos com a solução de NaOH.

Cobre foi determinado nas frações ( $n= 30$ ) obtidas por SEC-UV. Os teores de Cu obtidos em cada fração são mostrados na Figura 22.



**Figura 22** - Níveis de cobre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) associados a compostos de HMW e LMW presentes na extração básica da polpa de açaí.

Cobre foi encontrado associado à espécies de HMW (43,7% da soma total de cobre nas frações) e LMW (56,3%). Uma recente publicação tem demonstrado a presença de proteínas de HMW em alimentos, mas a

associação de cobre a estes compostos ainda não tem sido confirmado (Morgan and Clayshulte, 2000).

Os níveis mais elevados de cobre foram encontrados associados as massas moleculares de 28,7 kDa (43,7%) e 2,6 kDa (41,6%).

Os limites de detecção ( $3 \times \sigma/b$ ) e quantificação ( $10 \times \sigma/b$ ;  $\sigma$ = desvio padrão do branco analítico;  $b$ = coeficiente linear do gráfico de calibração) obtidos para cobre foram 0,65 e 2,16  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.



## 6. CONCLUSÃO

- ❖ Dentre os quatro minerais estudados (Cu, Fe, Mn e Zn) nas cinco amostras de frutas, o Fe apresentou maior teor (23,4 a 46,2  $\mu\text{g/g}$ ) seguido do Zn (6,3 a 46,6 $\mu\text{g/g}$ ) e Cu (2,9 a 47,5  $\mu\text{g/g}$ ). Manganês foi encontrado em menor quantidade nas cinco amostras de frutas (2,7 a 8,5  $\mu\text{g/g}$ );
- ❖ O bacurí apresentou alto teor de Fe (46,2  $\mu\text{g/g}$ ) enquanto a castanha-do-pará e a pupunha destacam-se por seus elevados teores de Zn (46,1 e 46,6  $\mu\text{g/g}$ ) respectivamente;
- ❖ Na determinação dos elementos associados às frações protéicas, a concentração total de proteínas encontradas nas amostras de açaí, bacurí e pupunha, em diferentes meios extratores foram respectivamente, (6,88 a 4,12 mg/g), (7,30 a 4,35 mg/g) e (7,16 a 4,44 mg/g);
- ❖ A concentração do cobre nos digeridos e nos extratos de proteínas foram 10,5 e 0,81  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente;
- ❖ Cobre foi encontrado associado às frações de proteínas à espécies de HMW (43,7% da soma total de cobre nas frações) e LMW (56,3%);
- ❖ Níveis de Cu nessas frações variaram de 0,46 a 17,69  $\mu\text{g/g}$ ;
- ❖ Os resultados obtidos na polpa de açaí por cromatografia de exclusão por tamanho com *off-line* detecção GFAAS mostraram que cobre está associado às proteínas de alta massa molecular, baixa massa molecular e compostos não-protéicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WELNA, M.; KLIMPEL, M.; ZYRNICK, W. Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. **Food Chemistry**, **111**: 1012-1015. 2008.
2. NAOZUKA, J; OLIVEIRA, P. V: Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc**, **18**: 1547-1553. 2007.
3. ANDRADE, E. C. B., BARROS, A. M., TAKASE, I. **Cienc. Tecnol. Aliment**, **23**: 386.2003.
4. VALOIS, A. C.C. Gestão em segurança alimentar e nutricional no Maranhão. Disponível em: [http://www.acm-ma.com.br/geral/artigos\\_arquivos/gestao\\_alimentos.doc](http://www.acm-ma.com.br/geral/artigos_arquivos/gestao_alimentos.doc). Último acesso em: 20/02/2009.
5. BARRA, C. M., SANTELLI, R. E., ABRÃO J. J. Guardia M. de la, *Especiação de arsênio – Uma revisão*, **Química Nova**, 2000.
6. YUYAMA L. O.; PAIVA, L. A. J.; SILVA, F. D.; YUYAMA, K.; TEIXEIRA, F. D.I.; AGOSTINI, V. M. B. Açaí como fonte de ferro: Mito ou realidade? **Acta Amazónica**, **27**: 183-96. 2002.
7. CHANG, W. H.; GUTENMANN, C. M.; REID, D. J. L. "Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil". **Chemosphere**, **30**: 801-802. 1995.
8. KLEIN, E. A.; THOMPSON, I. M.; LIPPMAN, S. M.; GOODMAN, P.J.; ALBANES, D.; TAYLOR, P.R.; COLTMAN C. "Select: the next prostate cancer prevention trial. Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial". **J Urol**, **166**: 1311-1315. 2001.
9. LISK, D. J.; I. P, C. Charectization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. **Carcinogenesis**, **4**: 573-576. 1999.

10. NOMURA, A. M. Y; LEE, J; STEMMERMANN, G. N; COMBS, G. F. Serum Selenium and Subsequent Risk of Prostate Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, **9**: 883 – 887. 2000.
11. LLOYD, L. A., MCDONALD, B. E & CRAMPTON, E.W. **Fundamentals of Nutrition**, **2**: 215 – 271. 1978.
12. HAMBIDGE, K. M.; Biomarkers of mineral trace intake and status. **J Nutr**, **133**: 948S-55S. 2003.
13. ESTRASULAS, O. D. Minerais: Funções, deficiências, toxidez e outros aspectos da suplementação. **Agroceres Nutrição Animal**, **22**: 2. 1999
14. DOLAN, S. P. & S. G. CAPAR. Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, **15**: 593-615. 2002.
15. BEYER, P. L. Digestão, absorção, transporte e excreção de nutrientes. In: MAHAN, L. Kathleen; ESCOTT-STUMP, Sylvia. **Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia**. **11**: 2-19. 2005.
16. HENDLER, S. S. **A enciclopédia de vitaminas e minerais**, 8.ed. Rio de Janeiro: Campus,1994.
17. TANAKA, S. Em *Occupational Medicine*; Edt. Mosby – Year Book Inc.: USA, 1994.
18. GALVÃO, L. A. C.; COREY, G. Em *Manganeso-Serie Vigilancia*; Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud: México, 1987.
19. TSALEV, D. L. Em *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Enviromental Health Practice*; CRC Press: USA, 1984, vol. II.
20. HALSTEAD, J.A.; SMITH, J. C.; IRWIN M. J. A conspectus of research on zinc requirements of man. **J Nutr**, **104**: 34 - 36.1997.
21. WILLIAM, R.J.P. Na introduction to the biochemistry of zinc. In: Mills, C. F. Zinc in human biology. **Springer-Verlag**: 15-31. 1989.
22. PRASAD, A. S.; OBERLEAS, D.; Em *Trace Elements in Human Health and Disease*, vol. 1, Academic Press: New York, 1976.
23. LÖNNERDAL B, DEWEY KG. Epidemiologia da deficiência de ferro no lactente e na criança. **An Nestlé**, **52**: 11-7. 1996.

24. GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**, 8: 316-318. 1991.
25. KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. Cuidado nutricional em anemias. In: Krause MV, Mahan LK. **Alimentos nutrição e dietoterapia**, 7: 581-588. 1991.
26. PASSI, S.; GIANNI, G.; COCCHI, M. Oxidative stress in brain: neurodegenerative disease and possible treatment. **Prog Nutr**, 8: 241-256. 2006.
27. SMITH, D.G.; CAPPAL, R.; BARNHAM, K.J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. **Biochim Biophys Acta**, 90: 1768-1976. 2007.
28. SALONEN, J. T. *et al.* High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern finnish men. **Circulation**, 86: 803-811. 1992.
29. HIRANO, K. *et al.* Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. **Free Radic Res**, 21: 267-276. 1994.
30. KRAUSE MV, MAHAN LK. Cuidado nutricional em anemias. In: Krause MV, Mahan LK. **Alimentos nutrição e dietoterapia**, 7: 581-588. 1991.
31. ANDERSON, J.B. Minerais. In: Mahan LK, Escott-Stump S, Krause MV. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 107-45. 2005.
32. BOIN.C. Exigência de minerais pelas categorias do rebanho bovino e funções desses nutrientes. In: 3 SIMPOSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 1985, Piracicaba. *Anais*. Piracicaba: FEALQ, 1985.
33. NUTRIENT requirement of sheep. 6th. ed. Whashington: National Academic of Scienc, 1985.
34. COUZI, F.; KEEN, C.; GERSHWIN, M.E.; MARESHI, J.P. Nutritional implications of the interactions between minerals. **Progr. Food Nutr. Scie**, 17: 65 – 87. 1993.
35. COZZOLINO, S.M. Biodisponibilidade de minerais. **R. Nutr. PucCamp**, 2: 87 - 98. 1997.
36. BREMMER, I.; BEATTIE, J.H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. **Proc.Nutr. Soc.** 54: 489 – 99. 1995.

37. PIMENTEL, J.L., COOK, M.E., GREGER, J.L. Bioavailability of Zinc-Methionine for Chicks. **Poultry Science**, **70**: 1637-1639. 1991.
38. WEDEKIND, K.J., HORTIN, A.E., BAKER, D.H. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. **Journal of Animal Science**, **70**: 178-187. 1992.
39. UNDERWOOD, E.J. The mineral nutrition of livestock. 3<sup>a</sup> Edition. Wallingford: CABI. 614p. 1999
40. SPEARS, J.W., SCHOENHERR, W.D., KEGLEY, E.B. et al. Efficacy of iron methionine as a source for iron for nursing pigs. **Journal of Animal Science**, **70**: 243. 1992.
41. MATEOS, G.G., VALENCIA, D.G., MORENO, E.J. Microminerales em alimentación de monogástricos. Aspectos técnicos y consideraciones legales. In: XX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, Barcelona. 2004. p.275-323.
42. BAKER, D.H., HALPIN, K.M. Efficacy of a manganese-protein chelate compared with that of manganese sulfate for chicks. **Poultry Science**, **66**: 1561-1563. 1987.
43. HENRY, P.R., AMMERMAN, C.B., MILES, R.D. Relative bioavailability of manganese-methionine complex for broiler chicks. **Poultry Science**, **68**: 107-112, 1989.
44. FLY, A.D., IZQUIERDO, O.A., LOWRY, K.R. et al. Manganese bioavailability in a Mn-methionine chelate. **Nutr. Res**, **9**: 901-910. 1989.
45. AMMERMAN, C.B., BAKER, D.H., LEWIS, A.J. Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals and vitamins. **Academic Press**, 441p. 1995.
46. BAKER, D.H., ODLE, J., FUNK, M.A. et al. Bioavailability of copper in cupric oxide, cuprous oxide, and in a copper-lysine complex. **Poultry Science**, **10**: 177-179, 1991.
47. AOYAGI, S., BAKER, D.H. Nutritional evaluation of copper-methionine complex for chicks. **Poultry Science**, **72**: 2309-2315, 1993.

48. GUO, R., HENRY, P.R., HOLWERDA, R.A. *et al.* Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. **Journal of Animal Science**, **79**: 1132-1141. 2001.
49. BUENO, L. Efeito antagônico do ferro e do zinco em uma formulação de alimentação enteral utilizando planejamento de misturas da metodologia de superfície de resposta. **Quim. Nova**, **31**: 585 – 590. 2008.
50. NOGUEIRA, S. C. **Efeitos de diversos nutrientes sobre a dialisabilidade de ferro em formulas infantis**. p. 11. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, 2002.
51. MABE, I. **Efeitos da suplementação dietética com quelatos de zinco e de manganês na produção de ovos e morfologia intestinal de galinhas poedeiras**. p.94, Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP. 2001.
52. MELLOR, D. Historical background and fundamental concepts "of chelation". In: DWYER, F., MELLOR, D. (Ed.). Chelating agents and metal chelates. **Academic Press**. p.1. 1964.
53. LEESON, S., SUMEERS, J.D. Nutrition of the chicken. 4<sup>a</sup> Edition. Guelph, Ontario: University Books. 591p. 2001.
54. VIEIRA, S.L. Minerais quelatados na nutrição animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS. CBNA – Campinas, SP, pg. 51-70. 2004.
55. KRATZER, F.H., VOHRA, P. Chelates and chelation. In: KRATZER, F.H., VOHRA, P. Chelates in nutrition. Boca Raton, Florida: CRC Press, p.5-33. 1996.
56. LEESON, S., SUMMERS, J.D. Commercial poultry nutriti. **Guelph, Ontario: University Books**, **2**: 57-58. 1997.
57. ENSMINGER, M.E., OLDFIELD, J.E. Feeds & Nutrition. 2<sup>a</sup> Edition Clovis, Califórnia: Ensminger Publishing Company, 1990. 500p.
58. AAFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. Official Publication. Atlanta. 1997.

59. POLLI, S.R. Boletim Informativo Nutron Pet. Disponível em: <http://www.animalworld.com.br/vet/ver.php?id=190>. Último acesso em: 15/01/2009.
60. HERRICK, J.B. Mineral in animal health. In: ASHMEAD, H.D. (Ed.). The roles of amino acid chelates in animal nutrition. New Jersey: Noyes, p.3-9. 1993.
61. CLYDESDALE, F.M. Mineral interactions in foods. In: BODWELL, C.E., ERDMAN, Jr. J.W. Nutrient interactions. New York: Marcel Dekker, 257-268. 1998.
62. SPEARS, J.W. Optimizing mineral levels and sources for farm animal. In: KORNEGAY, E, T. Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment. New York: CRC Press. 259-275. 1996.
63. ASHMEAD, H.D. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts. **Chapter book, 24:** 306–319. 1991.
64. MILES, R.D., HENRY, P.R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, 73-93. 2000.
65. CROMWELL, G.L., STAHLEY, T.S., MONEGUE, H.J. Effects of source and level of copper on performance and liver copper stores in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, **67:** 2996-3002. 1989.
66. HAHN, J.D., BAKER, D.H. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacological levels of Zinc. **Journal of Animal Science**, **71:** 3020-3024. 1993.
67. CARVALHO, J.E.U. *et al.* 1998b. **Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia.** Boletim de Pesquisa 203: 1-18p. Belém: Embrapa-CPATU.
68. NASCIMENTO, W.M.O. *et al.* 2004. Efeito da umidade e da temperatura de armazenamento na qualidade sanitária de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Fitopatologia Brasileira**. 59 (suplemento): 51.
69. NASCIMENTO. W.M.O. 2006. **Conservação de sementes de açaí (*Eutepe oleracea* Mart.).** Piracicaba: USP/ESALQ. 60p. (Tese Doutorado).

70. NASCIMENTO, W.M.O. & Silva, W.R. 2005. Comportamento fisiológico de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 27 (3): 349-351.
71. NASCIMENTO, W.M.O. *et al.* Conseqüências fisiológicas da dessecação em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 38-43. 2007.
72. TINOCO, A. C. Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005.
73. Villachica, H. *et al.* 1998. **Frutales y hortalizas promissórios de la Amazonia**. Lima: Tratado de Cooperación Amazonica, 96. 367p. (TCA-SPT,44).
74. CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. 6ed. Belém: CNPq/ Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. 279p. (Coleção Adolpho Ducke).
75. CALZAVARA, B.B.G. Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, cupuaçuzeiro. Belém: IPEAN. v.1, n2, 84p. 1970 (Série Culturas da Amazônia).
76. LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: ed. Plantarum, 78. 1992.
77. SOUZA, V.A.B.de; VASCONCELOS, L.F.L.; ARAÚJO, E.C.E.; ALVES, R.E. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 72p. (Série Frutas Nativas, 11).
78. MOURA, M. C. C. L. (Org.). **Bacuri: Agrobiodiversidade**. 1. ed. São Luis, 200 p. 2007.
79. CARVALHO, J.E.U.; FONTENELLE, D.S.; MÜLLER, C.H. Propagação do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) por meio da raiz primária de sementes em início de germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 13., 2003, Gramados. Informativo ABRATES. Londrina: ABRATES, 2003. v. 13, 446 p.



80. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, 1997.
81. CARVALHO, J.E.U. de; NASCIMENTO, W.M.O. do; MÜLLER, C.H. Características físicas e químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) sem sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 24: 573-575, 2002.**
82. LOCATELLI, M.; SOUZA, V.F. de. Castanha-do-Brasil: características agrônômicas, produção de mudas e propagação vegetativa. Porto Velho: EMBRAPA, UEPAE, 1990. 11p. (Circular Técnica, 17).
83. RIBEIRO, M.A. de A. Aproveitamento tecnológico de castanhas-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*): estudo da qualidade de conservação. Piracicaba, 1992. 117p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
84. BERBERT, P. R. F. Determinação do teor, ácidos graxos e características físicas das gorduras das sementes de *Theobroma grandiflorum* L. e do *Theobroma bicolor* L. e comparação com a gordura do *Theobroma cacao* L. **Revista Theobroma, 11: 91-98, 1981.**
85. CALZAVARA, B.B.G. **O cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Belém. (s.n.) 1982. 11 p. (Série Cultivos Pioneiros).
86. GEORGE, E. F. Plant tissue culture techniques. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics Limited, 574. 1993.
87. VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu**: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 108. 1993.
88. ALMEYDA, N. & MARTINS, F.W. - 1980. The peijipaye. In: **Cultivation of neglected tropical fruits with promise**. USDA, pt. 8. 10p.
89. SILVA JR., José G. da **Cromatografia de proteínas, guia teórico e prático**. Ed. Inter Ciência, 111. 2004.
90. VIJAYALAKSHMI, M. A.; *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 71.

91. LABOUREAU, E.; CAPIOD, J. C.; DESSAINT, C.; PRIN, L.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; *J. CHROMATOGR., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *680*, 189.
92. MIN, C. H.; VERDINE, G. L.; *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3806.
93. CANO, T.; MURPHY, J. C.; FOX, G. E.; WILLSON, R. C.; *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1472.
94. J.F. VAN STADEN., R.I. STEFAN, Chemical speciation by sequential injection analysis: an overview. **Talanta**, **64**: 1109–1113, 2004.
95. A.K. Das, M. de la Guardia, M.L. Cervera, Literature survey of on-line Elemental speciation in aqueous solutions. **Talanta**, **55**: 1-28. 2001.
96. K. PYRZYNSKA, Speciation of selenium compounds. **Analytical Sciences**, **14**: 479-483, 1998.
97. F. SHEMIRANI, S.D. ABKENAR, A.A. MIRROSHANDEL, M.S. NIASARI, R.R. KOZANIA. Preconcentration and speciation of chromium in water samples by atomic absorption spectrometry after cloud-point extraction. **Analytical Sciences**, **19**: 1453-1456, 2003.
98. SÁNCHEZ, D.M.; MARTÍN, R., MORANTE, R., MARÍN, J., MUNUERA, M.L. Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography. **Talanta**, **52**: 671–679, 2000.
99. BURGUERA, M., J.L.BURGUERA, Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. **Talanta**, **44**: 1581- 1604, 1997.
100. TAKÁCS, M.; ALBERTS, J. J.; EGEBERG, P. K. Characterization of natural organic matter from eight Norwegian surface waters: proton and copper binding. **Environ. Int.**, *25*: 315-323, 1999.
101. MCGEER, J. C.; SZEBEDINSZKY, C.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **133**: 147-160, 2002.

102. BROWN, V. M.; SHAW, T. L.; SHURBEN, D. G. Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. **Water Res**, 8: 797-803, 1974.
103. HOWARTH, R. S.; SPRAGUE, J. B. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Water Res**, 12: 455-462, 1978.
104. PAGENKOPF, G. K.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Effect of complexation on toxicity of copper to fishes. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 31: 462-465, 1974.
105. SUNDA, W.; GUILLARD R. R. L. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. **J. Mar. Res.** 34: 511-529, 1976.
106. MEYLAN, S.; BEHRA, R.; SIGG, L. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. **Environ. Sci. Technol**, 37: 5204-5212. 2003.
107. KARADJOVA, I.; IZGI, B. & S. GUCER. Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 57: 581–590. 2002.
108. GÓMEZ-ARIZA JL, GARCÍA-BARRERA T, LORENZO F, BERNAL V, VILLEGAS MJ, OLIVEIRA V. Composição Centesimal e de Minerais em Cascas de Frutas. **Anal Chim Acta**, 15: 524. 2004.
109. T.P. Rao, S. Karthikeyan, B. Vijayalekshmy, C.S.P. Iyer, Speciative determination of chromium(III) and chromium(VI) using flow injection on-line preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection. **Anal. Chim. Acta** 369, 69-77, 1998.
110. D. POZEBON, V. L. DRESSLER, J.A.G. NETO, A.J. CURTIUS. Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column. **Talanta**, 45: 1167–1175. 1998.
111. J. ZHENG, M. OHATA, N. FURUTA Antimony Speciation in Environmental Samples by Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**. 1675-1680. 2000.

112. Y.K. AGRAWAL ., K.R. SHARMA. Speciation, liquid–liquid extraction, sequential separation, preconcentration, transport and ICP-AES determination of Cr(III), Mo(VI) and W(VI) with calix-crown hydroxamic acid in high purity grade materials and environmental samples. **Talanta**, **67**: 112–120. 2005.
113. COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. & P. S. BONATO. **Introdução a métodos cromatográficos**. São Paulo: Editora Unicamp. 1997.
114. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. New York: LTC editora. 2003.
115. KÅGEDAL, L., ENGSTRÖM, B., ELELGREN, H., LIEBER, A. K, LUNDSTRÖM, H., SKÖLD, A. & M. SCHENNING. Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media. **Journal of Chromatography**, **537**: 17 – 32, 1991.
116. WELZ, B.; SPERLING M. Atomic Absorption Spectrometry, 3<sup>a</sup> Ed., VCH, Weinheim, 1999.
117. TSALEV, D. L. Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice. Vol. III. Boca Raton, CRC Press, Inc., Florida, 1995.
118. MANNING, D. C.; SLAVIN, W.; MYERS, S., **Anal. Chem**, **51**: 2375. 1979.
119. C.N.BANWELL, E.M.MCCASH, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw Hill, New York .1994.
120. G.D.CHRISTINA, J.E.O'REILLY, *Instrumental Analysis*, Allyn and Bacon, Inc., Massachussetts. 1986.
121. M.M.Campos, *Fundamentos da Química Orgânica*, Ed.Edgard Blücher LTDA, São Paulo.1980.
122. ARAUJO, G. C. L., GONSALEZ, M. H., FERREIRA, A. G., NOGUEIRA, A. R. A. & J. A. NOBREGA. Effect of acid concentration of closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta**, **57B**: 2121-2132. 2002.

123. KRUG, F. J. Metodos de prepare de amostras – Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para analise elementar. São Paulo; CENA Piracicaba. 2008.
124. MENEZES, E. M. S., TORRES, A. T & SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazonica**, **38**: 2 2008.
125. DOLAN, S. P. & S. G. CAPAR. Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, **15**: 593-615, 2002.
126. IBÁÑEZ, E. & A. CIFUENTES. NEW Analytical Techniques in food science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **41**: 413-450. 2001.
127. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248 – 254, 1976.
128. MIKKELSEN, S. R. & E. Cortón. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons. 1960.
129. SILVA, M. A. O. & M. A. Z., ARRUDA. Mechanization of Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins. **Analytical Biochemistry**, **351**: 155-157, 2006.
130. CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. 1969. Bioquimica, 4ª Ed., Atheneus S. A.
131. SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações. **Varela**. 1996.
132. VOET, D., VOET, J. G. & C. W. PRATT. **Biochemistry**. New York: Wiley, 1995.
133. CHUNHIENG, T., PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, **52**: 4318 – 4322. 2004.

134. KNOW, K.; PARK, K. H., RHEE, K. C. Fractionation and characterization of Proteins from Coconut (*Cocos nucifera* L.). **Journal of Agricultural and food Chemistry**, **44**: 1471 – 1745. 1996.
135. KANNAMKUMARATHA, S. S.; WROBELB, K & R.G. WUILLOUDA. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. **Talanta**, **66**: 153 – 159, 2005.
136. NELSON, D. L. & M. M. COX. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers. 2000.
137. SZPUNAR, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. **The Analyst**, **125**: 963 – 988, 2000.
138. MORENO, F. J., JENKINS, J. A., MELLON, F. A., RIGBY, N. M., ROBERTSON, J. A., WELLNER, N. & E. N. C. MILLS. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). **Biochimica Biophysica Acta**, **1698**: 175 – 186, 2004.
139. SUN, S. S. M., LEUNG, F. W. & J. C. TOMIC. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) proteins: fractionation, composition, and identification of sulfur- rich protein. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, **35**: 232-235, 1987.
140. GARCIA, J. S., MAGALHÃES, C. S. & M. A. Z. ARRUDA. Trends in metal- binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, **69**: 1-15, 2006.
141. SULKOWSKI, E. *Bioessays* **1989**, *10*, 170.
142. ANDERSSON, L.; PORATH, J. **Anal. Biochem**, **154**: 250. 1986.
143. SULKOWSKI, E.; MAKROMOL. **Chem. Macromol. Symp**, **17**: 334. 1988.
144. MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H.; PORATH, J.; **Biotechnol. Appl. Biochem**, **13**: 371. 1991.
145. UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. **J. Chromatogr.**, **A**, **988**, 1. 2003.
146. BEITLE, R. R.; ATAAL, M. M.; **AIChE Symp. Series**, **88**, 34. 1992.

147. BHATTY, R.S. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and aminoacid composition. **J. Agric. Food Chem.** **30**: 620-622. 1982.
148. DESHPANDE, S.S.; NIELSEN, S.S. Nitrogenous constituents of selected grain legumes. **J. Food Sci.** **52**: 1321-1325.1987.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)