

NFN= 26977

INSTITUTO DE QUÍMICA  
Universidade de São Paulo  
21.240

20/09/05  
OR PROCP 22/09/05  
OR Terminal 22/09/05  
Kaiuo?  
m lila

**Universidade de São Paulo**  
**Instituto de Química**

**Especiação de cobre e zinco em água de coco e a  
influência do processo de pasteurização sobre  
essas espécies**

**Rita de Cássia Siloto**

**Dissertação de mestrado**

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira**

**São Paulo**

**4 de fevereiro de 2005**

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010930

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Siloto, Rita de Cássia  
S585e Especiação de cobre e zinco em água de coco e a influência  
do processo de pasteurização sobre essas espécies / Rita de  
Cássia Siloto. -- São Paulo, 2005.  
76p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental  
Orientador: Oliveira, Pedro Vitoriano de

1. Espectroscopia por absorção atômica 2. Cromatografia  
de filtração de gel : Separação : Bioquímica 3. Eletroforese :  
Separação : Bioquímica 4. Separação sistemática : Química analítica  
qualitativa 5. Microonda : Química analítica I. T. II Oliveira,  
Pedro Vitoriano de, orientador.

543.0858 CDD

# **“Especiação de cobre e zinco em água de coco e a influência do processo de pasteurização sobre essas espécies”**

***RITA DE CÁSSIA SILOTO***

**Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Analítica.**

**Aprovada por:**

---

**Prof. Dr. PEDRO VITORIANO DE OLIVEIRA  
IQ – USP  
(Orientador e Presidente)**

---

**Profa. Dra. MARIA TERÊSA MACHINI DE MIRANDA  
IQ - USP**

---

**Prof. Dr. FABIO AUGUSTO  
IQ - UNICAMP**

**SÃO PAULO  
22 DE MARÇO DE 2005.**

*Dedico*

*À minha mãe **Aparecida de Santi Siloto** que, sem dúvida alguma, foi quem mais lutou para que eu pudesse estudar. Esteve sempre, mesmo de longe, me apoiando e me dando forças para prosseguir. Da excelente educação que recebi, ficou a maior das lições: “Nunca desista do que realmente queira fazer”*

*Obrigada por tudo e por me amar tanto!*

*Ao meu pai Silvio Atílio Siloto,*

*Irmãos Silvio Roberto e César Orioni Siloto*

*E ao “amor da minha vida” Ricardo Pinto de Oliveira,  
pelo companheirismo, cumplicidade e respeito.*

*Ao meu orientador Pedro Vitoriano de Oliveira por sua orientação científica, empenho, entusiasmo e dedicação ao longo destes dois anos de trabalho.*

*Ao Prof. Dr Sandro Marana, pois sem ele, certamente este trabalho não seria realizado na sua plenitude.*

*Dedico*

## ***Agradecimentos***

Ao meu orientador Pedro, pelo notável crescimento profissional proporcionado com a nossa convivência. E o mais importante, agradeço pela sua amizade, sinceridade e ricas conversas que me fizeram admirá-lo ainda mais.

Ao Prof. Dr. Sandro Marana por sua disponibilidade, paciência e dedicação. Agradeço muito à parceria realizada e a possibilidade de aprender a postura de um orientador ético, amigo e solidário com seus alunos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra Carmen Tadini, pelos ensinamentos, respeito e parceria realizada.

À Prof<sup>a</sup>. Elizabeth de Oliveira pelas ricas conversas, ensinamentos, amparo e amizade.

Aos Profs. Drs. Lúcio Angnes e Fábio Rocha que sempre se mostraram disponíveis. Pelos ensinamentos e momentos agradáveis de conversa.

Aos demais docentes do Instituto de Química e aos funcionários da Seção de Pós-graduação.

Aos colegas Paulo, Cassiana e Juliana pelos ensinamentos científicos e conversas.

Às colegas Kátia e Natália, do Laboratório de Engenharia de Alimentos, pelas amostras pasteurizadas e colaborações.

Aos amigos da área de bioquímica, Fabiana, Marcelo e Júlio pelas ricas conversas, grande apoio e ajuda no laboratório.

Ao grande amigo, talvez o maior deles, Kalil pelo seu carinho e total apoio.

Às amigas Wanessa, Cíntia, Andrea e Rosa pela ótima convivência nestes dois anos.

Ao amigo Rodrigo Muñoz sempre presente e companheiro.

Aos colegas do LEEAA e LAPA pela convivência.

Ao S. Djalma e D. Margarida pelo apoio de tantos anos, confiança e afeto que sempre dedicaram a mim.

À Tatiana pela convivência harmoniosa em casa e amparo nos momentos mais difíceis.

À FAPESP por apoiar e acreditar neste projeto (processo: 03/02954-0)

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

***Obrigada***



**SUMÁRIO**

Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais sobre o coqueiro e a água de coco.....	1
1.2. Composição da água de coco.....	3
1.3. Processos de conservação da água de coco.....	7
1.4. Importância biológica do Cu e do Zn.....	9
1.5. Especiação química: aspectos gerais.....	10
2. OBJETIVO.....	16
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
3.1. Instrumentação.....	17
3.2. Reagentes, soluções e amostras.....	21
3.3. Procedimento experimental.....	22
3.3.1. Descontaminação dos materiais.....	22
3.3.2. Processamento da água de coco.....	22
3.3.3. Medidas de pH em água de coco.....	22
3.3.4. Determinação da concentração total de Cu e Zn.....	23
3.3.5. Extração por separação de fase em meio micelar (Ponto Nuvem).....	23
3.3.6. Extração de lipídeos.....	26
3.3.7. Determinação da concentração total de proteínas.....	26
3.3.8. Eletroforese em gel para separação das proteínas.....	27
3.3.9. Determinação de Cu e Zn nas frações de proteínas separadas por SDS-PAGE.....	30
3.3.10. Separação das proteínas por filtração em gel.....	32
3.3.11. Determinação de Cu e Zn nas alíquotas da filtração em gel.....	34
3.3.12. Fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
4.1. Medidas de pH em água de coco.....	37

---

4.2. Determinação da concentração total de Cu e Zn.....	38
4.2.1. Programa de aquecimento do forno de grafite.....	38
4.3. Extração por ponto nuvem.....	43
4.4. Extração de lipídeos.....	45
4.5. Determinação da concentração total de proteínas.....	47
4.6. Separação de proteínas presentes em água de coco por SDS-PAGE.....	48
4.7. Determinação de Cu e Zn em frações de proteínas obtidas por SDS-PAGE	51
4.8. Separação das proteínas por filtração em gel.....	55
4.9. Determinação de Cu e Zn nas frações obtidas por filtração em gel.....	59
4.10. Fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas.....	62
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mecanismo de oxidação da dopamina pela enzima polifenoloxidase na presença de oxigênio.....	6
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática da reação catalítica cíclica da oxidação de substratos orgânicos pela enzima peroxidase.....	7
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática da seqüência analítica para estudos de especiação química.....	12
<b>Figura 4.</b>	Sistema de ultrafiltração a vácuo: (A) funil de vidro (300 mL), (B) filtros de membranas, (C) filtro de vidro sinterizado, (D) adaptador, realização de vácuo, recolhimento da amostra e (E) garra.....	19
<b>Figura 5.</b>	Sistema de ultrafiltração por pressão: (A) aparato de prolipropileno, (B) seringa para inserção da amostra, (C) membrana e (D) saída para recolhimento do filtrado.....	20
<b>Figura 6.</b>	Sistema de ultrafiltração por centrifugação: (A) tampa, (B) tubo de estireno/butadieno para amostra, (C) filtro e (D) tubo de estireno/butadieno para filtrado.....	20
<b>Figura 7.</b>	Representação esquemática da extração por ponto nuvem. ( $\Delta$ ) espécies hidrofóbicas a serem extraídas e/ou pré-concentradas..	24
<b>Figura 8.</b>	Estrutura do surfactante octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114)..	25
<b>Figura 9.</b>	Desenho esquemático da separação de proteínas por SDS-PAGE: (A) gel de empilhamento com acrilamida, (B) gel de separação com acrilamida e (C) tampão de corrida com SDS.....	28
<b>Figura 10.</b>	Curva de calibração para gel de SDS-PAGE gerada pela plotagem do log do peso molecular de cada padrão molecular de proteína vs mobilidade relativa.....	29
<b>Figura 11.</b>	Representação esquemática do processo de corte das bandas do gel de eletroforese para determinação de Cu e Zn.....	30
<b>Figura 12.</b>	Representação esquemática do processo de separação de proteínas por filtração em gel.....	33

<b>Figura 13.</b>	Representação esquemática do procedimento utilizado para o fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas.....	35
<b>Figura 14.</b>	Curvas de pirólise e atomização para Cu em solução de 10 µg/L + 0,1 % v/v HNO <sub>3</sub> + 0,05 % m/v Triton X-100 e em presença de água de coco.....	39
<b>Figura 15.</b>	Curvas analíticas de calibração aquosa e em meio de água de coco para determinação de Cu, ambas utilizando HNO <sub>3</sub> 0,1% v/v e 0,05 % m/v Triton X-100.....	40
<b>Figura 16.</b>	Curvas de pirólise e atomização para Zn em solução aquosa padrão 1,5 µg/L + 1 v/v % HNO <sub>3</sub> e em presença de água de coco	41
<b>Figura 17.</b>	Determinação de Zn em frações lipídicas de água de coco para otimização do tempo e número das extrações com CCl <sub>4</sub> .....	46
<b>Figura 18.</b>	SDS-PAGE de água de coco não processada: (A) padrão de proteínas de baixo peso molecular e (B) água de coco.....	49
<b>Figura 19.</b>	SDS-PAGE de amostras de água de coco: (A) padrões de proteínas de baixo peso molecular, (B) amostra 1, (C) amostra 2, (D) mistura de 40 cocos sem pasteurização e (E) mistura após pasteurização.....	50
<b>Figura 20.</b>	Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a amostra 1.....	51
<b>Figura 21.</b>	Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a amostra 2.....	52
<b>Figura 22.</b>	Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a mistura (n = 40 cocos) não pasteurizada.....	53
<b>Figura 23.</b>	Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a mistura (n = 40 cocos) pasteurizada.....	54
<b>Figura 24.</b>	Cromatograma de filtração em gel de água de coco não pasteurizada.....	56
<b>Figura 25.</b>	Cromatograma de filtração em gel de água de coco pasteurizada	57
<b>Figura 26.</b>	Determinação de Cu por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco não pasteurizada.....	60

---

<b>Figura 27.</b> Determinação de Cu por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco pasteurizada.....	60
<b>Figura 28.</b> Determinação de Zn por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco não pasteurizada.....	61
<b>Figura 29.</b> Determinação de Zn por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco pasteurizada.....	61
<b>Figura 30.</b> Resultados da determinação de Cu por ETAAS em diversas frações de água de coco obtidas por ultrafiltrações.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Variações físicas e químicas da água de coco em diferentes estágios de maturação do coco.....	3
<b>Tabela 2.</b>	Concentrações de alguns macroconstituintes da água de coco em diferentes estágios de maturação do coco.....	4
<b>Tabela 3.</b>	Parâmetros instrumentais dos espectrômetros de absorção atômica.....	17
<b>Tabela 4.</b>	Programa de aquecimento para determinação de Cu por SS-ETAAS.....	31
<b>Tabela 5.</b>	Programa de aquecimento do forno de microondas focalizadas para digestão do gel de SDS-PAGE.....	32
<b>Tabela 6.</b>	Resultados de medidas diretas de pH e titulação potenciométrica da água de coco.....	37
<b>Tabela 7.</b>	Programa de aquecimento otimizado para determinação de Cu por ETAAS.....	40
<b>Tabela 8.</b>	Programa de aquecimento otimizado para a determinação de Zn por ETAAS.....	42
<b>Tabela 9.</b>	Concentração de Cu e Zn em água de coco e resultados de recuperação (n = 3).....	43
<b>Tabela 10.</b>	Valores de limite de detecção e quantificação para Cu e Zn.....	43
<b>Tabela 11.</b>	Resultados da determinação de Cu em frações obtidas na extração por ponto nuvem (n=3).....	44
<b>Tabela 12.</b>	Resultados da determinação de Zn em frações obtidas na extração por ponto nuvem (n=3).....	45
<b>Tabela 13.</b>	Resultados da determinação da concentração de Zn na fração lipídica de água de coco.....	47
<b>Tabela 14.</b>	Dosagem da concentração total de proteínas de algumas amostras de água de coco (n=3).....	48
<b>Tabela 15.</b>	Massas moleculares das proteínas de maior abundância em água de coco não pasteurizada.....	56

---

<b>Tabela 16.</b> Massas moleculares das proteínas de maior abundância em água de coco pasteurizada.....	57
<b>Tabela 17.</b> Resultados da determinação da concentração de Cu por ETAAS em diversas frações de água de coco obtidas por ultrafiltrações.....	63
<b>Tabela 18.</b> Resultados da determinação da concentração total de Zn por ETAAS e na menor fração de ultrafiltração presente na água de coco (n=2).....	65

## RESUMO

A água de coco é considerada uma bebida isotônica, nutritiva e pouco calórica. A sua composição química é bastante complexa, alguns dos principais constituintes são açúcares e minerais e, em menores quantidades, lipídeos e compostos nitrogenados. Um grande desafio é preservar a água de coco por longo período de tempo fora do fruto, mantendo as suas características físicas e organolépticas. A pasteurização é um dos processos de conservação que vem sendo utilizado com esse propósito. No entanto, pouco se sabe a respeito da influência desse processo de conservação na composição química da água de coco. Nesse sentido, a proposta desse trabalho foi investigar as espécies químicas de Cu e Zn presentes na água de coco, bem como avaliar a influência do processo de pasteurização sobre essas espécies. Para esse estudo foram feitas medidas de pH e da concentração hidrogeniônica, extração em ponto nuvem, extração por solvente, ultrafiltrações e determinação da concentração total de proteínas visando a separação com eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e cromatografia por filtração em gel. As determinações de Cu e Zn foram feitas na água de coco total e nas frações por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). Os resultados das determinações totais de Cu e Zn, e de proteínas mostraram que a composição dessas espécies varia muito entre os diferentes frutos. A combinação dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas indicou que o Cu está, preferencialmente, associado às moléculas de maiores pesos moleculares, enquanto que o Zn encontra-se associado a pequenas moléculas. A pasteurização não afetou o pH, a concentração total dos elementos e de proteínas. Porém, a partir dos resultados da cromatografia por filtração em gel e da determinação de Cu e Zn nas frações coletadas do eluente, foi possível observar que a pasteurização provocou alterações nos pesos moleculares das proteínas e, possivelmente nos elementos associados a elas. As mudanças observadas indicam quebra de ligações fracas, provavelmente dissulfeto, rompendo aglomerados protéicos (maior massa molecular) e aumentando a abundância de proteínas mais leves (menor massa molecular).



## ABSTRACT

Coconut water is a natural isotonic, nutritive and low caloric drink. Its chemical composition is quite complex, some of the main compounds are sugars and minerals and, in smaller amounts fat and compounds of nitrogen. The coconut water preservation outside the fruit, maintaining its physical and organolépticas properties is a big challenge. Pasteurization has been used as one of the most common preservation processes. However, little knowledge exists about the influence of preservation processes over coconut water chemical composition. This way, the aim of this work was to investigate the chemical species of Cu and Zn in coconut water and evaluate the influence of pasteurization over these species. For this, many procedures such as, pH measurements, cloud point extractions, solvent extraction, ultrafiltration, measurement of total protein concentration, sodium dodecil sulphate poliacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel filtration chromatography were executed. The Cu and Zn determinations were made in a whole coconut water and in its different fractions, obtained by the separation techniques by using electrothermal atomic absorption spectrometry. The results of Cu, Zn and protein determinations showed that there is a big variation between different fruits. Results obtained by all techniques used showed that Cu is, preferentially linked to big molecules and Zn is associated to small molecules. The results of gel filtration chromatography associated to the concentration of Cu and Zn in the collected fractions showed the strong possibility of linkage of these elements with proteins. The pasteurization did not cause significant changes in the total proteins concentration, however, the changes observed indicated the break in weak chemical connections, probably in proteins (agglomerations of high molecular mass), increasing the abundance of small proteins (low molecular mass).

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais sobre o coqueiro e a água de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera*, L.) é uma planta da classe Monocotyledoneae de clima tropical, cultivada em mais de 86 países, numa área estimada em 11,6 milhões de hectares. Tem sua produção concentrada na Ásia, sendo as Filipinas, a Indonésia e o Sri Lanka os maiores produtores mundiais<sup>(1)</sup>.

No Brasil a produção se concentra nos estados do norte e nordeste. O estado da Bahia tem a maior área destinada à cultura de coco no país, possui 234 mil hectares plantados, seguido do Ceará com 70 mil hectares. No Centro-Sul, o destaque é o Espírito Santo que planta 25 mil hectares. Somente em 1999, a produção paulista cresceu 68% em relação a 1998 e vem roubando espaço da laranja e do café, atualmente sua área atinge um pouco mais de 4 mil ha<sup>(2)</sup>.

Apesar de ser o oitavo maior produtor de coco do mundo, o Brasil importa mais o produto do que exporta. Segundo um levantamento realizado por Secex (Secretaria do comércio exterior), em 1999 a importação de coco seco (sem casca e ralado) chegou a 11,3 milhões de dólares, o que corresponde a 7300 toneladas, o dobro de 1998. Nesta mesma época, a exportação foi insignificante: apenas 187 toneladas (197 mil dólares)<sup>(3)</sup>.

A crescente demanda pelo fruto e seus derivados observada a partir do início do século 20 revolucionou o cultivo da planta. Antes, praticamente só existia no Brasil o coqueiro-gigante, com até 30 metros de altura, de baixo rendimento e difícil manejo, produzindo cerca de 50 cocos por ano. No final da década de 20, foi introduzido no Brasil o coqueiro-anão, trazido da Malásia, com 12 metros de altura e produção anual acima de 100 cocos. Posteriormente, foi desenvolvido pela EMBRAPA, o coqueiro-anão precoce que é um híbrido do cruzamento das espécies anão e gigante e produz em média 240 frutos por ano. Devido a grande quantidade de água, o coqueiro-anão é a espécie mais cultivada para a produção de água de coco, preferencialmente nos estados do Espírito Santo e São Paulo<sup>(4)</sup>.

Do coqueiro pode-se aproveitar tudo, as fibras podem ser utilizadas na fabricação de tapetes, redes, esteiras, cordas de navio e escovas. Da casca do coco

produzem-se copos, colares, facas e instrumentos musicais. A raiz pode ser transformada em luminárias e jogos americanos para mesa. Do fruto são extraídos alguns produtos, tais como, coco ralado, leite de coco, água de coco e também pode ser utilizado na preparação de alguns sub-produtos, como leite infantil, triglicérides de cadeia média, coberturas de bolachas, glicerina, sabonete e detergente biodegradável<sup>(5)</sup>.

A água de coco começa a se formar um mês e meio após a polinização da flor, o volume formado atinge seu máximo em torno de seis meses de idade, correspondendo a 25% do seu peso. Esta é a melhor época da colheita do fruto, nessa fase de maturação, além do volume ser o maior, a água é mais saborosa, rica em nutrientes e apresenta menor teor de gorduras, o que a coloca em uma posição de destaque entre as bebidas isotônicas<sup>(6)</sup>.

O crescente consumo faz com que a água de coco concorra com o mercado de refrigerantes e bebidas isotônicas artificiais, representando 1,4 % desse consumo, segundo a ABRASCOCO (Associação Brasileira do Coco), estimado em cerca de 10 bilhões de litros por ano, segundo a ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação)<sup>(7,8)</sup>.

A água de coco é utilizada em diversas áreas de pesquisas, como por exemplo, na medicina, biotecnologia e nutrição. Suas aplicações medicinais são as mais variadas: auxilia no tratamento de distúrbios intestinais, na recuperação de problemas do estômago, no tratamento da artrite, no controle da pressão arterial, na redução da febre e também age como calmante natural<sup>(9)</sup>. Por apresentar densidade, pH e algumas substâncias semelhantes ao plasma sanguíneo (aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B, ácido ascórbico e diversos eletrólitos), a água de coco vem sendo utilizada como infusão intravenosa em casos de desidratação<sup>(6,10)</sup>. Na biotecnologia é utilizada como diluente que juntamente com a gema de ovo e glicerol constituem um conservante do sêmen caprino, ovino, suíno e canino<sup>(6,11)</sup>. Além disso, a água de coco é capaz de manter a longevidade de células como córneas humanas para transplante, culturas de tecido, meio de culturas para vírus e bactérias, e para obtenção de vacinas contra febre aftosa, raiva e leishmaniose. Pode também ser utilizada em casos de desnutrição como

suplemento protéico e por fim, na área alimentícia, a valorização da água de coco deve-se ao fato dela ser um isotônico natural e uma bebida pouco calórica<sup>(6)</sup>.

## 1.2. Composição da água de coco

A composição da água de coco varia de acordo com seu grau de maturação, práticas de cultivo e condições nas quais o coco foi desenvolvido. Alguns dos principais constituintes presentes na água de coco são açúcares e minerais, e em menores quantidades, lipídeos e compostos de nitrogênio. Na Tabela 1 estão representadas as variações de algumas espécies químicas, pH e quantidade de água de coco em função dos estágios de maturação do fruto<sup>(12)</sup>.

**Tabela 1.** Variações físicas e químicas da água de coco em diferentes estágios de maturação do coco.

Estágio de maturação*	Quantidade de água (g)	pH	Açúcares Totais (g / 100g água)	Gorduras (mg / 100g água)	Proteínas (mg / 100g água)
I	250	4,80	4,8	4,5	11,3
II	216	4,95	5,7	1,5	18,1
III	179	5,09	4,6	7,2	22,5
IV	126	4,50	3,8	12,6	39,4
V	84	4,45	3,1	28,7	45,6
VI	53	4,55	2,8	53,6	79,4
VII	53	4,65	2,0	-----	82,5
VIII	55	5,10	2,0	83,0	75,6

\* I = 6 meses, VIII = 13 meses

O pH apresenta pequena variação com a maturidade do fruto, o valor médio é de 4,75. Esta acidez se deve principalmente aos ácidos orgânicos, ácidos graxos e

ao dióxido de carbono dissolvido<sup>(12)</sup>. Dentre os ácidos orgânicos que podem ser encontrados tanto na polpa como na água de coco estão o tartárico, cítrico, láctico, acético e málico, sendo este último o que se apresenta em maior concentração<sup>(13)</sup>.

A concentração de alguns macroconstituintes inorgânicos também pode variar ao longo do período de maturação, principalmente de K, S e P, porém não de maneira significativa como as espécies orgânicas (Tabela 2)<sup>(12)</sup>.

Estudos de extrações realizados na polpa do coco indicaram a presença de diferentes grupos de proteínas: albuminas, globulinas, prolaminas, gluteínas-1 e gluteínas-2, sendo que as globulinas representam 40 % do total de proteínas extraídas<sup>(14)</sup>.

**Tabela 2.** Concentrações de alguns macroconstituintes da água de coco em diferentes estágios de maturação do coco.

Estágio de maturação*	Concentração (mg / 100g água)						
	K	Na	Cl	Ca	Mg	S	P
I	324	21	100	48	16	58	9,2
II	291	42	75	44	10	58	9,2
III	290	42	91	53	11	60	9,6
IV	272	52	85	54	11	65	8,3
V	282	52	72	57	17	70	7,1
VI	275	52	130	51	15	90	8,9
VII	247	48	108	40	15	80	6,3

\* I = 6 meses, VII = 12 meses

Dentre os diversos fatores responsáveis pela degradação da água de coco, merece destaque a ação de duas enzimas que são a polifenoloxidase (PFO) e a peroxidase (POD). Quando em contato com o oxigênio atmosférico elas catalisam reações de oxidação em compostos presentes na água de coco, alterando as suas propriedades físicas e químicas<sup>(15)</sup>.

Medidas espectrofotométricas realizadas em água de coco indicaram que as enzimas PFO e POD apresentam atividade enzimática igual a 5 e 0,3 U/mL, respectivamente. Essas enzimas, apresentaram massas moleculares de aproximadamente a 73,8 kDa (PFO) e 49,2 kDa (POD), quando foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com uso de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de filtração em gel<sup>(15)</sup>.

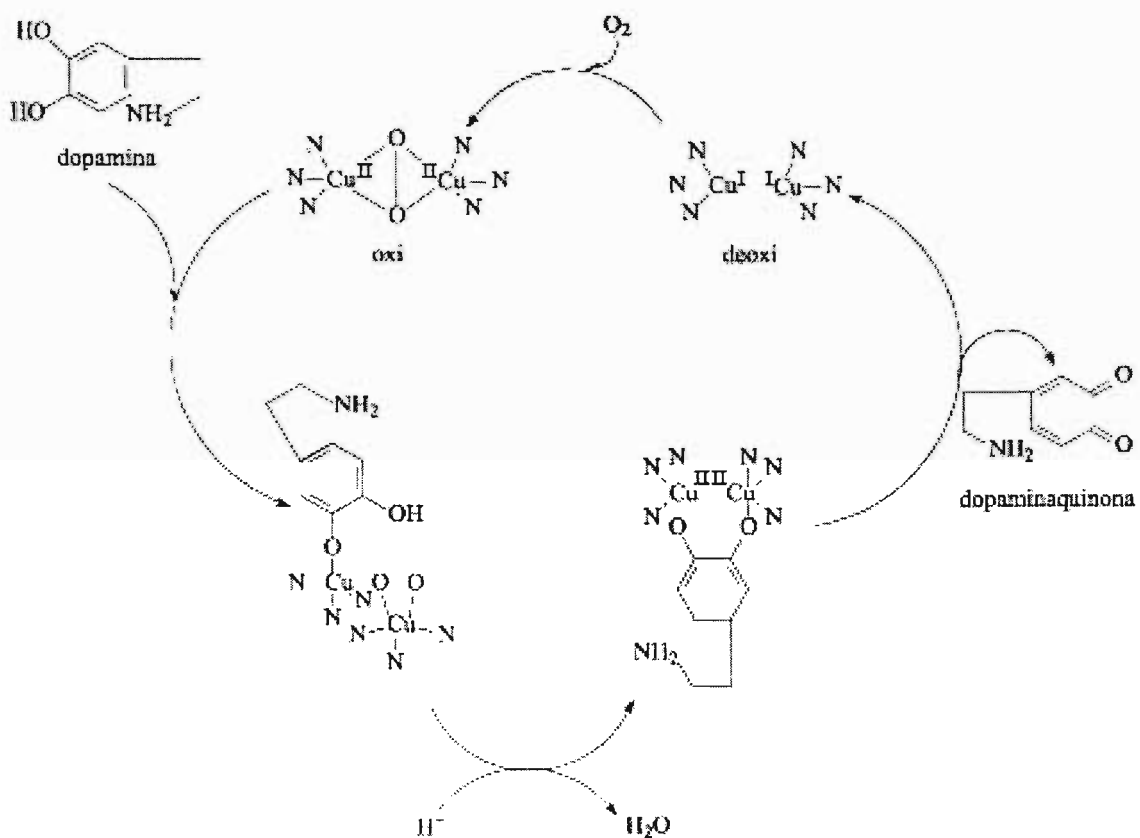
A PFO também conhecida como tirosinase, catecolase ou catecol oxidase catalisa a oxidação tanto de monofenóis (tirosina, fenol, etc.) como de difenóis (catecol, L-dopa, dopamina, adrenalina, etc.)<sup>(16)</sup>. Está presente em algumas bactérias e fungos, na maioria das plantas, em alguns artrópodes e mamíferos. Em todos esses casos a enzima está associada com a pigmentação escura do organismo. Ela está presente em altas concentrações na batata, pêssego, maçã, banana, manga, abacate, folhas de chá, café, na polpa e na água de coco<sup>(17)</sup>.

Na sua forma oxidada, a PFO apresenta-se como um complexo binuclear com dois átomos de Cu(II) no seu centro ativo, como apresentado no mecanismo proposto de oxidação de dopamina (Figura 1). A formação da dopaminaquinona depende tanto da concentração de oxigênio como da concentração da enzima. Uma vez formada, a dopaminaquinona pode sofrer polimerização, levando à formação de melaninas, responsáveis pela pigmentação escura formada nos alimentos<sup>(18)</sup>.

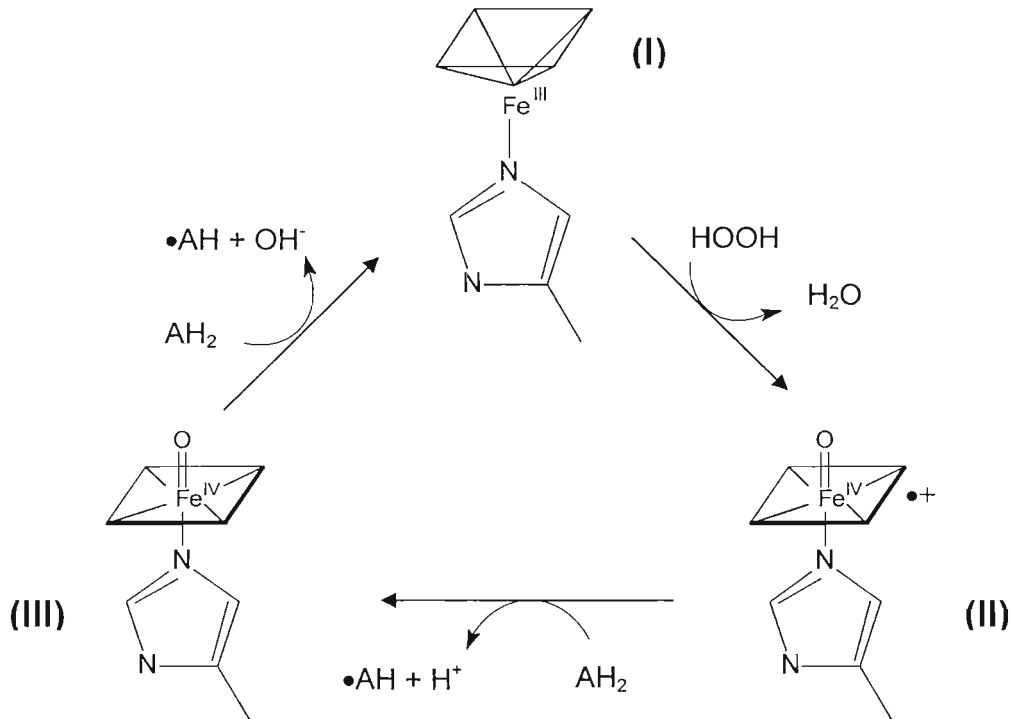
Não há evidências na literatura que mostrem a ocorrência desse mecanismo em água de coco, porém o escurecimento observado horas após o contato com o ar, permite supor que mecanismos semelhantes ocorram com constituintes da água de coco.

As POD são um grupo de enzimas que catalisam reações de óxido-redução, comumente ocorridas em frutas e vegetais. Sua atividade aumenta ao longo do processo de amadurecimento do fruto, juntamente com outras enzimas como poligalacturases e celulases<sup>(19)</sup>. Um esquema da reação catalítica cíclica da peroxidase está representado na Figura 2. Esta enzima possui um grupo heme, com íons  $Fe^{3+}$ , como um cofator. Ela utiliza  $H_2O_2$  como um aceptor de elétrons resultando em um intermediário com íons  $Fe^{4+}$ , enquanto o peróxido de hidrogênio é reduzido à água. Posteriormente, o intermediário II catalisa a oxidação de substratos orgânicos ( $AH_2$ ), formando um radical ( $\bullet AH$ ), enquanto sofre oxidação formando a

estrutura III. O cofator é regenerado para a estrutura I através da oxidação de um substrato orgânico. Normalmente, as reações de oxidação dos substratos orgânicos provocam a degradação dos alimentos<sup>(20,21)</sup>.



**Figura1.** Mecanismo de oxidação da dopamina pela enzima polifenoloxidase na presença de oxigênio.



**Figura 2.** Representação esquemática da reação catalítica cíclica da oxidação de substratos orgânicos pela enzima peroxidase.

### 1.3. Processos de conservação da água de coco

Um dos grandes desafios atuais é preservar a água de coco por longo tempo fora do fruto, o que facilitaria o transporte das regiões produtoras para os centros consumidores, a exportação e o destino final do resíduo gerado com a casca do coco. No entanto, devido à ação de enzimas, principalmente a peroxidase e a polifenoloxidase, entre outros processos, logo após ser retirada do fruto, a água de coco inicia um processo de degradação que provoca seu escurecimento gradativo, alterando as suas características físicas, químicas e organolépticas<sup>(18)</sup>. Diversas tentativas vêm sendo implementadas no sentido de neutralizar os efeitos dessas enzimas e de microorganismos, tornando possível a comercialização da água de



coco em diversos tipos de embalagens. Entre os processos de conservação mais explorados estão o resfriamento, o congelamento, a pasteurização e a ultrafiltração<sup>(22)</sup>. Este último vem sendo desenvolvido pela Embrapa e ainda está em caráter experimental.

O resfriamento é o processo de conservação mais brando, a água de coco é simplesmente envasada e armazenada a temperatura de 5 °C. Entretanto, este processo não é largamente empregado pelas indústrias, uma vez que a água de coco resfriada apresenta curto tempo de prateleira, apenas 3 dias<sup>(22)</sup>.

O congelamento é realizado em câmaras frigoríficas com auxílio de soluções criogênicas, como por exemplo, salmouras de NaCl ou de CaCl<sub>2</sub> e soluções hidroalcolólicas. No entanto, o processo de congelamento apresenta alguns problemas, como a impossibilidade de consumo imediato e de recongelamento, alto custo do armazenamento e, principalmente, possíveis perdas de nutrientes<sup>(22)</sup>.

A pasteurização é realizada com auxílio de trocadores de calor do tipo placas de inox, onde a água de coco é submetida a temperaturas entre 75 e 90 °C, por um tempo que pode variar de 20 a 500 s<sup>(22)</sup>. Posteriormente, realiza-se um resfriamento rápido para a inativação microbiológica. Para as indústrias, a otimização do binômio temperatura e tempo é crucial para a aplicação de um processo satisfatório, capaz de inativar enzimas e controlar a população microbiológica, sem provocar alteração das propriedades organolépticas e nutricionais.

A ultrafiltração pode ser realizada a temperatura ambiente. Inicialmente, faz-se uma filtração com filtro de porosidade de 8 µm para a retirada de cascas e de partes da polpa que são dispersos na água de coco no momento de abertura do fruto. Posteriormente, faz-se a ultrafiltração, podendo ser utilizados filtros de membranas de porosidades de 0,01 a 0,1 µm. Os maiores problemas da utilização deste método de conservação são o custo elevado dos equipamentos e as possíveis perdas de nutrientes<sup>(21)</sup>.

Pesquisa recente mostrou que a pasteurização não provoca alterações significativas na concentração total de algumas espécies inorgânicas como Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn presentes na água de coco. No entanto, a determinação da concentração destes elementos em diferentes frações, obtidas a partir de ultrafiltrações, mostrou alterações na distribuição de Cu, Fe e Zn<sup>(23)</sup>.

#### 1.4. Importância biológica do Cu e do Zn

Os elementos metálicos, semimetálicos e não metálicos, nas formas iônicas, livres ou associados a outras espécies químicas, estão presentes nos sistemas biológicos e desempenham importantes papéis na manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos<sup>(24)</sup>. Devido a essencialidade destes elementos, deficiências podem desencadear desequilíbrios nos sistemas biológicos, podendo provocar, em casos de carência aguda, doenças e até a morte. Dietas balanceadas e suplementação alimentar minimizam ou até eliminam estes problemas. Por outro lado, alguns dos elementos metálicos, apesar de serem essenciais, em quantidades excessivas podem causar sérios danos ao organismo<sup>(25)</sup>.

O cobre é um elemento necessário para o metabolismo do ferro, respiração celular, formação óssea, desenvolvimento de tecidos conectivos, queratinização e pigmentação de tecidos. É um componente essencial de muitas metaloenzimas com importância fisiológica, incluindo citocromo oxidase, lisil-oxidase, superóxido dismutase, dopamina- $\beta$ -hidroxilase e polifenoloxidase<sup>(26)</sup>. Embora o cobre não seja um componente da hemoglobina, traços desse elemento são requeridos para que o organismo humano utilize o ferro na sua formação, por isso anemias podem ser desenvolvidas tanto por carência de Fe quanto de Cu. A deficiência de Cu causa um aparente atraso na maturação e diminuição no tempo de vida das hemáceas do sangue. A metaloenzima citocromo oxidase é a oxidase terminal da cadeia respiratória, ela participa da fosforilação oxidativa, catalisando a redução de O<sub>2</sub> à água, um essencial passo na respiração celular. A presença de teores elevados de cobre no organismo implica na redução de vitamina A na corrente sanguínea e em problemas renais, que em casos agudos, podem levar à doença de Wilson<sup>(24)</sup>.

O zinco está associado a enzimas, como parte da molécula ou como um ativador. Em seu papel estrutural, o zinco estabiliza a estrutura quaternária das enzimas. Em 1939, foi descoberto que o Zn faz parte da constituição da metaloenzima anidrase carbônica. Hoje mais de 200 proteínas associadas ao zinco são conhecidas e muitas funções biológicas têm sido esclarecidas, incluindo aquelas de replicação e diferenciação celular. Está envolvido nos processos de crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e regulação do sistema

imunológico<sup>(26)</sup>. Sinais de deficiência de Zn em animais e humanos inclui: retardamento do crescimento, formação óssea anormal, atraso no desenvolvimento sexual, dermatites, entre outros problemas<sup>(27)</sup>. A deficiência de zinco pode também afetar a produção e liberação de alguns hormônios como: testosterona, insulina e corticosteróides adrenais<sup>(26)</sup>. Elevadas doses de Zn podem causar hiperglicemia, além de afetar o intestino e o fígado<sup>(24)</sup>.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de cobre e zinco para adultos é de 1,5 –3,0 mg e 15 mg, respectivamente, estes valores variam para crianças, mulheres grávidas e lactantes<sup>(26)</sup>.

As concentrações de Cu e Zn presentes em água de coco estão em torno de 5 e 400 µg/L respectivamente.

Devido a baixa concentração de Cu, a água de coco não pode ser considerada como uma importante fonte desse elemento. Porém, o mesmo não pode ser dito para o Zn, que se encontra numa concentração em torno de 100 vezes maior.

Como o Cu está presente na PFO e, possivelmente, em outras espécies, como proteínas, estudos no sentido de avaliar as variações provocadas pela pasteurização tornam-se importantes. Um raciocínio semelhante pode ser atribuído ao Zn, que até onde se sabe, apesar de não pertencer às enzimas que causam degradação da água de coco, é um elemento essencial e informações que auxiliem a entender e conhecer os efeitos provocados pela pasteurização sobre as espécies que o contém são importantes. Adicionalmente, as informações sobre a composição química da água de coco não processada, com respeito a Cu e Zn, podem gerar informações que serão úteis às diversas áreas de aplicação da água de coco, tais como, medicina, biotecnologia, alimentícia, etc.

### **1.5. Especificação química: aspectos gerais**

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define o termo especificação como "Um processo no qual são fornecidas evidências da forma atômica, molecular ou da configuração em que uma espécie pode ocorrer em um composto ou em uma matriz"<sup>(28)</sup>. Porém, em uma publicação mais recente contida

na revista da IUPAC, faz-se a distinção entre os termos especiação e fracionamento, a fim de evitar ambigüidades entre os seus significados. Especiação é definida como “atividade analítica de identificar espécies químicas e medir suas distribuições” e o fracionamento como “processo de classificação de um analito ou um grupo de analitos de uma certa amostra, de acordo com suas propriedades físicas e químicas”<sup>(29)</sup>.

As principais características do comportamento químico dos metais, como por exemplo, sua solubilidade, mobilidade, disponibilidade ou toxicidade são dependentes da forma específica em que o elemento se encontra. Isso explica a necessidade, em certos casos, de conhecer a concentração de cada espécie presente no sistema, além de sua concentração total.

A especiação é particularmente importante para as amostras ambientais, de alimentos, de tecidos e de fluídos biológicos. As diferentes espécies dos elementos de interesse podem ser identificadas pelo seu estado de oxidação (espécies redox), pela sua forma molecular (compostos organometálicos), pela coordenação (complexos), pela fase na qual se encontram (dissolvidas, coloidais, suspensas, adsorvidas, etc) ou também pela solubilidade em um solvente específico (água, soluções salinas e ácidos)<sup>(30,31)</sup>.

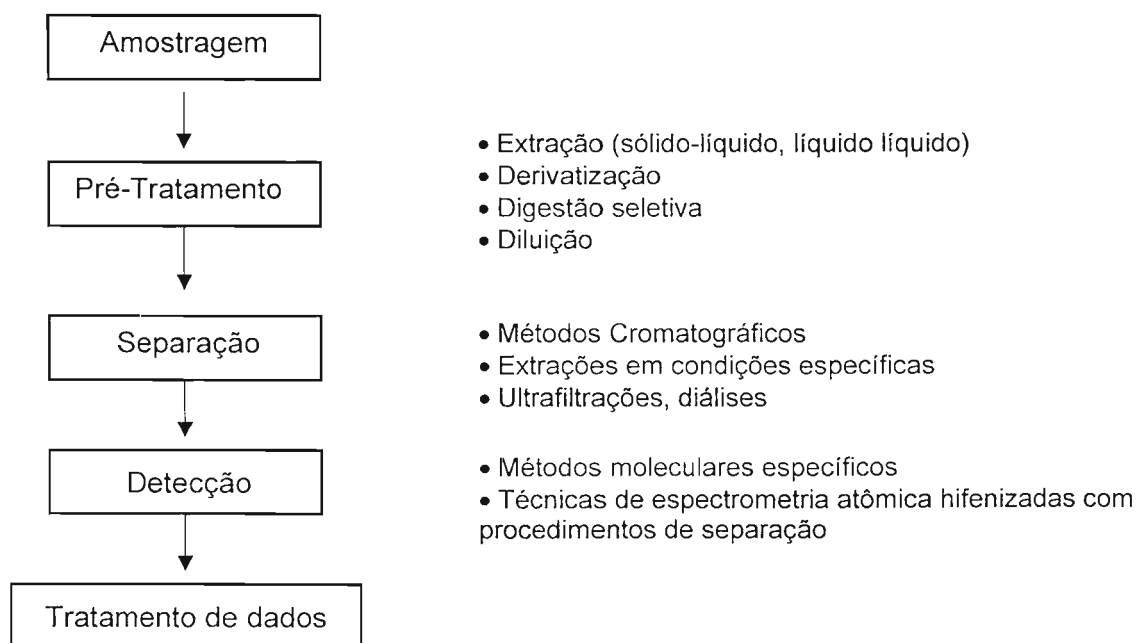
Os metais podem existir em diferentes formas na natureza, cada uma delas com uma atividade bio-toxicológica específica. Quando os metais estão presentes em baixas concentrações ou até mesmo em nível traço em substratos como alimentos, eles provavelmente estão associados a compostos macromoleculares como lipídeos, proteínas ou carboidratos. Seus efeitos nutricionais são totalmente dependentes destas associações<sup>(32)</sup>.

A toxicidade de compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos alimentos é um aspecto bastante relevante. Por exemplo, arsênio e seus compostos representam 25% dos estudos de especiação realizados, sendo um dos elementos mais investigados neste tipo de estudo<sup>(30)</sup>. Existem mais de 20 compostos de arsênio presentes no meio ambiente e em sistemas biológicos, o potencial tóxico depende fortemente da espécie a que ele está associado. Por exemplo, a arsenobetaina  $((\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$ , uma espécie de arsênio presente em crustáceos, apresenta concentração típica de 10  $\mu\text{g/g}$  em lagostas. Se um indivíduo

ingerir 200 gramas deste alimento, estará ingerindo 2000  $\mu\text{g}$  de arsênio, quantidade bastante alta. Mas este composto não apresenta toxicidade para o homem, é rapidamente excretado através da urina. Já na sua forma inorgânica, o arsênio apresenta potencial altamente tóxico, como é o caso de arsenito ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ) e arsenato ( $\text{AsO}(\text{OH})_3$ )<sup>(33)</sup>.

A especiação química de elementos requer uma seqüência analítica muito mais elaborada do que a determinação da concentração total (Figura 3). Todas as etapas que precedem a detecção devem ser cuidadosamente conduzidas para que a integridade da espécie química de interesse seja mantida, ou seja, as identidades das espécies devem ser preservadas.

A amostragem requer representatividade, e além disso, esforços não devem ser poupados para evitar a ocorrência de distúrbios no sistema químico a ponto de prejudicar a integridade da espécie química de interesse. Alguns fatores podem alterar as distribuições das espécies no sistema e por isso devem sempre ser considerados, entre eles: pH, temperatura, teor de oxigênio e exposição à luz, além disso, o tipo de frasco em que a amostra é armazenada também deve ser criteriosamente escolhido<sup>(30)</sup>.



**Figura 3.** Representação esquemática da seqüência analítica para estudos de especiação química<sup>(30)</sup>.

A etapa de pré-tratamento da amostra pode ser uma simples diluição como pode também envolver procedimentos mais complexos, como por exemplo, derivatizações. O processo de pré-tratamento da amostra deve ser claramente entendido e controlado, uma vez que podem existir problemas de contaminação, perturbação no equilíbrio e até perdas das espécies de interesse.

Em geral, nos estudos de especiação, a separação é uma etapa muito importante, sobretudo quando a técnica escolhida para a detecção não apresenta seletividade. Apesar da excelente sensibilidade, as técnicas espectroscópicas podem ser consideradas como não seletivas para espécies químicas, tornando-se necessária uma etapa de separação prévia<sup>(30)</sup>.

Dentre as técnicas que permitem a separação de espécies para posterior quantificação merecem destaque a eletroforese capilar, a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa. Entretanto, outras abordagens, envolvendo velhas práticas de extrações sucessivas, podem ser utilizadas no sentido de isolar espécies ou grupos de espécies de interesse<sup>(30)</sup>. Estes métodos menos sofisticados, porém não menos importantes para os estudos de especiação, promovem o isolamento das espécies em grupos específicos, como por exemplo, metal-lipídeo, metal-carboidrato, entre outros. O termo mais apropriado para este tipo de separação é “fracionamento de espécies”. Dentre as técnicas de fracionamento mais utilizadas estão a centrifugação, a ultracentrifugação, a ultrafiltração, a diálise, as extrações sucessivas, as precipitações seletivas, entre outras<sup>(34)</sup>.

As técnicas espectroanalíticas mais utilizadas em estudos de especiação química são a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), a espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICPOES). Uma revisão da literatura mostra que essas técnicas correspondem a aproximadamente 22, 18 e 16%, respectivamente, como detectores para estudos de especiação. Destaque especial deve ser dado as técnicas de ETAAS e ICP-MS devido a alta sensibilidade<sup>(30)</sup>.

A ETAAS é uma técnica que se caracteriza pela alta sensibilidade, baixo limite de detecção e que necessita de pequenos volumes das soluções analíticas e amostras para as determinações dos elementos de interesse. A alta sensibilidade é

desejável uma vez que estudos de especiação são realizados com elementos que estão presentes em nível traço nas amostras, sendo que as concentrações das espécies de interesse, nas frações obtidas, podem chegar a ultra-traço. Outro aspecto que deve ser salientado é a possibilidade de decomposição da amostra dentro do tubo de grafite, promovendo um pré-tratamento térmico da amostra "in situ" durante o ciclo de aquecimento, isso permite a utilização de diferentes meios para a solubilização da amostra. Diferentes eluentes podem ser utilizados em colunas cromatográficas, sem que os solventes precisem ser eliminados antes da análise, facilitando o procedimento e permitindo menor manipulação da amostra. Uma das limitações da técnica ETAAS está relacionada com a grande dificuldade de acoplamento "on-line" com os procedimentos de separação. Isso porque, uma vez que a amostra é inserida no forno de grafite, passa por um programa de aquecimento antes de ser atomizada. Este programa consiste em etapas de secagem, pirólise, atomização, limpeza e resfriamento. Desta forma, a amostragem é descontínua e o acoplamento "on-line" torna-se bastante difícil<sup>(34)</sup>.

Diversos autores têm descrito estudos de especiação de elementos em amostras de leite. Nestes estudos, as técnicas de separação mais utilizadas são a centrifugação, ultra-centrifugação, extração em fase sólida com colunas cromatográficas de troca iônica, cromatografia por filtração em gel, e os detectores utilizados são ETAAS, FAAS, ICPOES ou ICP-MS<sup>(32,35-39)</sup>. A distribuição padrão elementar vem sendo estudada com o objetivo de obter maiores informações sobre a biodisponibilidade dos elementos, considerando aspectos nutricionais do leite.

Um estudo foi realizado em sementes de feijão com o intuito de investigar as propriedades e formas de ligações de Cd e Ni em extratos das proteínas contidas nesse tipo de alimento. Utilizaram como técnica de fracionamento a ultrafiltração. O estudo foi iniciado desde a plantação das sementes de feijão, utilizando irrigação com água enriquecida com os elementos de interesse. Com este estudo foi possível relacionar propriedades de ligações com estabilidade relativa das espécies entre outras propriedades termodinâmicas dos compostos presentes no extrato de proteínas das sementes<sup>(40)</sup>. Além deste estudo, outros vêm sendo realizados em sementes de legumes<sup>(41)</sup>, castanhas<sup>(42)</sup>, produtos de oliva<sup>(43)</sup>, todos com o objetivo de investigar a distribuição de diferentes espécies de elementos e relacioná-las com

---

aspectos nutricionais. De uma forma geral, as atenções têm estado bastante voltadas para composição protéica dos alimentos.

Também é possível encontrar estudos de especiação química em bebidas<sup>(44,45)</sup>. Um trabalho recente no qual Cu, Zn e Fe são especiados em amostras de vinho utiliza FAAS e ETAAS como detectores, dependendo dos teores dos elementos presentes em cada fração. Neste trabalho, foram estudadas as frações contidas em proteínas, polissacarídeos, polifenóis, espécies lábeis de Fe(II), Fe(III), Cu e Zn e espécies aniônicas<sup>(44)</sup>. Para obtenção destas frações, utilizaram extração por solvente como, acetona para extrair proteínas e etanol para extrair polissacarídeos, resinas como Amberlite XAD-2 para compostos não polares e XAD-8 para compostos polares, Chelex-100 para separar compostos lábeis, Dowex 50-X8 de troca catiônica na forma de (H<sup>+</sup>) e Dowex 1-X8 de troca aniônica na forma de (Cl<sup>-</sup>).

Até o presente momento não existem trabalhos na literatura envolvendo investigações das espécies de Cu e Zn em água de coco. No entanto, considerando a presença desses elementos nesta amostra, suas essencialidades, e associações com enzimas, investigações para conhecer melhor as espécies químicas associadas ao Cu e Zn e o efeito que a pasteurização pode provocar sobre elas, são importantes sobre o ponto de vista científico e também comercial.



---

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho é determinar as concentrações de Cu e Zn em água de coco, bem como investigar os grupos de espécies aos quais esses elementos podem estar associados.

É também objetivo do trabalho, verificar as possíveis alterações provocadas nestas espécies pelo processo de pasteurização.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Instrumentação

Para as determinações elementares de Cu e Zn foram utilizados espectrômetros de absorção atômica, modelo ZEE nit<sup>®</sup> 60 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) com aquecimento transversal e modelo SIMAA – 6000 (Perkin–Elmer, Norwalk, EUA) com aquecimento longitudinal. Ambos equipados com corretor de radiação de fundo por efeito Zeeman, atomizador recoberto com grafite pirolítico, plataforma de grafite pirolítico e amostrador automático.

Todas as medidas foram baseadas em valores de absorbância integrada. O gás de purga utilizado foi argônio 99,998% (v/v) (Air Liquide Brasil, São Paulo, Brasil).

As fontes primárias de radiação, empregadas durante o desenvolvimento dos experimentos, e os ajustes operacionais estão indicados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros instrumentais dos espectrômetros de absorção atômica.

Elemento	$\lambda$ (nm)	Tipo de lâmpada**	I (mA)	Resolução Espectral (nm)
Cu	324,8 / 327,4*	HCL	4,0	0,8
Zn	213,9	EDL	250	0,8

\*  $\lambda$  alternativo, correspondente a 50% de intensidade de emissão.

\*\* HCL: Hollow cathode lamp, EDL: Electrodeless discharge lamp.

Dois diferentes processos de pasteurização foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho, conduzidos no Laboratório de Alimentos da Engenharia Química – Escola Politécnica da USP, coordenado pela Profa. Dra. Carmen C. Tadani. O primeiro deles, foi executado em um trocador de calor tipo placas (Armfield FT43-A) no qual se tem um controle rigoroso das condições de processamento como tempo e temperatura. No outro processo utilizou-se um forno

de aquecimento assistido por microondas focalizadas da CEM (Star System 2). Este forno de microondas possui duas cavidades digestoras que utilizam frascos de digestão de quartzo e opera à pressão ambiente, sendo possível o controle de tempo e temperatura também.

Para o estudo da composição protéica da água de coco foi utilizado um sistema Mini-PROTEAN<sup>®</sup>3 Cell da Bio-Rad para separação e caracterização das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

As proteínas foram separadas e identificadas quanto ao peso molecular por cromatografia de filtração em gel (FPLC, fast protein liquid chromatography). Para isso um cromatógrafo da Pharmacia LKB Biotechnology equipado com duas bombas de alta precisão, coletor de frações, programador de gradientes, detector UV ( $\lambda = 280\text{nm}$ ) e registrador foi utilizado. Uma coluna cromatográfica de filtração em gel (cromatografia de exclusão por tamanho) Superose 12 (Amersham Biosciences) foi utilizada.

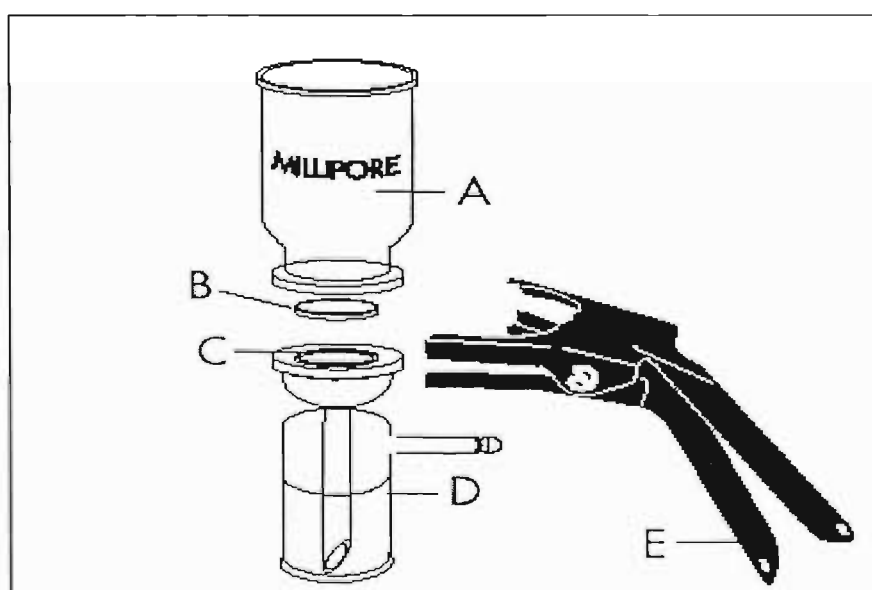
Após a fracionamento por SDS-PAGE, as bandas de proteínas obtidas no gel eletroforético foram recortadas para determinação semi-quantitativa de Cu e Zn. Nesse caso, o espectrômetro de absorção atômica com amostragem direta de sólidos (SS-ETAAS, Analytik Jena AG) foi utilizado para a determinação de Cu. As pequenas bandas foram pesadas diretamente na plataforma do tubo de grafite com uma microbalança (Auto Balance AD-4, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) e, posteriormente, transferidas para o tubo com amostrador mecânico de sólidos (SSA-6 Z Analytik Jena AG). A transferência da amostra para a plataforma foi realizada utilizando um microespátula de aço inoxidável. Para a determinação de Zn as amostras foram digeridas em mini-frascos de polipropileno, adaptados a um forno de microondas aberto (Rapid Digestion System, Spex), segundo procedimento previamente proposto na literatura<sup>(46)</sup>. As determinações da concentração de Zn foram executadas em espectrômetro de absorção atômica com amostragem de soluções.

Foram realizadas determinações espectrofotométricas para dosagem da concentração total de proteínas presente na água de coco, estas medidas foram

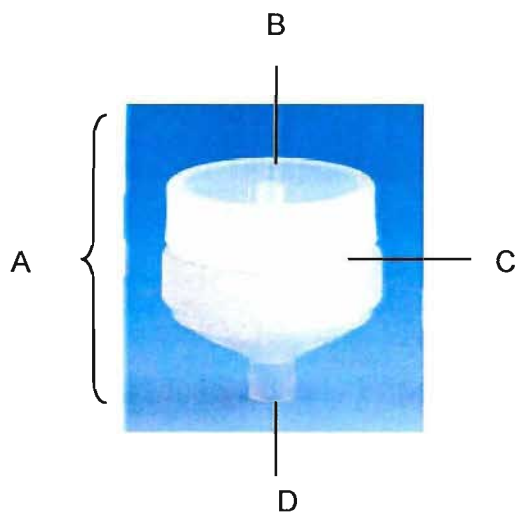
executadas em um espectrofotômetro modelo Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience).

Determinações de pH em água de coco foram realizadas com auxílio de um pHmetro fabricado por Unity Instrumentos.

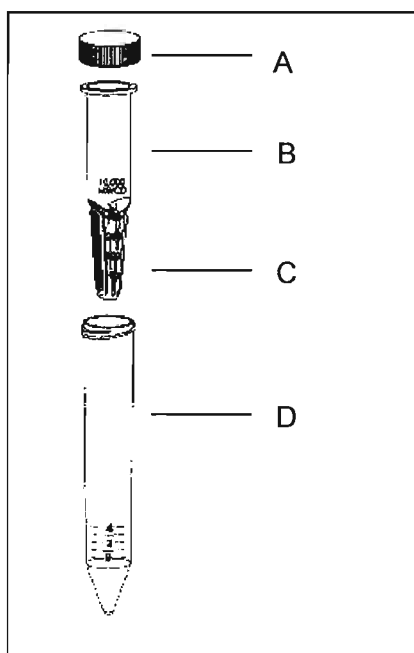
Um estudo de fracionamento da água de coco foi feito por meio de ultrafiltrações com filtros de diferentes porosidades. Para tanto, três diferentes sistemas foram utilizados; sistemas de filtração a vácuo, por pressão e por centrifugação (Millipore), representados nas Figuras 4, 5 e 6. Para o sistema de filtração a vácuo e por pressão foram usadas membranas de éster de celulose (Millipore), enquanto que para o sistema por centrifugação, membranas de celulose modificada (Millipore).



**Figura 4.** Sistema de ultrafiltração a vácuo: (A) Funil de vidro (300 mL), (B) filtros de membranas, (C) filtro de vidro sinterizado, (D) adaptador, realização de vácuo, recolhimento da amostra e (E) garra.



**Figura 5.** Sistema de ultrafiltração por pressão: (A) aparato de polipropileno, (B) seringa para inserção da amostra, (C) membrana e (D) saída para recolhimento do filtrado.



**Figura 6.** Sistema de ultrafiltração por centrifugação: (A) tampa, (B) tubo de estireno/butadieno para amostra, (C) filtro e (D) tubo de estireno/butadieno para filtrado.

### 3.2. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada de alta pureza (18 MΩ cm) obtida pelo sistema de ultrapurificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Triton-X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e HNO<sub>3</sub> (Synthy, Diadema, SP, Brasil), sendo que este último foi purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição, realizada em destiladores de quartzo (Marcomi, Piracicaba, SP, Brasil).

As soluções analíticas de Cu e Zn foram preparadas em meio de 0,1% v/v de HNO<sub>3</sub> por sucessivas diluições da solução estoque de 1000 mg/L CuCl<sub>2</sub> e ZnCl<sub>2</sub> (Suprapur, Tritisol, Merck).

Para extração e separação de fases em meio micelar utilizou-se o surfactante Triton X-114 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e metanol (Cinética Química Ltda) para diluição da fase rica em surfactante.

Para a extração de lipídeos foi utilizado tetracloreto de carbono (Cinética Química Ltda).

Previamente a separação por SDS-PAGE foi utilizada a diálise da água de coco para separação de sais (cátions e ânions), utilizando membrana Cellulose tubing (Sigma Diagnostics). Para calibração do gel foi utilizado um Kit de padrões de proteínas de faixa estreita da Bio-Rad.

Para o fracionamento das proteínas presentes na água de coco, por meio de filtração em gel, foi utilizado tampão Tris(hidroximetil)-aminometano + ácido nítrico (Tris-HNO<sub>3</sub>), 0,2 mol/L, pH 7,5 (USB Corporation, USA) como eluente. Para calibração da coluna cromatográfica e determinação dos pesos moleculares das proteínas presentes nas amostras foi utilizado um kit de padrões de proteínas da Sigma Chemical Company (MW-GF-200).

As amostras de água de coco foram sempre compradas em uma mesma frutaria da cidade de São Paulo com grau de maturação em torno de 6 meses.

### **3.3. Procedimento experimental**

#### **3.3.1. Descontaminação dos materiais**

Toda a vidraria e frascos de polipropileno utilizados para o preparo e armazenamento das amostras e soluções analíticas de referência foram lavados com detergente, enxaguados com água destilada, preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v durante 24 horas e, novamente, enxaguados com água bi-desionizada.

#### **3.3.2. Processamento da água de coco**

As pasteurizações foram feitas em uma mistura de cocos (n = 40 cocos) com temperatura de 90 °C e tempo de 180 s para pasteurizador tipo placas e no processamento por microondas a água proveniente de 1 coco foi submetida a temperatura entre 97-99 °C durante 30 s.

Todos os processos de manipulação e de separação foram realizados logo após a retirada da água do fruto no sentido de minimizar a exposição ao ar, procurando preservar a identidade das espécies de interesse.

#### **3.3.3. Medidas de pH em água de coco**

As medidas de pH foram feitas em amostras de água de coco natural, pasteurizadas e comerciais. Antes de cada medida de pH, as amostras foram filtradas em filtro analítico para eliminar os resíduos sólidos provenientes da polpa do coco. A determinação da acidez total foi feita por titulação potenciométrica, utilizando 30 mL de amostra e solução de hidróxido de potássio (0,047mol/L), previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ) como titulante.

### 3.3.4. Determinação da concentração total de Cu e Zn

A determinação da concentração total de Cu foi realizada por ETAAS com mínima diluição da amostra (950:1000). O diluente utilizado foi uma mistura de 1% m/v de Triton X-100 com o intuito de melhor homogeneizar a amostra e facilitar a injeção da mesma no tudo. Devido ao elevado teor de matéria orgânica, um volume de 10  $\mu\text{L}$  de uma mistura oxidante, contendo 1% v/v  $\text{HNO}_3$  + 15% m/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi co-injetada no tubo de grafite com 10  $\mu\text{L}$  das soluções analíticas ou amostras. Esta mistura foi utilizada com sucesso na determinação simultânea de Mn e Se em soro sangüíneo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite<sup>(47)</sup>.

O programa de aquecimento utilizado para determinação de Cu foi otimizado por meio da obtenção de curvas de temperatura de pirólise e atomização e tempos de rampa e patamar selecionados de acordo com o perfil do sinal de absorbância. Uma primeira etapa de pirólise com menor temperatura (400 °C) foi necessária para a ação da mistura oxidante.

A curva analítica de calibração foi feita a partir de soluções aquosas contendo 2,5 a 10  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  em 0,05% m/v Triton X-100.

Para a determinação de Zn, as amostras foram diluídas em torno de 100 vezes com ácido nítrico de maneira que a concentração final desse ácido ficou em 0,14mol/L. Essa elevada diluição diminuiu o teor de matéria orgânica, não necessitando da mistura oxidante. A otimização do programa de aquecimento foi realizada seguindo os mesmos critérios que para a determinação de Cu.

As curvas analíticas de calibração foram feitas a partir de soluções aquosas contendo 0,5 a 5  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  em 1,0 % v/v  $\text{HNO}_3$ .

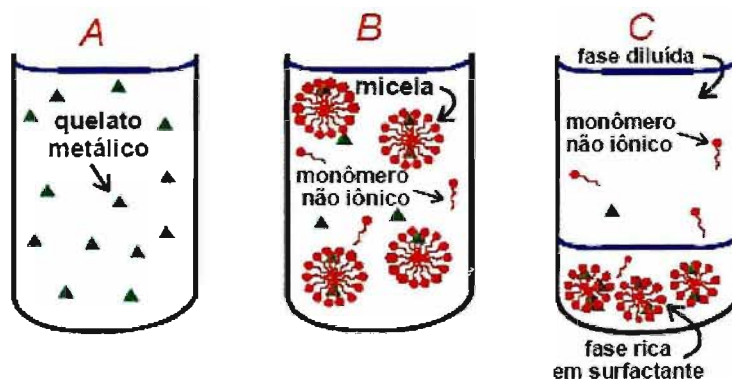
### 3.3.5. Extração por separação de fase em meio micelar (Ponto Nuvem)

A base da técnica de extração por ponto nuvem provém do fenômeno de fase exibido por algumas soluções micelares de surfactantes. Isto é, nas alterações apropriadas de condições como temperatura, pressão ou adição de um sal, observa-se a separação de duas fases, que consistem em uma fase concentrada, contendo a maior parte do surfactante (chamada rica em surfactante) e uma fase



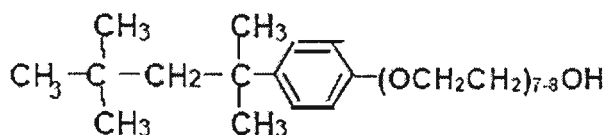
aquosa diluída, que contém baixa concentração de surfactante. Este método foi inicialmente explorado para extrair íons metálicos como complexos pouco solúveis em água, mas em geral qualquer molécula hidrofóbica pode ser extraída. A concentração do analito complexado acontece na fase rica em surfactante, com a eficiência do processo sendo dependente de parâmetros como: hidrofobicidade do complexo e ligante, a concentração de equilíbrio química aparente dos reagentes no meio organizado, e da cinética de formação do complexo e transferência de fase<sup>(48, 49)</sup>.

A Figura 7 mostra os passos usuais envolvidos na aplicação do processo. Primeiro, o surfactante é adicionado à solução aquosa que contém a espécie a ser extraída, representada na Figura 7(A). A quantidade de surfactante adicionada deve ser tal que assegure a formação de agregados micelares na solução, ou seja, a concentração final de surfactante deve exceder a concentração micelar crítica (cmc) do surfactante. Em seguida, a temperatura é elevada acima do valor para formação do ponto nuvem Figura 7(B), a solução torna-se turva e inicia-se a separação das fases. A centrifugação pode ser utilizada para acelerar a separação das duas fases Figura 7(C).



**Figura 7.** Representação esquemática da extração por ponto nuvem: ( $\Delta$ ) espécies hidrofóbicas a serem extraídas e/ou pré-concentradas.

O surfactante não iônico utilizado na extração por ponto nuvem em água de coco foi o Triton X-114, cuja fórmula estrutural plana está representada na Figura 8. A temperatura conveniente de separação de fases para este surfactante está entre 23 e 25°C<sup>(48, 49)</sup>.



**Figura 8.** Estrutura do surfactante octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114).

Com este método consegue-se excelente pré-concentração de analitos de interesse (fator 10 a 100), necessitando de pequenas quantidades do surfactante e de amostras<sup>(49)</sup>.

Na maior parte dos experimentos descritos na literatura, a concentração de surfactante é mantida na faixa de 0,2 a 2,0 % m/v, correspondendo de 2 a 10% do volume da solução inicial<sup>(48)</sup>.

O procedimento de extração foi conduzido em frascos de polipropileno de 10 mL. Amostras de água de coco naturais e pasteurizadas foram misturas com o surfactante Triton X-114 na concentração de 1,0 % m/v. A mistura foi resfriada em banho de gelo para solubilização do surfactante na amostra, posteriormente conduzida para um banho aquecido em torno de 30 °C durante 5 min, e então submetida à centrifugação de 3.000 g por 10 min para separação das fases.

A parte rica em surfactante (precipitado) foi solubilizada em 1 mL de metanol. A determinação de Cu, nesta fase, foi feita utilizando o método da calibração por adição de padrão. A volumes de 300 µL da solução com metanol foram adicionados 300 µL de soluções analíticas de 5,0 e 10,0 µg/L de Cu<sup>2+</sup> em 0,1% v/v HNO<sub>3</sub>. O volume final da solução foi de 600 µL, de maneira que as concentrações de Cu<sup>2+</sup> adicionadas variaram de 0 a 5 µg/L. Na análise do sobrenadante foi utilizada curva de calibração com solução aquosa, nas mesmas concentrações daquelas utilizadas para a determinação total, descrita no item 3.3.4.

Devido à volatilidade do metanol, uma etapa de secagem, com menor temperatura (80°C), foi inserida no programa de aquecimento para determinação total de Cu e Zn.

Para a determinação de Zn, foram necessárias diluições posteriores à solubilização do precipitado em metanol. Uma vez que estas diluições foram efetuadas com água, foi possível utilizar calibração aquosa para as duas fases.

Este procedimento foi aplicado em 2 amostras provenientes de 2 cocos diferentes e a uma mistura representativa da água de 40 cocos.

### 3.3.6. Extração de lipídeos

Para a extração de lipídeos foi utilizado tetracloreto de carbono como solvente extrator, seguindo procedimento descrito por Güçer<sup>(43)</sup>, que utilizou este extrator para separar a fração lipídica de oliva e derivados.

A mistura contendo água de coco e  $\text{CCl}_4$  foi inserida em um béquer (25 mL de água de coco + 1 mL de solvente) e mantida sob agitação magnética durante 1 h à 25 °C. Foi realizado um estudo para avaliar o tempo de extração (testes com 30 e 60 min), bem como o número de extrações sucessivas necessárias para a separação quantitativa da fração lipídica (testes com variação de 1 a 4 extrações). Esse procedimento foi feito dentro de uma capela de fluxo laminar para evitar contaminações da amostra pelos elementos de interesse, naturalmente presente no ar do laboratório.

As determinações de Cu e de Zn foram realizadas por ETAAS na água de coco natural (concentração total dos dois elementos), na fase de  $\text{CCl}_4$  e na fração aquosa remanescente. Devido a diferença de volatilidade da solução aquosa e de  $\text{CCl}_4$ , que apresenta ponto de ebulição igual a 76°C, uma etapa de secagem, com menor temperatura (80°C), foi inserida no programa de aquecimento para determinação total de Cu e Zn.

### 3.3.7. Determinação da concentração total de proteínas

Para a dosagem de proteínas em água de coco foi utilizado o método de Bradford<sup>(50)</sup>. Este método não é específico, por isso forneceu informação da concentração total de proteínas presentes na amostra. É um método espectrofotométrico que utiliza um corante chamado Coomassie Brilliant Blue G-250. Este corante, presente no reagente de Bradford, se complexa com as proteínas presentes na amostra conferindo propriedade absorvente a elas em comprimento de onda de 595 nm. A calibração do espectrofotômetro foi realizada com soluções

padrão de Albumina (10 a 140 mg/L), a partir da diluição de uma solução estoque. O procedimento consistiu em misturar 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford com 100  $\mu\text{L}$  das soluções analíticas ou amostras, esperou-se 5 min para a medida espectrofotométrica em  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

### 3.3.8. Eletroforese em gel para separação das proteínas

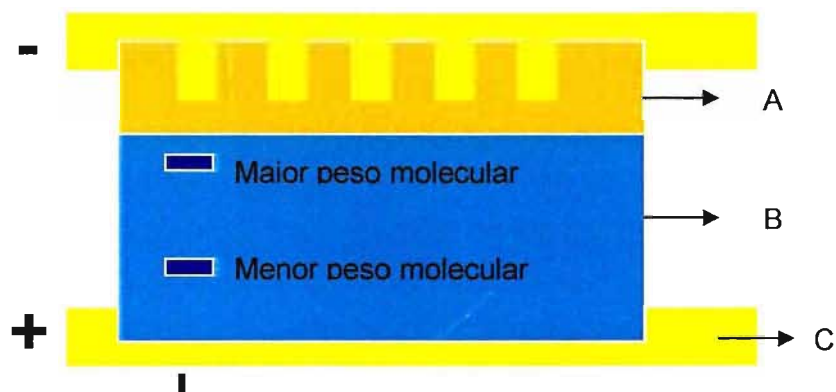
Após o conhecimento da concentração total investigou-se a massas moleculares das proteínas utilizando SDS-PAGE. A eletroforese foi conduzida em um gel de poli(acrilamida). Este gel funciona como uma malha que retarda migração das proteínas de massas moleculares maiores e permite a migração mais rápida daquelas com menores pesos moleculares. O detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) ( $[\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}^3\text{Na}^+]$ ) é utilizado para desnaturar as proteínas. Moléculas anfifílicas como SDS interferem nas interações hidrofóbicas que estabilizam as proteínas, então elas perdem a estrutura helicoidal tornando-se “estendidas”. Além disso, o SDS confere grande carga negativa às proteínas, mascarando a sua carga intrínseca. Como resultado líquido, obtém-se proteínas com mesma forma e razão carga/massa. Desta maneira, a separação ocorre em função da massa molecular das proteínas<sup>(51)</sup>.

Antes de realizar o SDS-PAGE a água de coco foi dialisada. Para isso, a água de coco foi inserida no interior da membrana que é amarrada com barbante, formando um saco de diálise. A membrana contendo amostra é amarrada em um suporte flutuador que é inserido dentro de um béquer (1 L) contendo água destilada sob agitação magnética. Este procedimento é realizado para eliminar os cátions e ânions presentes na água de coco, os quais prejudicariam a resolução das bandas de proteínas separadas. Para cada 1 mL de água de coco utiliza-se 1L de água dentro do béquer, esta água deve ser trocada a cada 3 horas (tempo necessário para que o equilíbrio de concentração aconteça entre a parte interna e externa da membrana). O procedimento de troca da água destilada foi repetido por 3 vezes para garantir a máxima eliminação dos sais dissolvidos. Um certo volume de água de coco dialisada, contendo aproximadamente 18  $\mu\text{g}$  de proteínas (dosagem de proteínas previamente realizada) foi levada à um secador à vácuo até total secagem

da amostra. A amostra seca foi dissolvida em tampão de amostra e aquecida à 100 °C durante 5 min, o padrão de proteínas também passou por este aquecimento.

O tampão de amostra contém SDS, bromofenol e um agente redutor chamado 2-mercaptoetanol ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) que é responsável pela quebra de ligações dissulfeto entre as proteínas. Quando estas ligações são rompidas, as proteínas podem ser subdivididas em duas ou mais cadeias polipeptídicas, dependendo da sua estrutura quaternária, permitindo melhor separação e precisão na determinação de suas massas moleculares<sup>(51)</sup>.

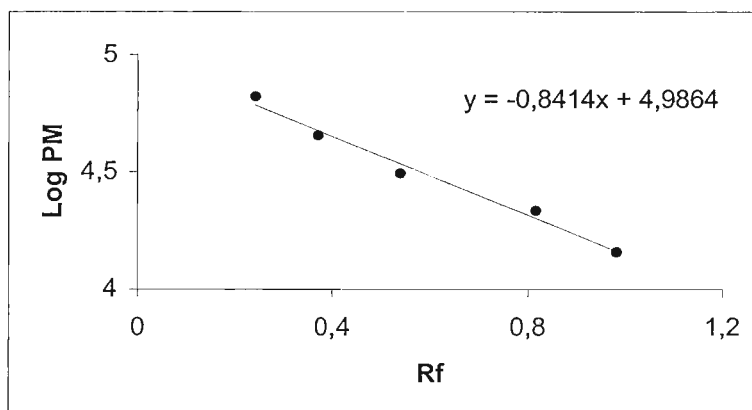
O gel de poliacrilamina foi preparado segundo o método descrito por Laemmli<sup>(52)</sup>. O gel é dividido em duas partes, o gel de empilhamento que contém poços para a inserção da amostra e o gel de separação sobre o qual a amostra irá ser separada. O gel está imerso em uma solução tampão contendo SDS, sobre ele uma diferença de potencial é aplicada e as moléculas começam a migrar em direção ao polo positivo. As moléculas menores conseguem percorrer uma maior distância, pois o gel funciona como uma malha. O desenho esquemático da separação de proteínas no gel de SDS-PAGE está representado na Figura 9.



**Figura 9.** Desenho esquemático da separação de proteínas por SDS-PAGE: (A) gel de empilhamento com acrilamida, (B) gel de separação com acrilamida e (C) tampão de corrida com SDS.

Posteriormente à separação, o gel é corado com  $\text{AgNO}_3$ <sup>(53)</sup> para a visualização das bandas que contém proteínas. Várias amostras podem ser inseridas em um único gel (uma amostra em cada poço), e juntamente com elas, um

padrão de proteínas de baixo peso molecular participa da separação. Este padrão de proteínas continha inibidor de tripsina (21,5 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e albumina de soro bovino (66,2 kDa). Uma vez que as bandas características destes padrões foram obtidas, uma curva de calibração foi feita para o cálculo dos pesos moleculares das proteínas das amostras. Para isso, construiu-se um gráfico interpolando valores do logaritmo dos pesos moleculares dos padrões de proteínas versus mobilidade relativa de cada proteína ( $R_f = \text{distância de migração da proteína} / \text{distância de separação do gel}$ ), conforme mostrado na Figura 10. Os cálculos foram realizados utilizando a equação da reta obtida.

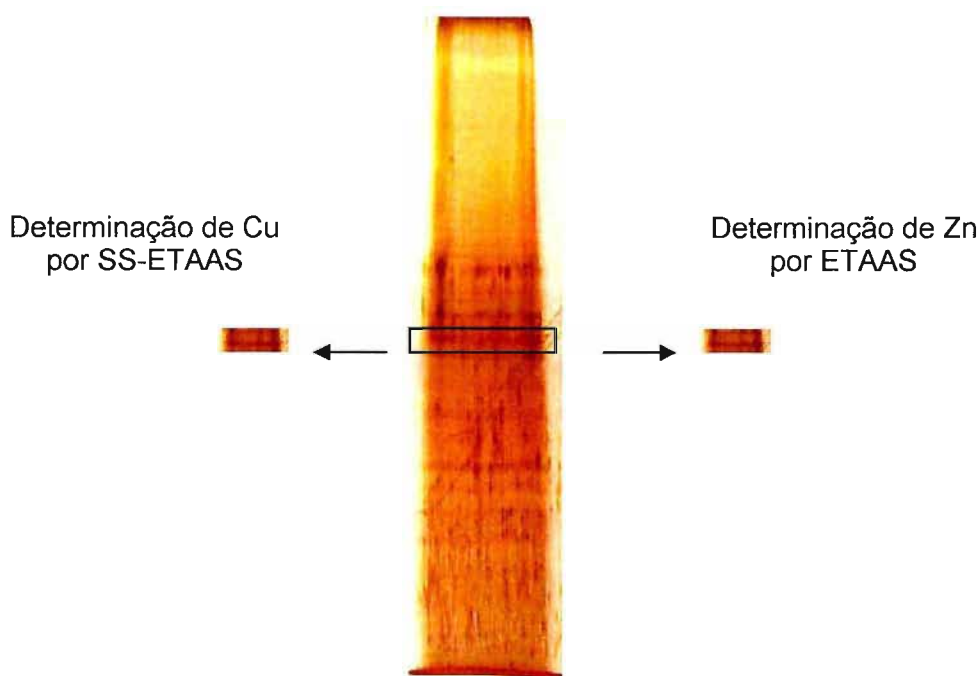


**Figura 10.** Curva de calibração para gel de SDS-PAGE gerada pela plotagem do log do peso molecular de cada padrão molecular de proteína vs mobilidade relativa.

O SDS-PAGE foi realizado para 3 amostras provenientes de 3 cocos diferentes. Além destas, uma mistura representativa de 40 cocos antes e depois de sofrer pasteurização também foram submetidas à separação.

### 3.3.9. Determinação de Cu e Zn nas frações de proteínas separadas por SDS-PAGE

Depois de obtido e fotografado, o gel foi recortado (2 x 10 mm) em cada banda detectada pela coloração, utilizando uma lâmina de aço inoxidável para a determinação semi-quantitativa de Cu e Zn (Figura 11). Esse procedimento foi realizado no interior de uma capela de fluxo laminar a fim de evitar contaminação por exposição ao ar. Cada banda recortada foi dividida em duas partes e armazenada em frascos de polipropileno fechados até serem realizadas as análises. Uma faixa da corrida (raia) no SDS-PAGE apenas com o tampão de amostra foi recortada (n=5 pedaços) e utilizada como branco do gel.



**Figura 11.** Representação esquemática do processo de corte das bandas do gel de eletroforese para determinação de Cu e Zn.

A determinação de Cu foi realizada diretamente por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica com amostragem de sólidos (SS-ETAAS). Devido à alta sensibilidade do método e à elevada quantidade de Cu nas

frações recortadas, foi necessária a utilização de um comprimento de onda alternativo ( $\lambda = 327,4$  nm). O programa de aquecimento utilizado está representado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Programa de aquecimento para determinação de Cu por SS-ETAAS.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	$\phi$ Ar (mL/min)	leitura
Secagem I	130	13	15	250	--
Pirólise I	400	20	20	250	--
Pirólise II	1200	20	10	250	--
Atomização	2400	0	6	0	Sim
Limpeza	2500	0	3	250	--

A elevada sensibilidade do método, o elevado valor de sinal de fundo e a imprecisão dos resultados analíticos impossibilitaram a determinação direta de Zn por SS-ETAAS. Sendo assim, os pedaços do gel foram digeridos em mini-frascos (5 mL) adaptados a um forno de microondas. As amostras foram inseridas nos mini-frascos com 200  $\mu$ L de ácido nítrico concentrado (bidestilado) para digestão. O programa de aquecimento está apresentado na Tabela 5. Posteriormente, os volumes foram completados para 400  $\mu$ L com água bidestilada. Para a determinação de Zn, as amostras foram posteriormente diluídas 100 vezes. Um volume de 10  $\mu$ L dessa amostra foi inserido no tubo de grafite e o programa de aquecimento otimizado para determinação da concentração total de Zn foi executado.

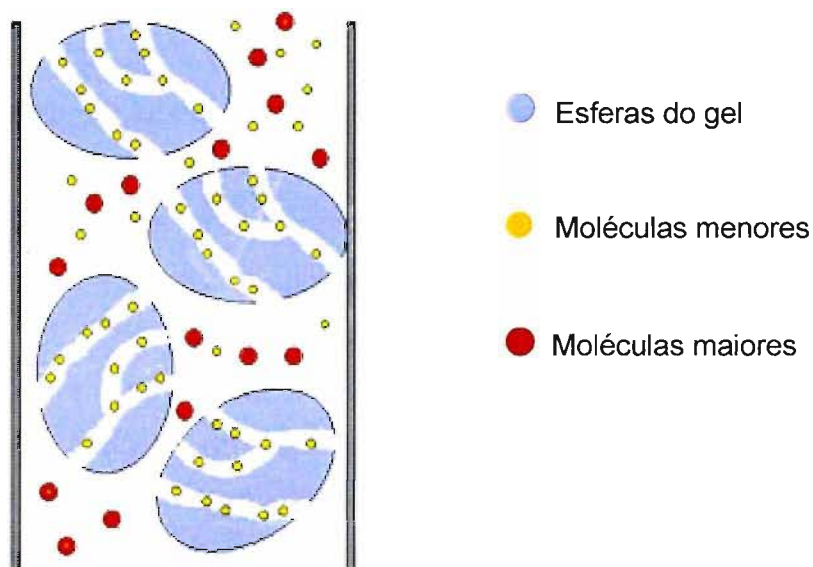


**Tabela 5.** Programa de aquecimento do forno de microondas focalizadas para digestão do gel de SDS-PAGE.

Etapa	Potencia incidida (W)	Tempo (min)
1	30	2
2	0	1
3	45	2
4	60	3
5	75	5
6	0	1

### 3.3.10. Separação das proteínas por filtração em gel

A cromatografia líquida é a uma das técnicas mais utilizadas para separação de proteínas, ácidos nucléicos e outras moléculas. É baseada no princípio de que as moléculas dissolvidas em uma solução irão interagir (ligar-se e dissociar) com uma superfície sólida (fase estacionária)<sup>(51)</sup>. As proteínas que diferem em suas massas podem ser separadas por cromatografia por filtração em gel. Nesta técnica, a coluna é composta de poliacrilamida, dextrano (um polissacarídeo bacteriano) ou agarose (derivado da alga marinha), na forma de grãos esféricos possuindo poros de tamanhos específicos. Pelo fato de as proteínas menores poderem penetrar dentro dos poros das esferas mais facilmente que as maiores, elas se deslocam ao longo de uma coluna de filtração em gel mais lentamente que as moléculas maiores, assim através de um gradiente de peso molecular, as proteínas vão sendo separadas de maneira a sair primeiro aquelas com maiores massas<sup>(51)</sup>. A Figura 12 é uma representação esquemática da separação de proteínas por esta técnica.



**Figura 12.** Representação esquemática do processo de separação de proteínas por filtração em gel.

O pré-tratamento da amostra para a separação por filtração em gel consistiu em uma filtração a vácuo com filtro de éster de celulose de  $0,45\ \mu\text{m}$  para eliminação de partículas provenientes da polpa do coco e posterior pré-concentração através de ultrafiltração com filtro de membrana de celulose de porosidade suficiente para reter compostos com peso molecular acima de  $5\ \text{kDa}$  (ultrafiltração por centrifugação). Cada amostra foi pré-concentrada 50 vezes e inserida na coluna cromatográfica.

O eluente (tampão Tris –  $\text{HNO}_3$ ) foi purificado através de uma coluna de troca iônica Chelex 100 com o intuito de retirar possíveis contaminações dos elementos de interesse<sup>(54)</sup>. Posteriormente passou por uma filtração de  $0,1\ \mu\text{m}$ , para evitar o entupimento da coluna cromatográfica, e finalmente passou por um processo de degaseificação realizado por meio de uma bomba de vácuo e ultra-som durante 20 min, o que evita a formação de bolhas na coluna.

Foram injetados na coluna cromatográfica  $500\ \mu\text{L}$  de amostra pré-concentrada, contendo em torno  $200\ \mu\text{g}$  de proteínas. O fluxo de eluição utilizado foi de  $0,5\ \text{mL/min}$  e frações de  $1\ \text{mL}$  foram recolhidas, por meio de um coletor de frações automático, para determinação de Cu e Zn.

Foram submetidas à separação cromatográfica duas amostras provenientes do mesmo coco, antes e após o processo de pasteurização.

Depois de obtido o cromatograma, as massas moleculares das proteínas detectadas em cada pico cromatográfico foram obtidas através de uma curva de calibração realizada com diversos padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos. Os padrões utilizados foram: citocromo C (12,4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), Albumina (66 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa),  $\beta$ -amilase (200 kDa) e a dextrana azul (2000 kDa). Para obtenção da curva de calibração interpolou-se valores do logaritmo dos pesos moleculares de cada padrão de proteína *versus* volume de eluição. Os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração, como descrito no item 3.3.8.

### **3.3.11. Determinação de Cu e Zn nas alíquotas da filtração em gel**

Para a determinação de Cu e Zn foi utilizada o método de compatibilização de matriz, ou seja, curvas de calibração foram realizadas em meio tampão Tris-HNO<sub>3</sub>.

Para a determinação do Cu nas frações não houve diluição, desta maneira a fração obtida foi inserida diretamente no forno de grafite. A curva de calibração analítica foi feita a partir de soluções de tampão Tris-HNO<sub>3</sub> 0,2 mol/L contendo 2,5 a 10  $\mu\text{g/L}$  de Cu<sup>2+</sup>. Utilizou-se o programa de aquecimento otimizado para determinação total de Cu e Zn

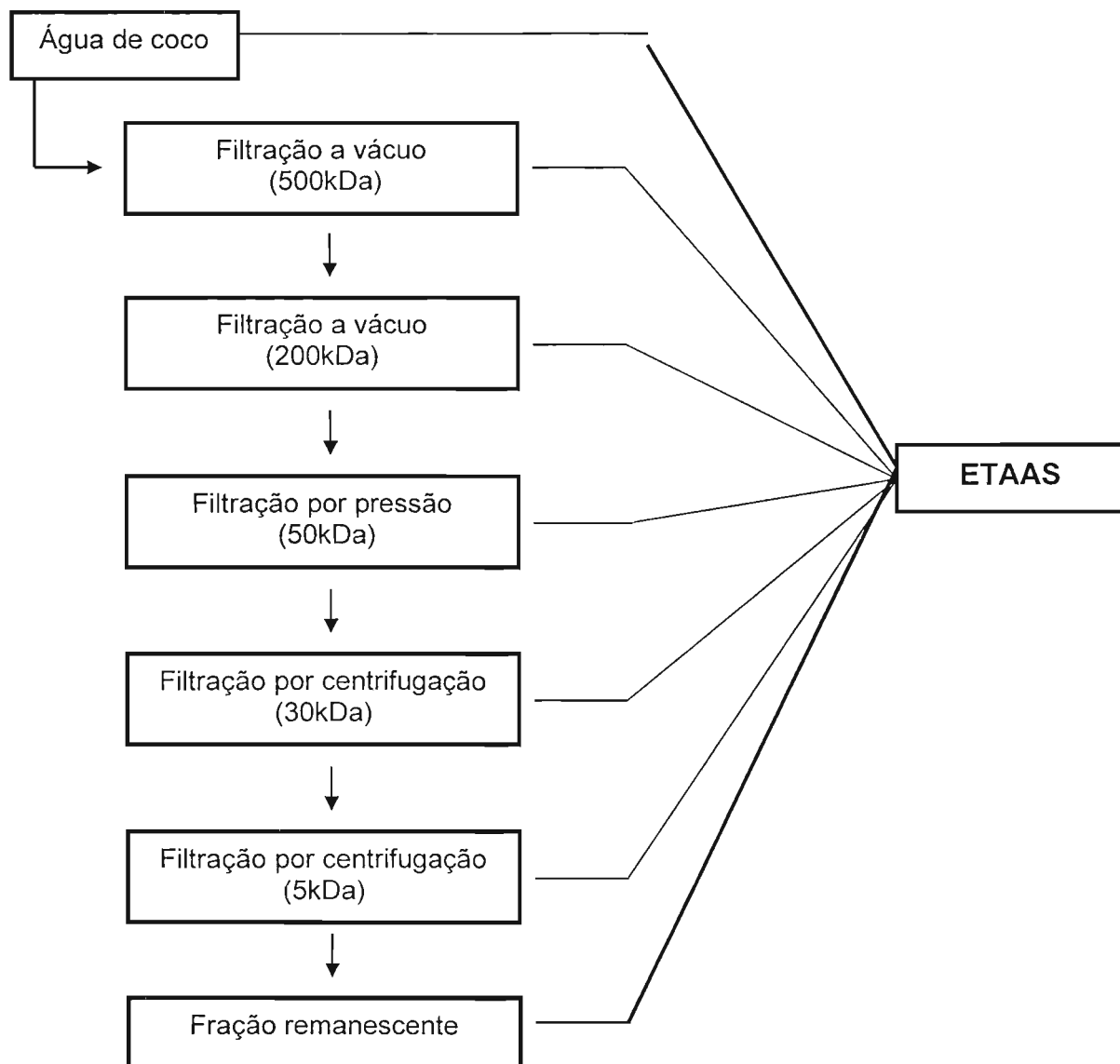
Para a determinação de Zn foi necessária diluição em torno de 10 vezes, por isso a curva de calibração analítica foi feita a partir de soluções de tampão Tris-HNO<sub>3</sub> 0,02mol/L contendo 0,5 a 5  $\mu\text{g/L}$  de Zn<sup>2+</sup>.

### **3.3.12. Fracionamento dos componentes da água de coco por ultrafiltrações sucessivas**

O princípio fundamental deste procedimento é a separação das frações de água de coco de acordo com o tamanho e massa molecular de suas moléculas.

Uma grande vantagem deste procedimento é a não necessidade de se utilizar solventes que podem alterar a forma química das espécies<sup>(55)</sup>.

Filtrações sucessivas com filtros de diferentes porosidades foram feitas e alíquotas das diversas frações foram coletadas para a determinação de Cu e Zn por ETAAS. A Figura 13 ilustra o procedimento utilizado. Cada etapa de filtração foi realizada 2 vezes utilizando outro filtro respectivo (n=2).



**Figura 13.** Representação esquemática do procedimento utilizado para o fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas.

---

O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e o máximo de cuidado para evitar contaminações foi tomado, devido ao processo ser longo. Foram submetidas ao procedimento as mesmas amostras utilizadas no estudo de filtração em gel (uma amostra antes e pós a pasteurização).

O procedimento foi realizado com volume inicial de 25 mL de água de coco, alíquotas de 1 mL de cada fração foram recolhidas para a determinação de Cu e Zn. Os programas de aquecimento e metodologias analíticas utilizadas para a determinação de Cu e Zn por ETAAS foram os mesmos utilizados para a determinação da concentração total.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Medidas de pH em água de coco

A acidez total é resultado da soma da concentração de íons  $H^+$  livres e dos provenientes de ácidos fracos presentes na água de coco, podendo ser medida com o uso do método de titulação potenciométrica. Para a determinação do ponto final da titulação foi utilizado o método das derivadas<sup>(56)</sup>.

Os resultados das medidas diretas de pH concordaram com os valores apresentados na literatura, na qual o valor médio de pH da água de coco é 4,75<sup>(13)</sup>. Por meio das titulações potenciométricas, foi possível constatar que a concentração de  $H^+$  proveniente de ácidos fracos é a maior responsável pelos valores obtidos de  $[H^+]_{total}$  (Tabela 6). Como já citado anteriormente, dentre alguns dos ácidos que podem estar presentes na água de coco, merece destaque o ácido málico que se apresenta em maior concentração na polpa do coco<sup>(13)</sup>.

**Tabela 6.** Resultados de medidas diretas de pH e titulação potenciométrica da água de coco.

Amostra	pH	$[H^+]_{livre}$ mol/L ( $\times 10^{-5}$ )	$[H^+]_{total}$ mol/L ( $\times 10^{-3}$ )
Comercial 1	4,96	1,10	7,36
Comercial 2	4,97	1,07	13,8
Comercial 3	4,89	1,30	6,89
Mistura (40 cocos)	4,92	1,20	7,52
Mistura (40 cocos) pasteurizada	4,90	1,26	7,21

Foi possível verificar que a pasteurização por troca de calor não provocou alterações significativas nas concentrações de  $[H^+]_{livre}$  e  $[H^+]_{total}$  presentes na água de coco.

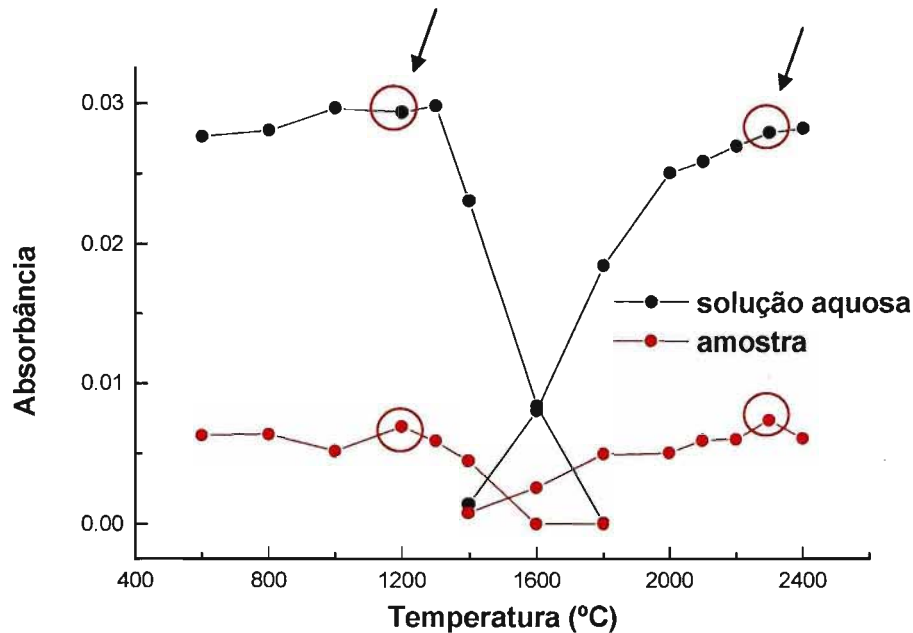
As amostras comerciais foram tituladas para avaliar possíveis alterações nas concentrações hidrogeniônicas, as quais poderiam estar relacionadas aos

processos de conservação utilizados e a adição de conservantes. No entanto, os resultados mostraram que as concentrações de  $[H^+]_{\text{livre}}$  mantiveram-se semelhantes as das amostras não processadas, em contrapartida, notou-se uma pequena variação da  $[H^+]_{\text{total}}$  em uma das amostras (Comercial 2).

#### 4.2. Determinação da concentração total de Cu e Zn

O uso de ETAAS como uma técnica quantitativa de determinação elementar requer que o programa de aquecimento seja otimizado, para que as melhores temperaturas de pirólise e atomização, bem como as durações destas etapas possam ser encontradas. A etapa de pirólise é responsável pela minimização dos concomitantes presentes na amostra. Portanto, consiste em uma etapa que deve ser realizada na máxima temperatura que não provoque perdas do elemento de interesse por volatilização. Já a etapa de atomização requer a mínima temperatura que se possa garantir o processo de atomização e formação de um sinal analítico bem resolvido. Esta temperatura deve ser a menor possível com o intuito de minimizar o desgaste do tubo de grafite. Porém, é importante salientar que os perfis dos sinais analíticos e valores de desvios padrão precisam ser considerados para a escolha destas temperaturas.

A Figura 14 mostra as curvas de temperaturas de pirólise e atomização obtidas utilizando 10  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu(II)}$  em 0,1% v/v  $\text{HNO}_3$  e 0,05 % m/v Triton X-100. Em meio de amostra, a temperatura máxima de pirólise e que pôde ser usada sem perda de sinal analítico foi 1200°C, enquanto que a temperatura mínima que poderia ser utilizada para atomização seria 1800°C.



**Figura 14.** Curvas de pirólise e atomização para Cu em solução de 10  $\mu\text{g/L}$  + 0,1 % v/v  $\text{HNO}_3$  + 0,05 % m/v Triton X-100 e em presença de água de coco.

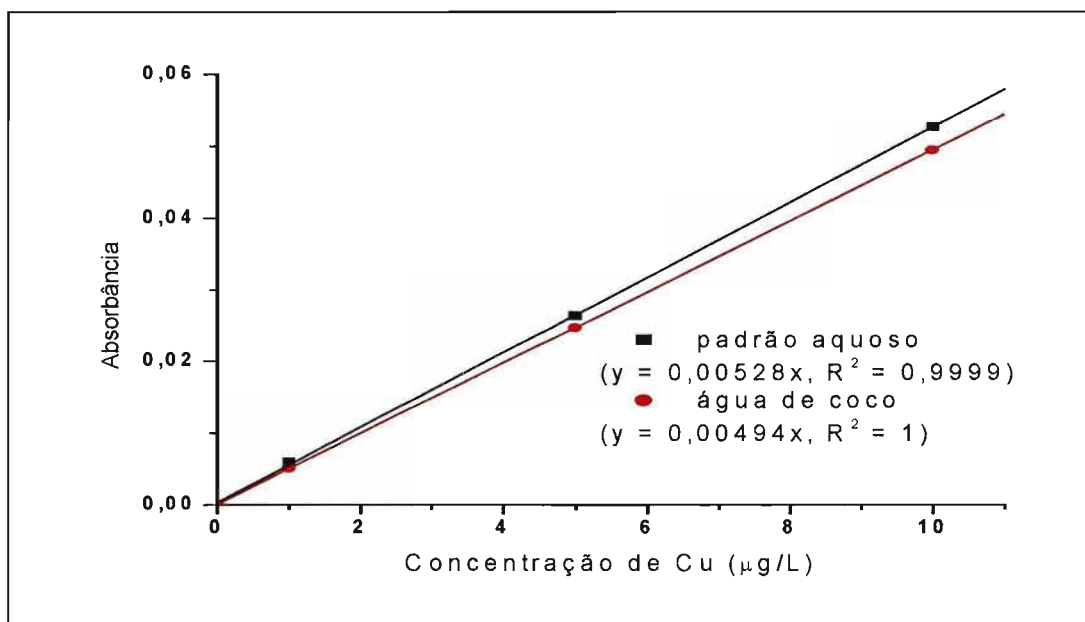
As temperaturas de pirólise e atomização escolhidas foram 1200 e 2300  $^{\circ}\text{C}$  respectivamente, pois, nessas temperaturas foram observados os melhores perfis dos sinais analíticos de absorbância com os menores desvios entre as medidas. Considerando as elevadas temperaturas de pirólise observadas na ausência e presença da amostra, optou-se por não utilizar modificador químico. Após a otimização, o programa de aquecimento utilizado para a determinação da concentração total de Cu está apresentado na Tabela 7.

Na Figura 15 estão apresentadas as curvas analíticas de calibração de Cu obtidas em meio aquoso e em meio de uma amostra de água de coco. Os coeficientes angulares das duas retas de calibração são bastante próximos, apresentam razão igual a 1,06. Este resultado é um indicativo de que a calibração aquosa pode ser utilizada para as determinações de Cu em água de coco, ou seja, a matriz presente na amostra, mesmo com a pequena diluição a qual foi submetida (950:1000), não provocou interferências significativas.



**Tabela 7.** Programa de aquecimento otimizado para determinação de Cu por ETAAS.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	$\phi$ Ar (mL/min)	leitura
Secagem I	110	10	15	250	--
Secagem II	130	2	10	250	--
Pirólise I	400	5	5	250	--
Pirólise II	1200	10	20	250	--
Atomização	2300	0	3	0	Sim
Limpeza	2400	1	4	250	--

**Figura 15.** Curvas analíticas de calibração aquosa e em meio de água de coco para determinação de Cu, ambas utilizando HNO<sub>3</sub> 0,1% v/v e 0,05 % m/v Triton X-100.

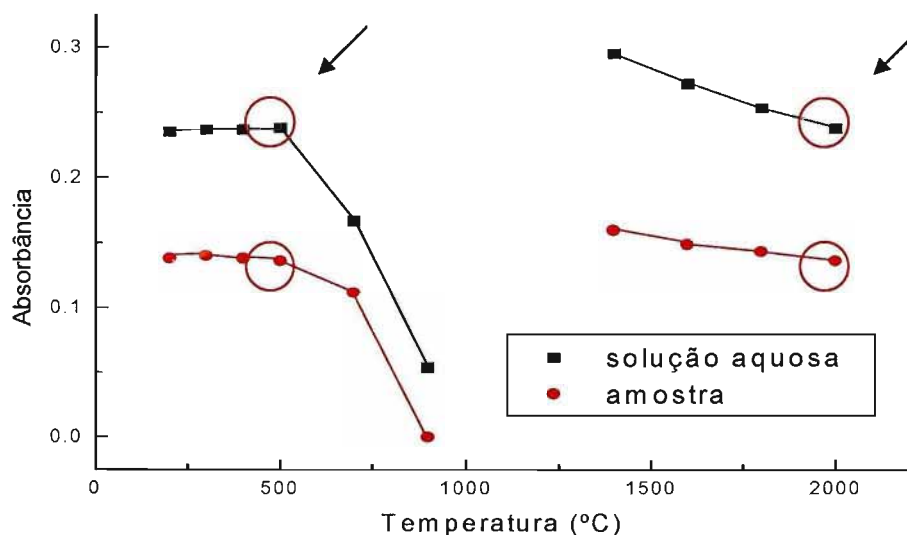
A mistura oxidante (1% v/v HNO<sub>3</sub> + 15% m/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi utilizada para evitar a formação de resíduos carbonáceos na plataforma do tubo de grafite, provocada pela alta concentração de matéria orgânica presente na amostra. Após 25 ciclos de

aquecimento, notou-se uma intensa formação de resíduos que prejudicou a repetibilidade das determinações. Esta imprecisão dos resultados pode estar associada ao bloqueio da radiação incidente e, além disso, à possível oclusão do analito prejudicando a atomização.

A pequena diluição e a presença de compostos orgânicos prejudicou a injeção da amostra no tubo de grafite, parte dela ficava aderida ao tubo capilar do auto-amostrador, prejudicando a repetibilidade dos resultados analíticos. Para evitar este problema o surfactante 0,05% m/v Triton X-100 foi adicionado à amostra para a determinação de Cu, e ao frasco de limpeza, melhorando a homogeneização da amostra e facilitando a amostragem.

O Zn apresenta-se em maior concentração na água de coco do que o Cu, por isso, para a sua determinação foram necessárias grandes diluições (1:100), minimizando possíveis efeitos de matriz.

A Figura 16 mostra as curvas de pirólise e atomização realizadas utilizando  $1,5\mu\text{g/L}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  em 1,0% v/v  $\text{HNO}_3$  e em meio de amostra diluída 100 vezes. É possível constatar que os perfis das curvas são idênticos para a solução aquosa e em meio de amostra. Isso é um indicativo de que os efeitos de matriz foram, realmente, minimizados com a diluição utilizada.



**Figura 16.** Curvas de pirólise e atomização para Zn em solução de  $1,5\mu\text{g/L}$  + 1 % v/v  $\text{HNO}_3$  e em presença de água de coco.

A temperatura de pirólise adotada para o programa de aquecimento foi de 500°C. As medidas de absorvância foram obtidas pela integração do sinal analítico, portanto, para a escolha da temperatura de atomização foram considerados o perfis da curva de atomização e do sinal analítico. A temperatura de atomização que apresentou melhor resolução do sinal analítico foi 2000°C. Embora o Zn seja um elemento que suporte baixas temperaturas de pirólise, devido a grande diluição da amostra, o uso de modificador químico não foi adotado. O programa de aquecimento estabelecido para a determinação da concentração total de Zn está apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Programa de aquecimento otimizado para a determinação de Zn por ETAAS.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	$\phi$ Ar (mL/min)	leitura
Secagem I	110	10	15	250	--
Secagem II	130	2	10	250	--
Pirólise	500	10	20	250	--
Atomização	2000	0	3	0	Sim
Limpeza	2400	1	4	250	--

Após a otimização do programa de aquecimento e de todas as condições analíticas, os procedimentos de análises foram avaliados utilizando o método de adição e recuperação. Foram feitas determinações de Cu e Zn em água de coco com e sem adição de 5 e 200  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  respectivamente. Os resultados estão mostrados na Tabela 9. Os resultados de recuperação tanto para Cu quanto para Zn estão próximos a 100 %, isso evidencia que praticamente não há interferência de matriz e indica a possibilidade de utilizar curvas de calibrações analíticas aquosas para ambos os casos.

**Tabela 9.** Concentração de Cu e Zn em água de coco e resultados de recuperação (n = 3).

	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
<b>Cu</b>	4,1 $\pm$ 0,1	104
<b>Zn</b>	322 $\pm$ 4,0	94

Os limites de detecção e quantificação dos dois elementos foram calculados utilizando 20 medidas do branco analítico (Tabela 10). Para o cálculo foram utilizadas as fórmulas abaixo<sup>(57)</sup>:

$$\text{LD } (\mu\text{g/L}) = \frac{3 \times \sigma}{a}$$

$$\text{LQ } (\mu\text{g/L}) = \frac{5 \times \sigma}{a}$$

$\sigma$  = desvio padrão de 20 medidas do branco analítico

a = coeficiente angular da curva de calibração

**Tabela 10.** Valores de limite de detecção e quantificação para Cu e Zn.

	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>Cu</b>	0,49	0,82
<b>Zn</b>	0,64	1,1

#### 4.3. Extração por ponto nuvem

A extração por ponto nuvem surgiu como uma alternativa para separar as espécies hidrofóbicas e neutras presentes na água de coco e posterior avaliação da concentração de Cu e Zn nesta fração.

O procedimento de extração por ponto nuvem foi aplicado nas amostras de água de coco e os resultados obtidos para a determinação de Cu nas frações estão apresentados na Tabela 11. A somatória indicada na tabela representa a concentração de Cu na fase aquosa e na fase rica em surfactante. É importante ressaltar que devido a complexidade do processo, que compreende várias etapas, a obtenção de um balanço exato de concentrações não foi possível.

**Tabela 11.** Resultados da determinação de Cu em frações obtidas por extração por ponto nuvem (n=3).

Amostra	[Cu] total ( $\mu\text{g/L}$ )	[Cu] fase aquosa ( $\mu\text{g/L}$ )	[Cu] fase rica em surfactante ( $\mu\text{g/L}$ )	$\Sigma$ ( $\mu\text{g/L}$ )
Coco 1	$19,4 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,6$	$0,28 \pm 0,01$	$15,2 \pm 0,6$
Coco 2	$1,21 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,1$	$0,92 \pm 0,02$	$1,80 \pm 0,1$
Mistura (n=40)	$5,80 \pm 0,2$	$3,20 \pm 0,3$	$0,73 \pm 0,20$	$3,97 \pm 0,4$

Os resultados da determinação da concentração total indicam grande variação entre diferentes cocos. No caso da amostra coco 2, a concentração de Cu é baixa, próxima ao limite de quantificação estabelecido ( $0,82 \mu\text{g/L}$ ). Esta foi uma limitação encontrada a longo de todo o trabalho.

Neste contexto, os resultados das amostras com maior concentração de Cu e provenientes de uma mistura de vários cocos apresentaram maior facilidade para aplicação do método. Aproximadamente 20 % da concentração total de Cu presente na mistura de 40 cocos, foram encontrados na fase rica em surfactante. Este resultado é um indicativo de que uma parte do Cu presente na água de coco, pode estar associado às moléculas hidrofóbicas de cadeia longa ou a espécies neutras, extraídas pelo ponto nuvem.

Os resultados obtidos para a determinação de Zn, após a extração por ponto nuvem, estão apresentados na Tabela 12. A fração desse elemento encontrada na fase rica em surfactante e, possivelmente, associada a moléculas hidrofóbicas, foi muito pequena, em torno de 1% da concentração total de Zn.

**Tabela 12.** Resultados da determinação de Zn em frações obtidas por extração por ponto nuvem (n=3).

Amostra	[Zn] total ( $\mu\text{g/L}$ )	[Zn] fase aquosa ( $\mu\text{g/L}$ )	[Zn] fase rica em surfactante ( $\mu\text{g/L}$ )	$\Sigma$ ( $\mu\text{g/L}$ )
Coco 1	457 $\pm$ 10	419 $\pm$ 3	0,7 $\pm$ 0,1	420 $\pm$ 3
Coco 2	421 $\pm$ 6	349 $\pm$ 20	4,6 $\pm$ 0,03	354 $\pm$ 20
Mistura (n=40)	238 $\pm$ 20	211 $\pm$ 30	1,9 $\pm$ 0,2	213 $\pm$ 30

Como a concentração de Zn associada a esta fração é muito baixa, supõe-se que pode estar na forma livre ou ligado a moléculas polares de baixo peso molecular, moléculas estas, que não são extraídas pelo procedimento de separação em meio micelar

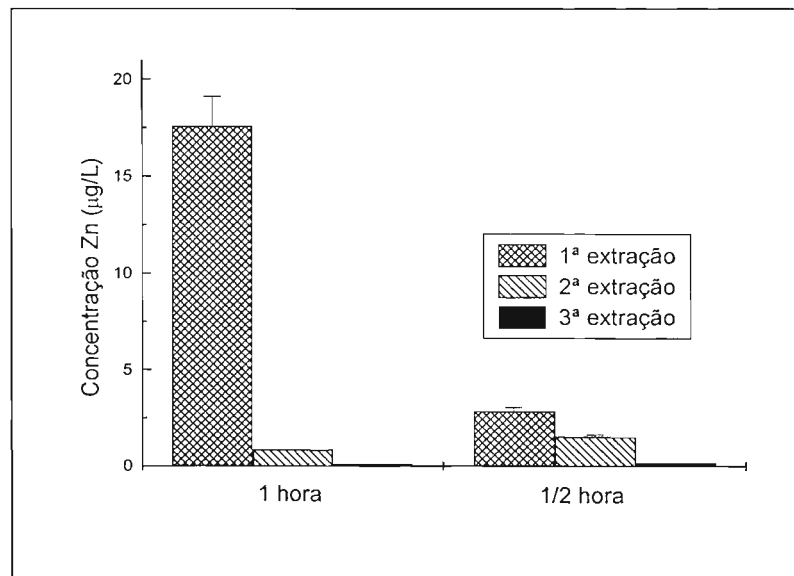
#### 4.4. Extração de lipídeos

A concentração de gorduras na água de coco varia com o tempo de maturação do fruto. Embora, o teor encontrado no estágio de maturação de 6 a 8 meses (valor ótimo de produção de água de coco) seja baixo (4,4 mg/100 g água), quando comparado com cocos mais maduros (Tabela 1), o procedimento de extração de lipídeos foi feito com a intenção de avaliar a concentração de Cu e Zn que estão associados às gorduras presentes neste estágio de maturação.

Para otimização do processo de extração o tempo e o número de repetições das extrações foram avaliados. Foram testadas 4 extrações sucessivas de ½ e 1 hora cada. Os resultados obtidos para otimização do processo de extração estão apresentados na Figura 17 em função da concentração de Zn presente nas diferentes frações. Os valores encontrados para Cu ficaram abaixo do limite de detecção, indicando que este elemento não está associado a gorduras. A concentração total de Cu nas amostras estudadas nesse método foi de 4  $\pm$  0,1  $\mu\text{g/L}$ .

A fração lipídeos-Zn foi extraída nas duas primeiras extrações, muito pouco foi detectado na terceira, e a quarta extração já não continha concentração de Zn detectável. Os resultados permitem observar que o tempo é um fator bastante

importante para que a extração ocorra de maneira quantitativa (Figura 17). É possível notar que com a primeira extração de 1h, praticamente toda a fração lipídica contendo Zn foi extraída, enquanto que as extrações realizadas em ½ hora, não foram efetivas.



**Figura 17.** Determinação de Zn em frações lipídicas de água de coco para otimização do tempo e número das extrações com  $\text{CCl}_4$ .

Portanto as condições adotadas para o procedimento de extração da fração lipídeos-Zn foram três extrações sucessivas, cada uma delas com 1 h de duração, utilizando 25 mL de água de coco e 1 mL de solvente extrator. As extrações foram realizadas em amostras provenientes de 2 cocos diferentes.

As determinações de Cu indicaram valores muito próximos ou até menores que o limite de detecção apresentado pela técnica de ETAAS. Isso indica que o Cu não está associado à fração lipídica da água de coco.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a determinação da fração lipídeos-Zn em amostras provenientes de dois cocos diferentes. Os resultados indicam que menos de 5% do Zn presente em água de coco encontra-se associado à fração lipídica.

**Tabela 13.** Resultados da determinação da concentração de Zn na fração lipídica de água de coco.

Amostra	Concentração total	Fração aquosa	Fração extraída (CCl <sub>4</sub> )	% extraída
Coco 1	506 ± 2	500 ± 5	16,7 ± 1,4	3,3
Coco 2	394 ± 5	389 ± 5	18,5 ± 2,0	4,8

O procedimento para separação da fração lipídica, não foi realizado para amostras pasteurizadas.

#### 4.5. Determinação da concentração total de proteínas

As determinações foram realizadas em 7 amostras não pasteurizadas provenientes de 7 cocos diferentes. Com o intuito de verificar se o processo de pasteurização causou mudanças na concentração total de proteínas, 2 amostras foram analisadas antes e depois de serem pasteurizadas, cada um delas consistindo na mistura representativa de 40 cocos, as pasteurizações foram realizadas em dias diferentes. Os resultados obtidos para estas determinações estão mostrados na Tabela 14.

A composição da água de coco pode variar muito de um coco para outro, isso devido ao estágio de maturação, bem como as condições nas quais o coco foi desenvolvido. Em alguns cocos a concentração de proteínas se apresentou tão baixa que não foi possível medi-las utilizando o método de Bradford, uma etapa de pré-concentração com um secador a vácuo foi necessária antes da dosagem das amostras coco 1, 2 e 3, apresentadas na Tabela 14. Por outro lado, em outras amostras a concentração determinada foi relativamente alta, chegando a 90 mg/L.



**Tabela 14.** Dosagem da concentração total de proteínas de algumas amostras de água de coco (n=3).

Amostra	Concentração total de proteínas (mg/L)
Coco1	31 ± 1
Coco2	36 ± 5
Coco3	35 ± 1
Coco 4	56 ± 1
Coco 5	41 ± 1
Coco 6	56 ± 2
Coco 7	90 ± 3
Mistura 1 não processada	74 ± 7
Mistura 1 processada	73 ± 4
Mistura 2 não processada	84 ± 6
Mistura 2 processada	83 ± 7

O processo de pasteurização não afetou a concentração total de proteínas. No entanto, as concentrações totais não são conclusivas a respeito de mudanças estruturais das moléculas de proteínas as quais podem alterar a distribuição de Cu e Zn. Por isso foram feitos estudos visando a separação de proteínas e a determinação dos seus pesos moleculares utilizando SDS-PAGE e cromatografia de filtração em gel.

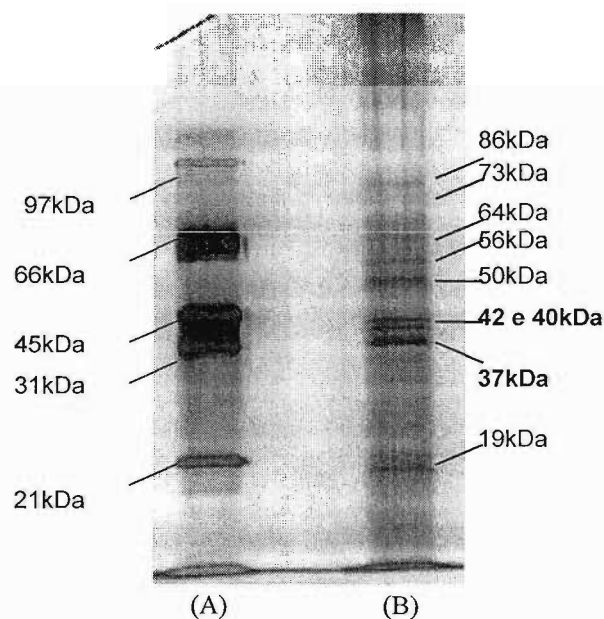
#### 4.6. Separação de proteínas presentes em água de coco por SDS-PAGE

Este método de separação utiliza um agente redutor na etapa de pré-tratamento da amostra que rompe pontes dissulfeto. Essas são responsáveis pela junção de cadeias polipeptídicas formando aglomerados protéicos, por isso, com

este método, estuda-se as frações de proteínas reduzidas. O SDS-PAGE é um método bastante utilizado para obter informações iniciais sobre os pesos moleculares das proteínas, previamente à separação cromatográfica por filtração em gel.

Posteriormente surgiu a idéia de avaliar a distribuição dos elementos Cu e Zn por SS-ETAAS e ETAAS nas frações de proteínas separadas por SDS-PAGE. Este trabalho, pioneiro, proporcionou o desenvolvimento de uma metodologia para determinar a concentração de Cu e Zn associada a fração protéica. No entanto, diferentes elementos em frações de proteínas provenientes de outras amostras poderão ser determinados, contribuindo para estudos bioquímicos.

A amostra coco 7 da Tabela 14 foi submetida à separação por SDS-PAGE, o gel de poliacrilamida obtido está apresentado na Figura 18.

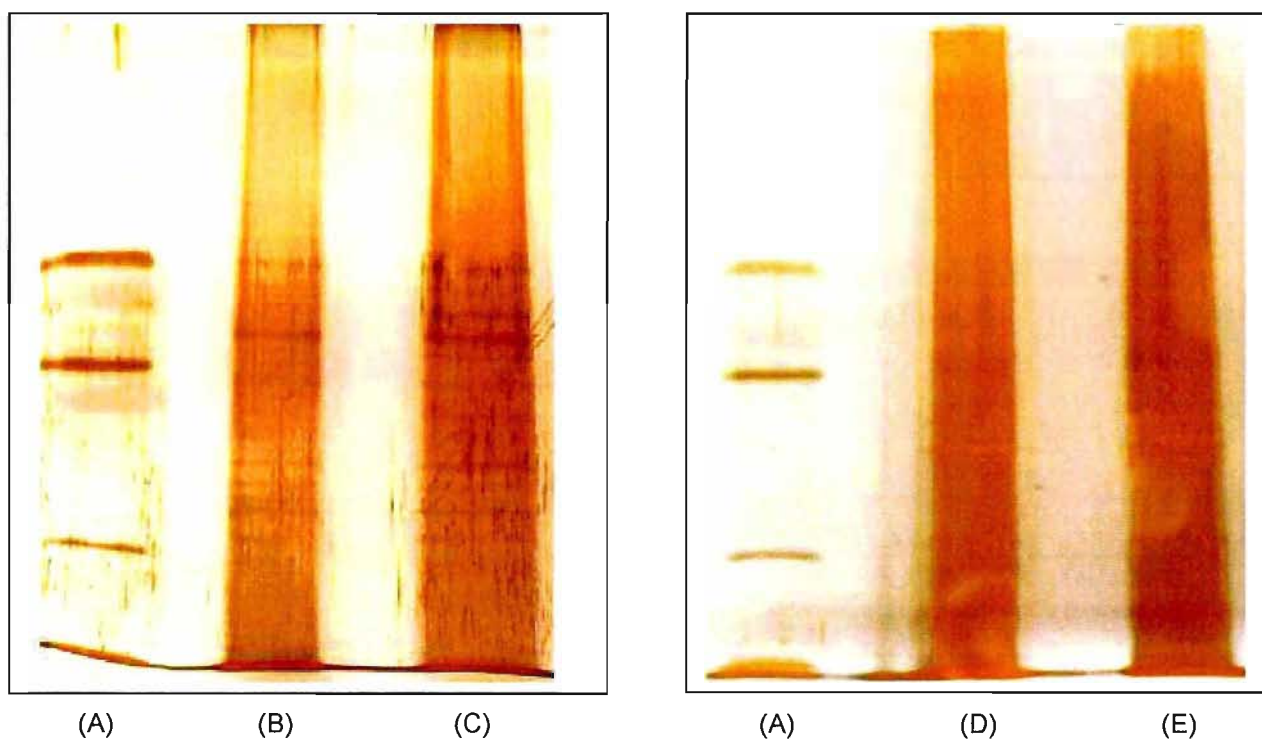


**Figura 18.** SDS-PAGE de água de coco não processada. (A) padrão de proteínas de baixo peso molecular e (B) água de coco.

A água de coco apresenta grande diversidade de proteínas, isso pode ser verificado no gel de eletroforese que apresenta várias bandas (faixas escuras horizontais), que foram obtidas pela coloração com  $\text{AgNO}_3$  e indicam a presença de proteínas. É possível verificar também que as bandas situadas na região de 37 a 42

kDa apresentam-se mais intensas, indicando maior abundância de proteínas nesta faixa de peso molecular.

Outras amostras de água de coco foram submetidas a eletroforese, os resultados estão apresentados na Figura 19. Comparando-se as amostras (B) e (C) é possível observar várias bandas comuns entre as amostras, mas é possível verificar também que a amostra (C) apresenta maior diversidade de proteínas, reforçando a diferença de composição entre um coco e outro.

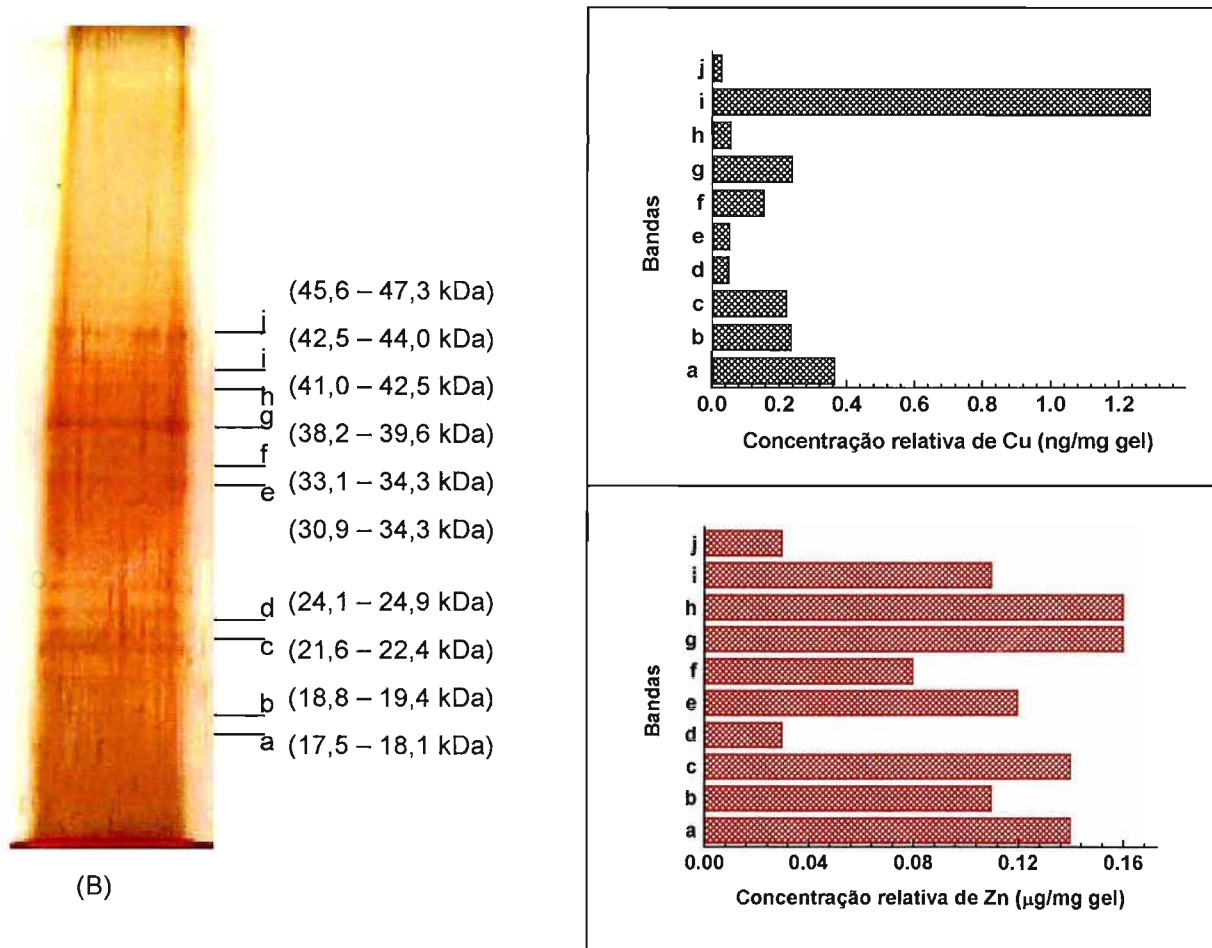


**Figura 19.** SDS-PAGE de amostras de água de coco. (A) padrões de proteínas de baixo peso molecular; (B) amostra 1; (C) amostra 2; (D) Mistura de 40 cocos sem pasteurização e (E) mistura após pasteurização.

As amostras (D) e (E) referem-se a mistura de 40 cocos antes e depois da pasteurização. Verificou-se muita similaridade entre as bandas presentes nas duas amostras, embora a visualização esteja prejudicada, portanto, aparentemente não foi constatada modificação das bandas em função do processo de pasteurização.

#### 4.7. Determinação de Cu e Zn em frações de proteínas obtidas por SDS-PAGE

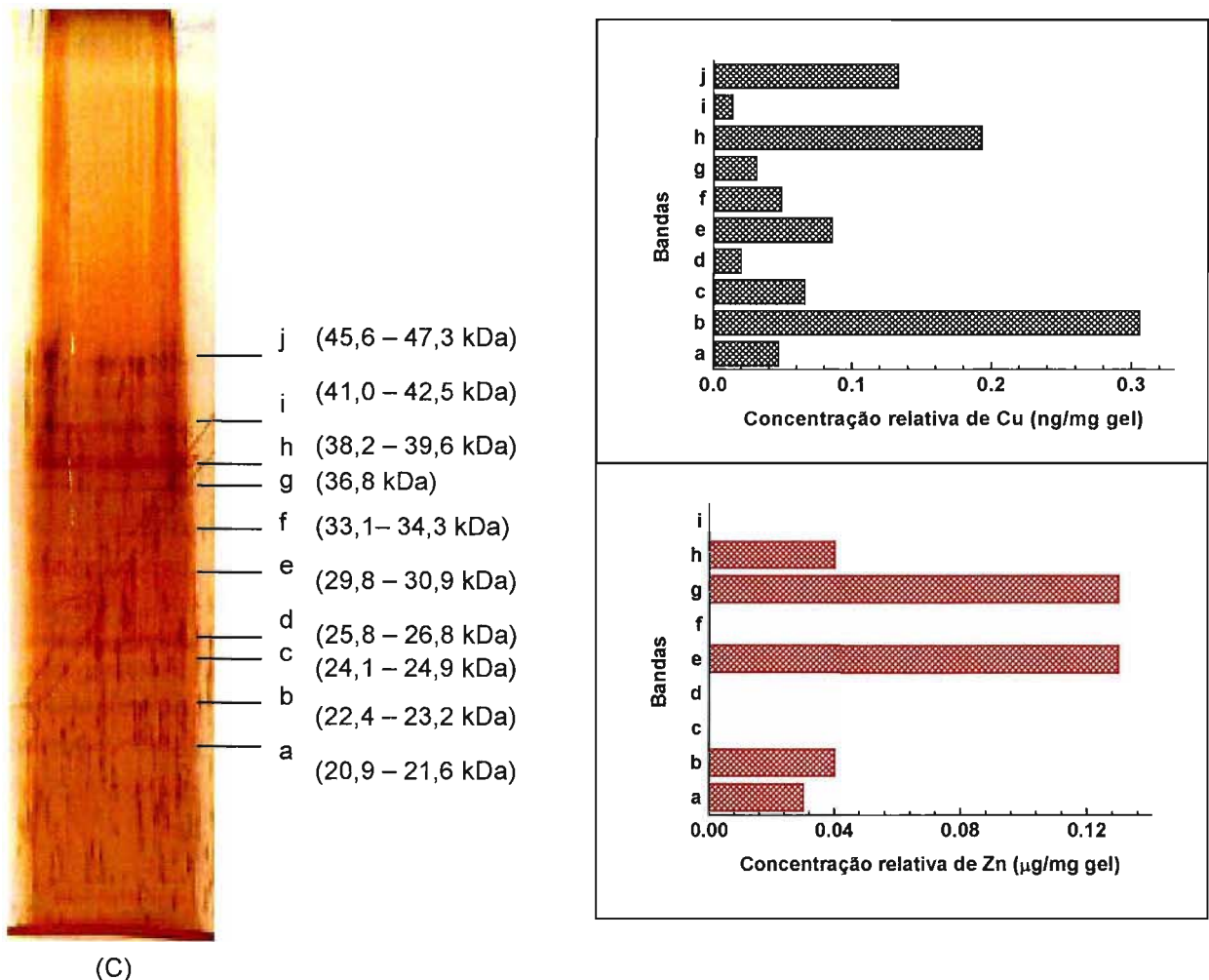
Cada raia dos géis contendo uma amostra diferente (Figura 19, B,C,D e E) foi analisada. Os intervalos de pesos moleculares de cada banda (faixas horizontais) foram determinados, posteriormente estas bandas foram recortadas e em seguida fez-se as determinações de Cu e Zn. Os resultados obtidos são semi-quantitativos, porém fornecem informações das concentrações relativas dos elementos entre as bandas de uma mesma raia. Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 20, 21, 22 e 23 onde as bandas estão indicadas no gel com letras alfabéticas, bem como suas massas moleculares, os gráficos indicam as concentrações relativas de Cu e Zn em cada banda.



**Figura 20.** Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a amostra 1.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram que o elemento Cu está ligado, predominantemente, às proteínas que apresentam massas moleculares entre 42,5 e 47 kDa, enquanto que o Zn está associado às diversas faixas de massas moleculares obtidas no gel.

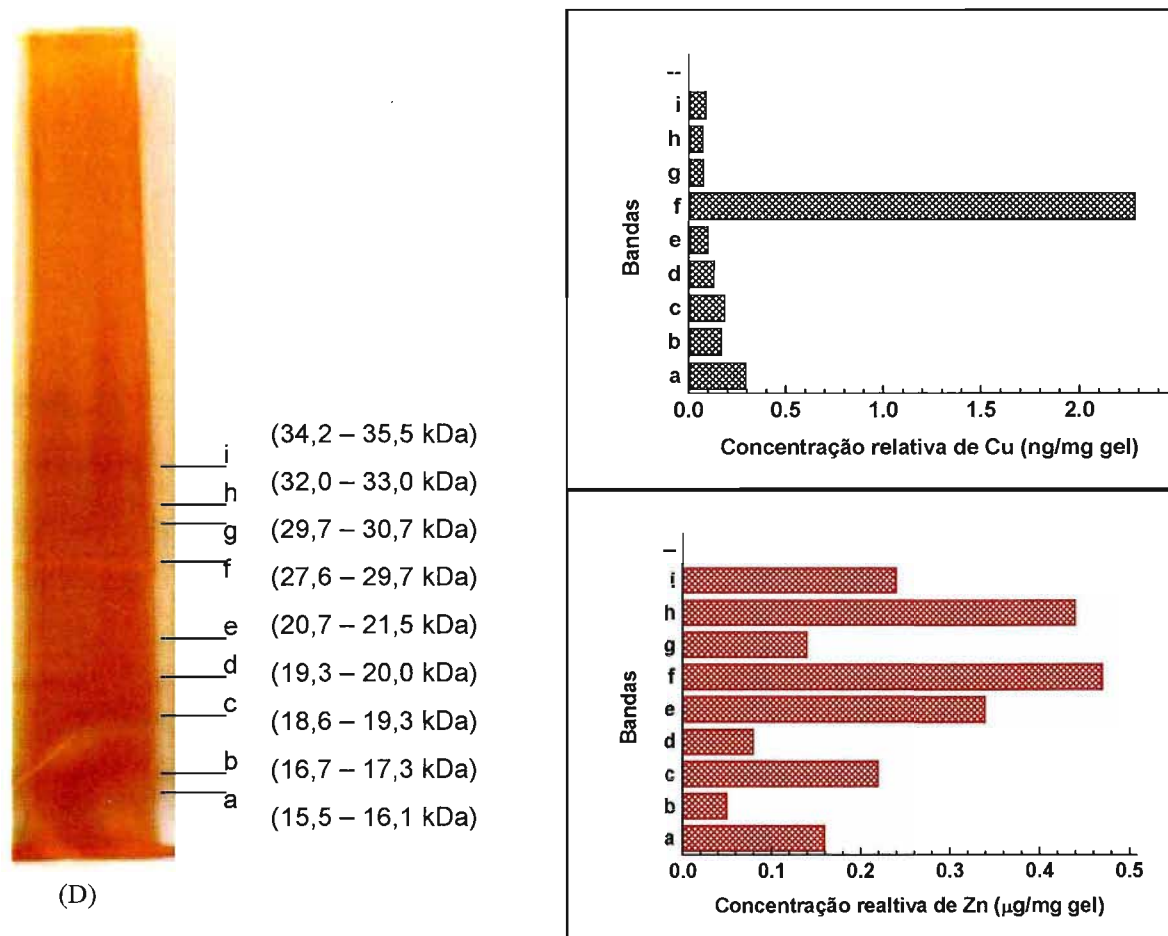
As distribuições de proteínas e também dos elementos Cu e Zn podem ser alteradas de um coco para outro, isso ficou muito evidente ao comparar os resultados apresentados nas Figuras 20 e 21, que mostram géis de duas amostras distintas.



**Figura 21.** Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a amostra 2.

Na Figura 21, pode ser observado que o Cu está mais associado a proteínas de massas moleculares de 22,4 a 23,2 kDa, 36,8 a 39,6 kDa, e 45,6 a 47,3 kDa. O Zn apresentou-se, predominantemente, associado a proteínas de massas moleculares na faixa de 29,8 a 30,9 kDa e 36,8 kDa.

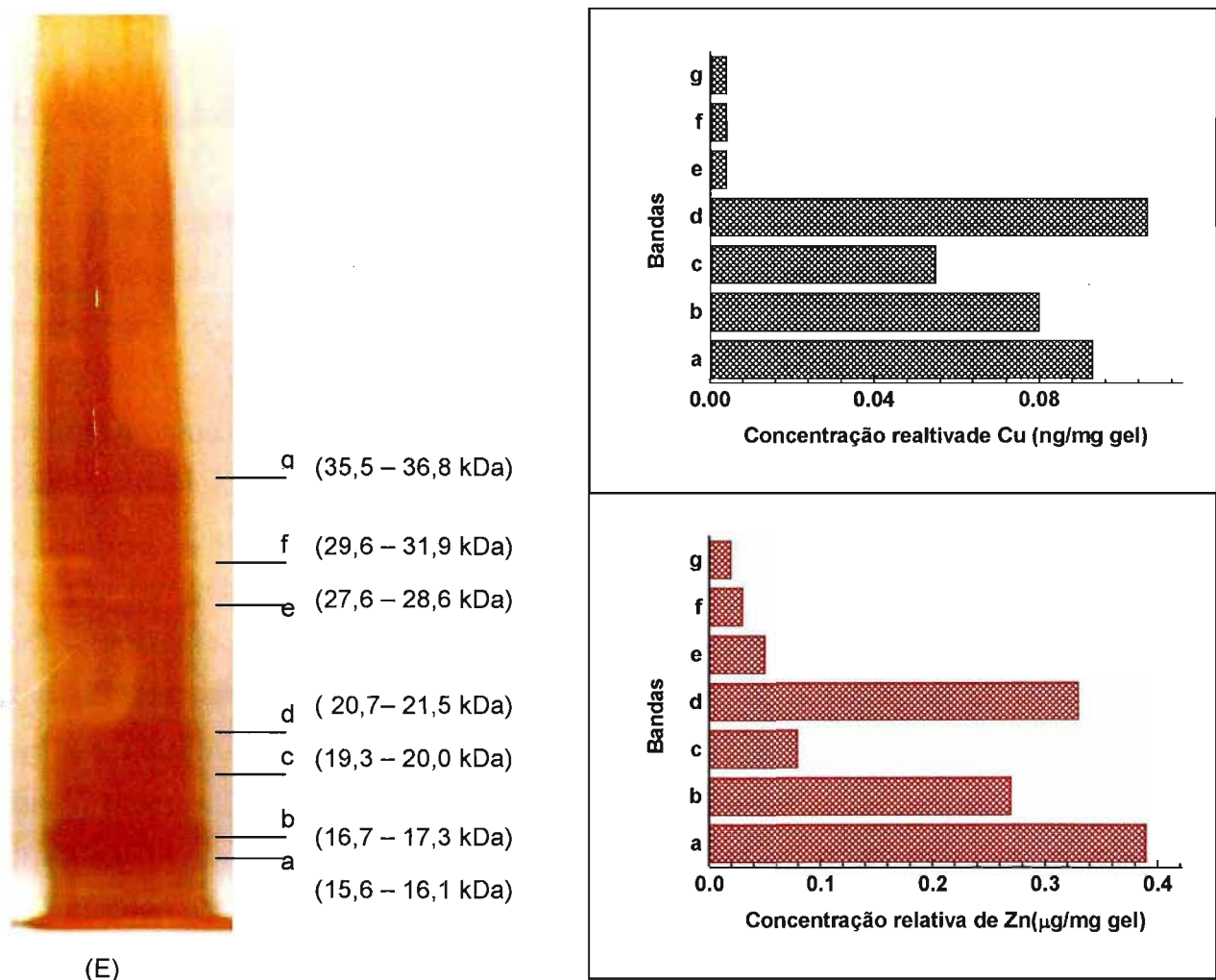
Para verificar o efeito da pasteurização sobre a distribuição das espécies Cu-proteínas e Zn-proteínas, as mesmas medidas foram realizadas para uma amostra de uma mistura representativa de 40 cocos, antes e após a pasteurização (Figuras 22 e 23).



**Figura 22.** Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a mistura (n = 40 cocos) não pasteurizada.



A amostra de água de coco não processada apresentou Cu ligado, predominantemente, a proteínas com faixa de massa molecular entre 27,6 e 29,7 kDa (Figura 22), mas quando esta amostra foi submetida ao processo de pasteurização, um rearranjo parece ter acontecido de modo que o Cu encontrou-se distribuído de maneira mais uniforme nas várias faixas de pesos moleculares presentes no gel. Além disso, concentrações menores de Cu foram detectadas na amostra após pasteurização (Figura 23). Isso se deve ao fato de as amostras terem sido submetidas previamente ao processo de diálise. Portanto, espécies de Cu e Zn menores que 12 kDa foram previamente separadas.



**Figura 23.** Resultados das distribuições relativas de Cu e Zn para a mistura (n = 40 cocos) pasteurizada.

A amostra não pasteurizada apresentou maior concentração de Zn associado a proteínas de maiores pesos moleculares. Após a pasteurização ocorreu uma redistribuição de maneira que Zn passa a ser encontrado em proteínas com menores pesos moleculares.

As determinações semi-quantitativas por SS-ETAAS e ETAAS combinadas ao método de SDS-PAGE, utilizando 2-mercaptoetanol, foram úteis para avaliar a distribuição de Cu e Zn nas frações de proteínas reduzidas, presentes na água de coco. Foi constatado que a pasteurização não provoca alterações na concentração total de proteínas, mas ao investigar a distribuição das espécies protéicas ligadas a Cu e Zn foi possível observar que houve rearranjos estruturais proporcionando alterações nas suas distribuições.

#### **4.8. Separação das proteínas por filtração em gel**

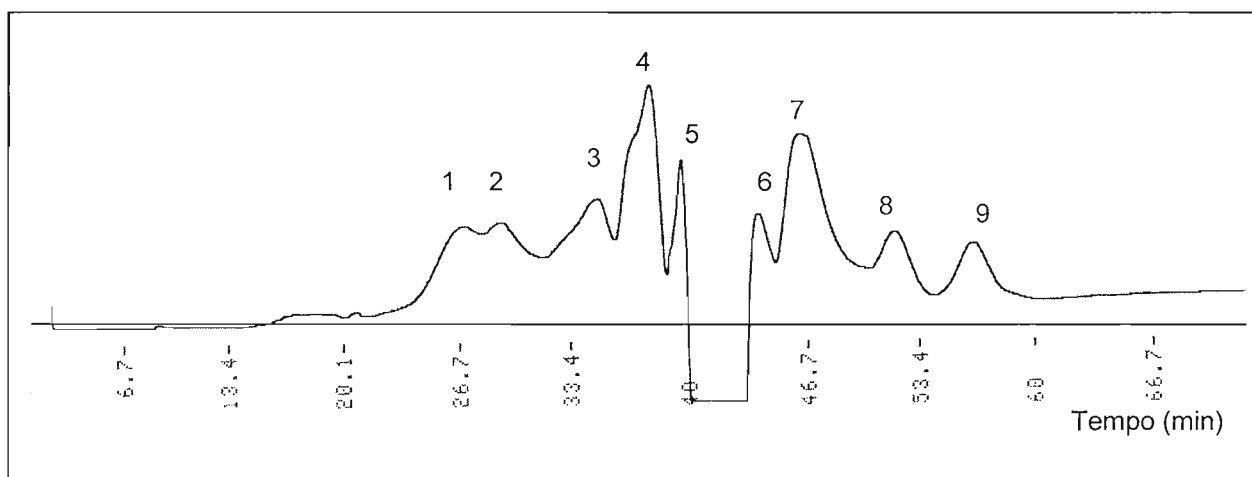
Neste estudo, as frações contendo proteínas não foram reduzidas com 2-mercaptoetanol. O pré-tratamento da amostra para inserção na coluna cromatográfica consistiu apenas de uma pré-concentração por ultrafiltração (processo físico). Portanto, polipeptídios puderam ser separados e identificados nos cromatogramas, permitindo que alterações estruturais, como o rompimento das pontes dissulfeto, pudessem ser identificadas.

Uma amostra de água de coco foi submetida a separação das proteínas por filtração em gel antes e após o processo de pasteurização por microondas. Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 24 e 25, ambos na mesma escala. Estes cromatogramas foram obtidos através de um detector UV com leitura em  $\lambda = 280$  nm. O cromatograma expressa a intensidade de absorvância versus tempo (min) de eluição. A determinação da concentração de proteínas detectadas em cada pico cromatográfico não foi realizada, pois o intuito principal foi obter informações dos pesos moleculares das proteínas e relacioná-los à presença de Cu e Zn, assim como no estudo com SDS-PAGE.

O cromatograma da Figura 24 indica que a água de coco apresenta grande diversidade de proteínas, o que concorda com os resultados da separação por SDS-PAGE. Proteínas na faixa de pesos moleculares entre 256 e 0,386 kDa foram



encontradas. As massas moleculares das proteínas de maior abundância, representadas por números no cromatograma, estão apresentadas na Tabela 15.



**Figura 24.** Cromatograma de filtração em gel de água de coco não pasteurizada.

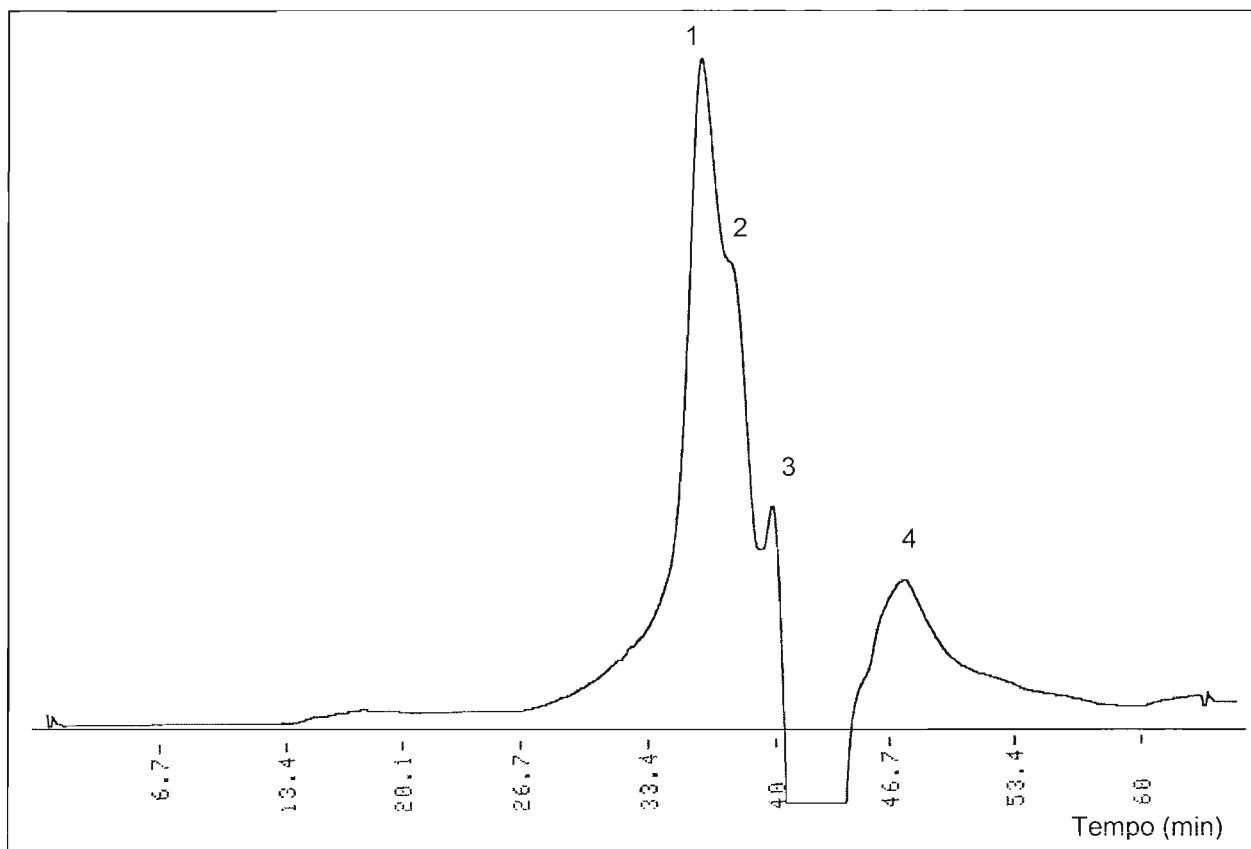
**Tabela 15.** Massas moleculares das proteínas de maior abundância em água de coco não pasteurizada.

Picos Cromatográficos*	Tempo de eluição (min)	Massa molecular (kDa)
1	26,6	98,0
2	29,3	62,3
3	35,0	24,4
4	38,3	14,1
5	40,0	10,7
6	44,4	5,2
7	46,7	3,5
8	52,3	1,4
9	56,5	0,7

\* Picos cromatográficos indicados na Figura 24.

A Figura 25 mostra o cromatograma após a pasteurização da água de coco, que indica presença de proteínas compreendendo a faixa de peso molecular entre

96,4 e 0,562 kDa. As massas moleculares das proteínas de maior abundância estão apresentadas na Tabela 16.



**Figura 25.** Cromatograma de filtração em gel de água de coco pasteurizada.

**Tabela 16.** Massas moleculares das proteínas e polipeptídeos de maior abundância em água de coco pasteurizada.

Picos Cromatográficos*	Tempo de eluição (min)	Massa molecular (kDa)
1	36,4	19,4
2	38,0	14,8
3	40	10,6
4	47,4	3,1

\* Picos cromatográficos indicados na Figura 25.

Uma vez que a água de coco passou por pré-concentração em filtro capaz de reter moléculas acima de 5 kDa, esperava-se que frações de pesos moleculares menores que essas não estivessem presentes na amostra. Duas hipóteses podem ser consideradas para explicar a presença destas proteínas de baixo peso molecular, indicadas nos cromatogramas. Para realizar a pré-concentração, 25 mL de água de coco foram filtrados até o volume final de 0,5 mL. Sendo assim, é possível que na fração remanescente (0,5 mL), espécies de massas moleculares menores do que 5 kDa tenham permanecido na solução. Uma outra hipótese é a possibilidade de ter havido obstrução dos poros do filtro, tornando-os ainda menores que 5 kDa e portanto, moléculas menores tenham ficado retidas.

Em todos os cromatogramas obtidos neste estudo, inclusive os da calibração da coluna com padrões de proteínas, notou-se a presença de uma queda da linha base numa região em torno de 40 a 43 min. Esta queda pode estar relacionada a espécies que provocaram alterações no índice de refração da solução eluída e, conseqüentemente, variação no sinal de absorbância. A possibilidade dessa alteração da linha base estar relacionada a problemas com o detector pode ser descartada, uma vez que ela ocorreu em todos os cromatogramas e no mesmo intervalo de tempo. Entretanto, a presença deste sinal espúrio não impossibilitou a visualização de diversas proteínas presentes na água de coco, bem como a alteração do perfil dos picos cromatográficos provocada pelo processo de pasteurização.

Após a pasteurização notou-se uma grande mudança no perfil do cromatograma. Esta diferença pode ser confirmada pelas faixas de pesos moleculares de cada um deles. No caso da amostra não pasteurizada, foram detectadas proteínas a partir de 256 kDa enquanto que na amostra pasteurizada a partir de 96,4 kDa. A pasteurização provocou a transformação de espécies de pesos moleculares maiores em espécies menores. Isso confirma a presença de agregados de proteínas (proteínas com mais de uma cadeia polipeptídica) unidas por interações não covalentes como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, entre outras. Para a amostra pasteurizada, uma maior abundância de proteínas foi encontrada no intervalo de pesos moleculares entre 30 à 10 kDa, com maior abundância àquelas de 19,4 kDa (Figura 25, pico 1).

Considerando que um dos principais focos da pasteurização é a inativação enzimática, no caso da água de coco a polifenoloxidase e peroxidase, o processo utilizado demonstrou ser muito eficiente. Com o rompimento de ligações ocorrem mudanças na conformação das enzimas, provocando a inativação das mesmas.

#### 4.9. Determinação de Cu e Zn nas frações obtidas por filtração em gel

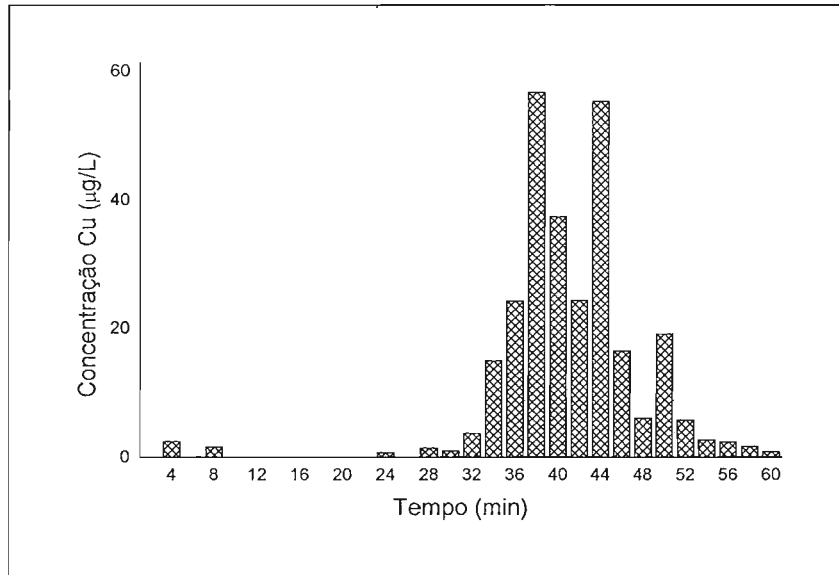
As determinações de Cu e Zn nas frações obtidas por filtração em gel foram feitas para avaliar a distribuição destes elementos nas mesmas e também para avaliar o efeito da pasteurização.

É importante ressaltar que, a amostra de água de coco utilizada na separação por cromatografia de filtração em gel apresentou concentração de Cu ( $33,3 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ ) e proteínas ( $63 \pm 1 \mu\text{g/L}$ ) acima do valor médio encontrado nas amostras utilizadas ao longo do desenvolvimento do trabalho. Em contrapartida, uma concentração muito abaixo de Zn foi encontrada ( $47,6 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ ).

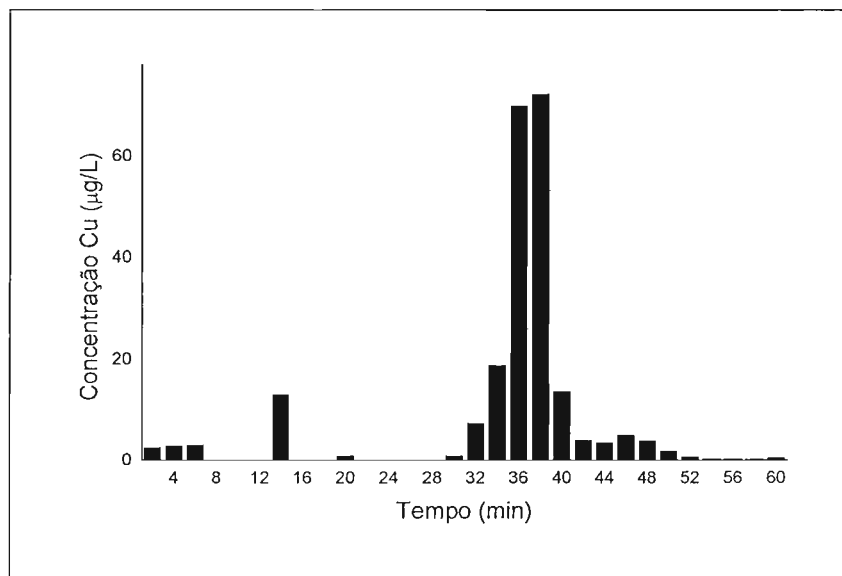
Para melhor visualização dos resultados, construíram-se gráficos de concentração *versus* tempo de eluição. Os resultados obtidos para o Cu estão mostrados nas Figuras 26 e 27.

A avaliação do gráfico da Figura 26 permite verificar que o Cu está distribuído, preferencialmente, nas frações recolhidas entre 34 a 50 min, correspondendo ao intervalo de peso molecular de 30 a 2 kDa, respectivamente. Picos de maiores concentrações de Cu foram encontrados na região de pesos moleculares de 14 e 5 kDa (38 e 44 min).

Para a água de coco pasteurizada, o intervalo de concentração de Cu tornou-se mais estreito (Figura 27). As maiores concentrações de Cu foram observadas no intervalo entre 34 a 40 min, correspondendo às massas moleculares de 28,7 e 10,7 kDa, respectivamente. Os resultados indicam que a pasteurização também alterou a distribuição de Cu nas diferentes frações de proteínas. Essas alterações podem ocorrer em função da quebra de ligações não covalentes, com isso, sítios ativos podem ficar expostos nas moléculas e rearranjos estruturais podem ocorrer em função do aquecimento exercido durante a pasteurização.

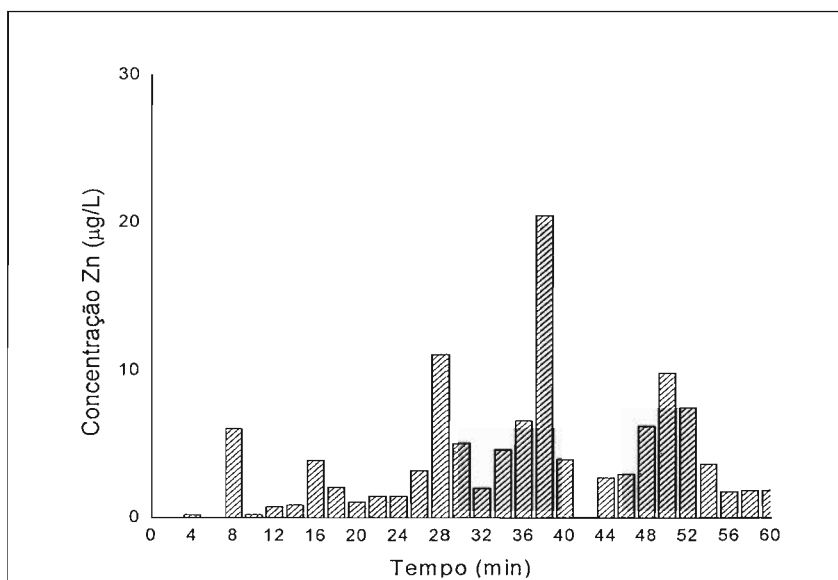


**Figura 26.** Determinação de Cu por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco não pasteurizada.

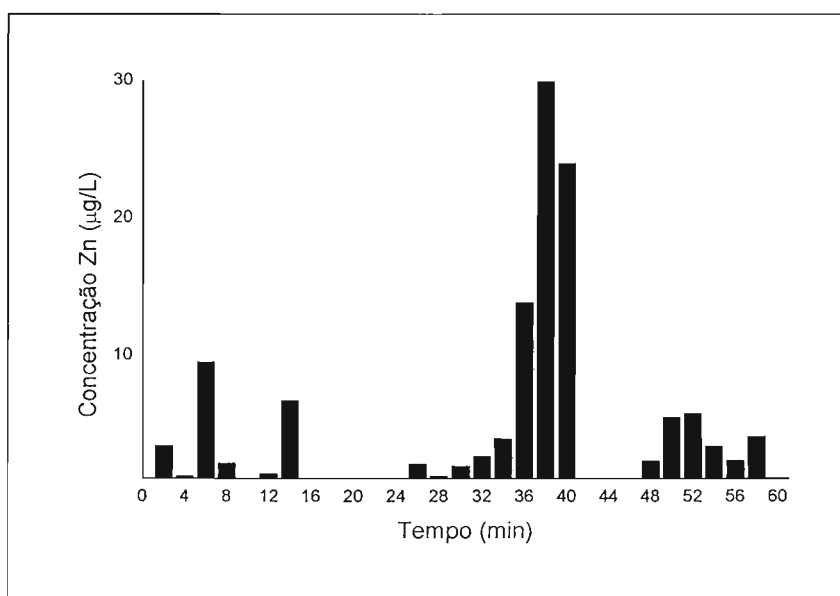


**Figura 27.** Determinação de Cu por ETAAS em frações da filtração em gel de água de coco pasteurizada.

Os resultados da determinação de Zn nas frações estão indicados nas Figuras 28 e 29.



**Figura 28.** Determinação de Zn em frações da filtração em gel de água de coco não pasteurizada.



**Figura 29.** Determinação de Zn em frações da filtração em gel de água de coco pasteurizada.

As determinações de Zn nas frações protéicas indicaram que para a amostra não pasteurizada, este elemento foi encontrado em, praticamente, todas as frações de espécies separadas. Com a pasteurização, o Zn que antes se associava a espécies maiores (eluídas entre 16 e 30 min) passaram a se concentrar na região das moléculas eluídas entre 36 e 40 min. Também é possível notar que houve diminuição da concentração de Zn associado as moléculas de menores pesos moleculares. Esses resultados indicam que ocorreram possíveis quebras de ligações de moléculas maiores (possivelmente oligômeros formados por mais de uma cadeia polipeptídica) e rearranjos estruturais, resultando em outras menores.

Ao relacionar os resultados das determinações de Cu e Zn nas frações com os cromatogramas obtidos, é possível verificar que as maiores concentrações de Cu estão relacionadas com as regiões dos picos cromatográficos de maiores áreas tanto para a amostra pasteurizada quanto para a não pasteurizada. No caso do Zn, oligômeros, desfeitos provavelmente por quebra de ligações não covalentes, geraram fragmentos com menor massa molecular e mantiveram esse elemento associado as suas estruturas, uma vez que na região do pico cromatográfico 1 da amostra pasteurizada (Figura 25) encontrou-se maior concentração de Zn.

É importante ressaltar que a separação por filtração em gel separa, além das proteínas, outros tipos de moléculas contidas na amostra com diferentes pesos moleculares. Porém, o espectrofotômetro UV estava calibrado para detectar, preferencialmente, proteínas ( $\lambda=280$  nm). Nesse caso, espécies químicas que não proteínas e que contenham Cu ou Zn na sua estrutura podem ter sido coletadas nas diferentes frações.

#### **4.10. Fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas**

O procedimento de fracionamento por filtrações sucessivas foi realizado nas mesmas amostras utilizadas para a cromatografia de filtração em gel.

Na Tabela 17 e na Figura 30 estão representados os valores das concentrações de Cu nas diferentes frações, tanto para a água não pasteurizada como para a pasteurizada.

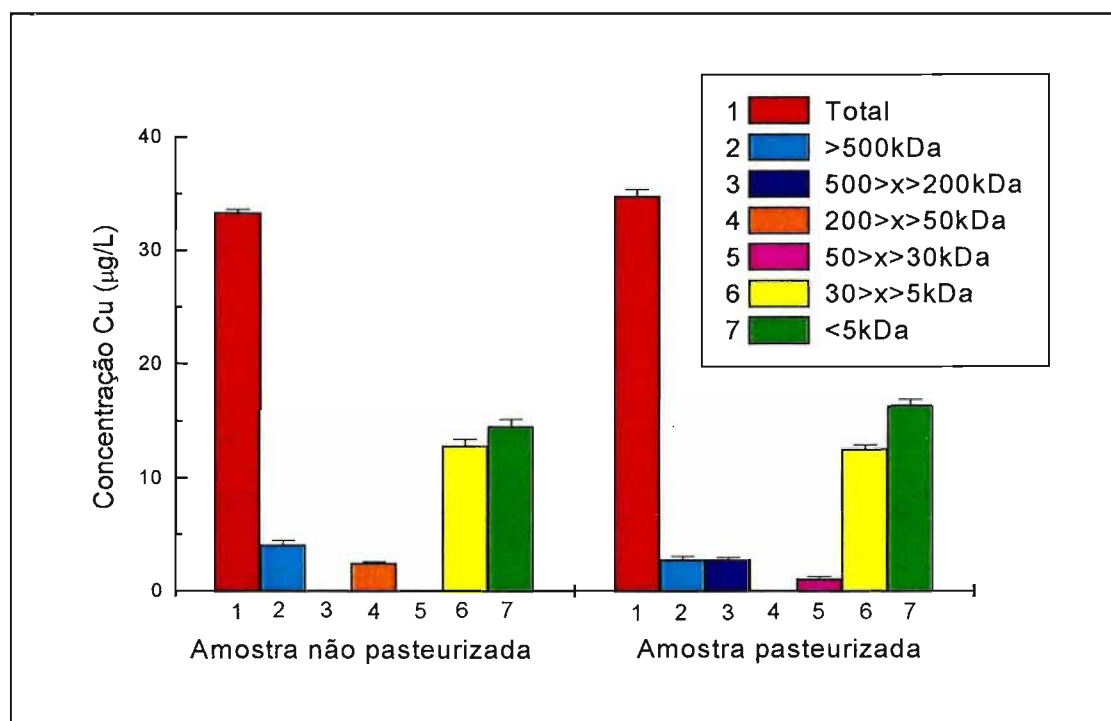
Os resultados indicam que em torno de 82 % do Cu, presente na água de coco não pasteurizada, está associado a moléculas de peso molecular abaixo de 30 kDa. Sendo que uma fração significativa (38 %) pode estar associado a moléculas com pesos entre 5 e 30 kDa. Além disso, em torno de 10% do Cu pode estar associado a moléculas maiores que 500 kDa, provavelmente essas moléculas são aglomerados ou polipeptídios.

**Tabela 17.** Resultados da determinação da concentração de Cu por ETAAS em diversas frações de água de coco obtidas por ultrafiltrações.

Fração	Água de coco não pasteurizada	Água de coco pasteurizada
kDa	[Cu] ( $\mu\text{g/L}$ )	
Total	$33,3 \pm 0,3$	$34,7 \pm 0,7$
> 500	$4,1 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$
500> x >200	----	$2,8 \pm 0,2$
200> x > 50	$2,5 \pm 0,1$	----
50> x > 30	----	$1,1 \pm 0,2$
30> x >5	$12,8 \pm 0,6$	$12,5 \pm 0,4$
<5	$14,5 \pm 0,6$	$16,3 \pm 0,5$

Um perfil semelhante pode ser observado para a amostra pasteurizada. Porém, ocorreu uma redução do Cu associado às grandes moléculas e aumento das frações intermediárias. Esses resultados também indicaram uma redistribuição do Cu após a pasteurização da água de coco.





**Figura 30.** Resultados da determinação de Cu por ETAAS em diversas frações de água de coco obtidas por ultrafiltrações.

É importante ressaltar que a determinação de Zn por ETAAS é particularmente difícil devido à alta sensibilidade da técnica e a problemas de contaminação.

Embora cuidados para evitar contaminações durante as filtrações tenham sido tomados, encontrou-se grande dificuldade para a determinação de Zn nas diferentes frações. As concentrações encontradas nas frações estavam muito acima da concentração total da amostra. Diferentes filtros foram utilizados e lavados diversas vezes com água desionizada, mas as contaminações persistiram. Devido a esse problema, os resultados da determinação de Zn nessas frações não serão apresentados nessa dissertação. Entretanto, foi possível determinar o Zn, sem problemas de contaminação, no filtrado da ultrafiltração por centrifugação, a qual separa frações de pesos moleculares acima de 5 kDa (último filtro do procedimento das ultrafiltrações sucessivas).

Os resultados (Tabela 18) indicam que mais de 80% do Zn presente na água de coco não pasteurizada está associado a moléculas menores que 5 kDa (linhas 1 e 2 da tabela).

A pasteurização provocou contaminação da amostra com Zn, porém, os resultados indicam que a concentração de Zn encontrada no filtrado foi bastante próxima à concentração total da amostra pasteurizada.

**Tabela 18.** Resultados da determinação da concentração total de Zn e da fração menor que 5kDa presente na água de coco (n=2).

Amostra	[ Zn ] (µg/L)
Total não pasteurizada	47,6 ± 0,4
Fração menor que 5kDa não pasteurizada	40,1 ± 0,7
Total Pasteurizada	71,2 ± 1,5
Fração menor que 5kDa pasteurizada	72,7 ± 0,9

Esses resultados indicaram a mesma tendência observada no estudo com SDS-PAGE, que indicou que após a pasteurização há uma redistribuição de Zn para frações de menores pesos moleculares.

## 5. CONCLUSÕES

A água de coco apresenta uma composição bastante variada de um fruto para o outro. Isso foi confirmado observando as variações encontradas nas concentrações de proteínas, de Cu e de Zn. Além disso, foi possível constatar que entre diferentes amostras a distribuição dos elementos pode variar e, por isso, cada coco deve ser considerado como uma entidade diferente.

Embora a composição da água de coco seja variada, apresenta valores de pH muito próximos entre frutos diferentes ( pH ~ 4,75), o que pode indicar a presença de um sistema tampão. A pasteurização não provocou alterações nas concentrações hidrogeniônicas da água de coco. Foi possível verificar que mesmo as amostras comerciais apresentam concentrações hidrogeniônicas semelhantes à água de coco natural. Os valores de  $[H^+]_{total}$ , devem ser provenientes principalmente de ácidos orgânicos fracos presentes na água de coco, como o ácido málico que se encontra em maior concentração na polpa do coco.

Os resultados obtidos com a extração por ponto nuvem indicaram que a concentração de Cu associada às moléculas hidrofóbicas de cadeia longa ou a espécies neutras, podem variar entre as amostras, mas que parte de Cu presente na água de coco (em torno de 20 %) encontra-se associada a esta fração. Em contrapartida, para o Zn, os resultados indicaram que uma concentração muito pequena está associada a essas moléculas (~ 1 % ). Isso pode indicar que este elemento encontra-se livre ou associado a moléculas polares de baixo peso molecular.

No estudo da fração lipídica, foi possível constatar que não há quantidade detectável de Cu gorduras presentes na água de coco, enquanto que o Zn, encontra-se em pequena concentração (~ 5 %).

O processo de pasteurização utilizado neste trabalho não afetou a concentração total de proteínas da água de coco. Também não afetou, aparentemente, a distribuição por pesos moleculares de proteínas reduzidas, observada nas bandas da amostra antes e depois da pasteurização, obtidas por SDS-PAGE. Contudo, quando se fez um estudo da concentração de Cu e Zn associado a essas proteínas separadas por bandas, foi possível observar que o

processo de pasteurização alterou a distribuição de Cu e Zn na fração protéica (reduzida). Após a pasteurização o Cu se distribuiu de maneira mais uniforme nas faixas de diferentes pesos moleculares presentes no gel. O Zn que se encontrava associado a proteínas de maiores pesos moleculares, após o processamento da água de coco, foi encontrado em proteínas de menores pesos moleculares.

Com a utilização da cromatografia de filtração em gel foi possível verificar que a pasteurização alterou a distribuição protéica (não reduzida) da água de coco. Antes da pasteurização era possível observar no cromatograma, a presença de proteínas a com pesos moleculares a partir de 256 kDa. Após o processamento da amostra, as maiores proteínas constatadas apresentavam 96,4 kDa. Isso é um indicativo de que há rompimento de ligações de proteínas com mais de uma cadeia polipeptídica (oligômeros), provavelmente ligações não covalentes. Este tipo de quebra pode promover alterações nas conformações das moléculas, efeito desejável da pasteurização.

Os estudos das distribuições de Cu e Zn nas frações obtidas por cromatografia indicaram que a pasteurização também promove alteração desta distribuição. Para o Cu, sua distribuição segue a mesma tendência da alteração dos pesos moleculares, ou seja, após a pasteurização, encontra-se maior concentração do elemento, na mesma região em que se encontrou maior abundância de proteínas. Similarmente ao Cu, foi verificada maior concentração de Zn na faixa de maior abundância de proteínas antes e após a pasteurização.

Os resultados obtidos do fracionamento da água de coco por ultrafiltrações sucessivas indicaram que 10% do Cu apresenta na água de coco está associado a espécies maiores que 500 kDa (oligômeros) e que 38 % apresenta-se em espécies de 30 a 5 kDa. Enquanto que o mais de 80 % do Zn encontra-se em frações menores que 5 kDa. Após a pasteurização, as concentrações de ambos elementos aumentaram em frações de menores pesos moleculares.

Neste estudo de especificação química de Cu e Zn em água de coco, não foi possível isolar e identificar grupos protéicos, ou outros aos quais esses elementos poderiam estar associados. Porém, o estudo evoluiu a ponto de permitir esboçar um modelo, a partir dos resultados de várias técnicas analíticas que indicaram grupos de moléculas possíveis de estarem associados ao Cu e Zn. Os resultados obtidos e

---

alterações provocadas pelo processo de pasteurização foram confirmatórios por mais de uma técnica.

Adicionalmente, as informações sobre a composição química da água de coco não processada, com respeito a Cu e Zn, apresentadas neste trabalho, geraram informações que serão úteis às diversas áreas de aplicação da água de coco, tais como, medicina, biotecnologia, alimentícia, etc.

---

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIQUEIRA, L. A.; SIQUEIRA, E. R.; RIBEIRO, F. E. Comportamento de coqueiros híbridos no Nordeste do Brasil. *Plantations, recherché, development*, **2/1** (1995) 48-52.
2. UNESP – Hidráulica e irrigação, Ilha Solteira, Produção de coco aumenta 25 % em São Paulo, disponível em <http://www.agr.feis.unesp.br/FSP281100.htm>, site consultado em 27/02/2005.
3. UNESP – Hidráulica e irrigação, Ilha Solteira, Coco Muda paisagem do interior paulista. Disponível em [http://www.agr.feis.unesp.br/coco\\_sp.htm](http://www.agr.feis.unesp.br/coco_sp.htm), site consultado em 27/01/2005.
4. LOPES, J. A. O., Como é gostoso esse imigrante. *O Estado de São Paulo*, caderno 2, 12 de outubro de 2001.
5. BANZON, J. A., Industrial coconut research and development. *The Journal of Coconut Studies*, **2/2** (1977) 13-16.
6. ARAGÃO, W. M.; A importância do coqueiro-anão verde. Disponível em: <http://www.embrapa.br>, site consultado em 27/01/2005.
7. Ministério de Fazenda, Secretaria de Acompanhamento Econômico, Ofício n. 155/2002/SDE/GAB, de 15 de janeiro de 2002, disponível em: <http://www.fazenda.org.br>, acesso em 07/10/2003.
8. Ministério da Integração Nacional (MG), Coco verde. Disponível em: <http://www.irrigar.org.br/frutiserie.php>, acesso em 25/05/2004.
9. ANZALDO, F.E.; LUDAN, A. C.; CRUZ, R.Y.; MANALO, J. B.; LIAO, M. T. P.; QUILAO, S. S.; CORONEL, V. Q., *Philippine J. of Sci.*, **109** (1982) 9.
10. CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLÓRIA, M. B. A., *J. of Food Processing and Preservation*, **20** (1996) 487.
11. CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M., Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. *Ciência Rural*, **32/4** (2002) 657-661.

12. JAYALESHMY, A.; ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, C. S.; MATHEW, A. G.; Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. *Journal of Food Science and Technology*, India, **23/4** (1986) 203-207.
13. SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A., Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chemistry*, **57/2** (1996) 299-304.
14. KWON, K.; PARK, K.H.; RHEE, K. C.; Fractionation and characterization of proteins from Coconut (*Cocos nucifera*, L), *J. Agric. Food Chem.*, **44** (1996) 1741-1745.
15. DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water, *Cienc. Tecnol. Aliment.* **3/5** (2002) 266-270.
16. WHITAKER, J. R.; *Principles of Enzymology for food Sciences*, Marcel Dekker, New York, 1972.
17. ARAÚJO, M. A.; *Química de Alimentos, Teoria e Prática*. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, (1995), 247.
18. LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELO-FILHO, O.; Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*), *Quim. Nova*, **26/2** (2003) 197-201.
19. ROBINSON, D. S.; Peroxidases and catalases in foods In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M.; *Oxidative enzymes in foods*, Elsevier Applied Science, (1991), 1-45.
20. Haem peroxidases, disponível em <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/PEROXIDASES.html>, acesso em 27/01/2005.
21. BANCI, L., Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, **53** (1997), 253-263.
22. ABREU, F. A. P.; ROSA, M.F.; Água de coco – métodos de conservação. Disponível em : <http://www.embrapa.br> , acesso em 27/01/2005.
23. NAOZUKA, J., Estudo da influência de processos de conservação na distribuição de espécies em água de coco por espectrometria de absorção

- atômica. Dissertação de mestrado IQ/USP, 2004 – Processo FAPESP 02/05091-0.
24. GOYER, R. A.; KLAASSEN, C. D.; WAALKES, M. P., *Metal Toxicology*. Academic Press, San Diego, 1995.
25. SALMENPERÄ, L.; Detecting Subclinical Deficiency of Essential Trace Elements in Children with Special Reference to Zinc and Selenium. *Clin. Biochem.*, **30/2** (1997) 115.
26. MCDOWELL, L. R.; *Minerals in animals and human nutrition*. Academic Press, San Diego, 1992.
27. AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J., *Bioavailability of nutrients for animals*. Academic Press, San Diego, 1995.
28. KRULL; Trace metal analysis and speciation. *Journal of Chromatography Library*, **47** (1991), Elsevier, Amsterdam.
29. TEMPLETON, D.M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSON, L.G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H.P.; LOBINSKI, R.; Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Applied Chemistry*, **72** (2000) 1453-1470.
30. DE LA GUARDIA, M.; CERVERA, M.L.; MORALES-RUBIO, A.; Speciation studies by atomic spectroscopy. In: *Advances in Atomic Spectroscopy*, **5** (1999) 1-98, Jay Press Inc., New York, USA.
31. CORNELIS, R.; DE KIMPE, J. ZHANG, X., Trace elements in clinical samples revisited—speciation is knocking at the door. Sample preparation, separation of the species and measurements methods. *Spectrochim. Acta Part B*, **53** (1998) 187-196.
32. ABOLLINO, O.; ACETO, M.; BRUZZONITTI, M. C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; Speciation of copper and manganese in milk by solid-phase extraction/inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **375** (1998) 299-306.
33. CHRIS LE, X.; XIUFEN LU; LI XING- FANG; Arsenic Speciation, *Analytical Chemistry*, **1** (2004) 27-33A.
34. URE, A.M.; Chemical speciation in the environment, first edition, 1995.



35. GÓES, H. C. A.; TORRES, A.G., DANANGELO, C.M.; TRUGO, N.M.F.; Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on Zn distribution in milk fractions. *Nutrition*, **18** (2002) 590-594.
36. MARTINO, F.A.R.; SÁNCHEZ, M.L.F; MEDEL, A.S.; Multi-elemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **17** (2002) 1271-1277.
37. BERMEJO, P.; PEÑA, E.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; FRAGA, J.M.; COCHO, J.A., Speciation of iron in breast milk and infant formulas whey by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **50/6**, (2001), 1211.
38. BOCCA, B.; ALIMONTI, A.; CONI, E.; DI PASQUALE, M.; GIGLIO, L.; BOCCA, A.P.; CAROLI, S., Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, **53/2** (2000) 295-303.
39. CONI, E.; BOCCA, B.; GALOPPI, B.; ALIMONTI, A.; CAROLI, S., Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk. *Microchem. J.*, **67** (2000) 187-194.
40. LANGE-HESSE, K.; DUNEMANN, L.; SCHWEDT, G.; Properties and binding forms of cadmium and nickel in protein extracts from bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Fresenius J. Anal. Chem.*, **349** (1994) 460-464.
41. KOPLÍK, R.; BORKOVÁ, M.; MESTEK, O.; KOMÍNKOVÁ, J.; SUCHANEK, M.; Application of size-exclusion chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seed of legumes., *J. Chromatogr. B*, **775** (2002) 179-187.
42. KANNAMKUMARATH, S. S; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J. A.; HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Anal. Bioanal. Chem.*, **373** (2002) 454-460.
43. GÜÇER, S.; YASAR, S. B.; Fractionation analysis of magnesium in olive products by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **505**, (2004) 43-49.

44. KARADJOVA, I.; IZGI, B.; GÜÇER, S.; Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, **57** (2002) 581-590.
45. WEBER, G.; Speciation of tin in lemon juice: an example of trace metal speciation in food. *Anal. Chim. Acta*, **200** (1987) 79-88.
46. SHAN, T. C., Uso de microfrascos de digestão em forno microondas focalizadas como uma alternativa para preparação de amostras. Dissertação de Mestrado, IQ/USP, 2002.
47. CORREIA, P. R. M.; De Oliveira, E.; Oliveira, P. V., Simultaneous determination of manganese and selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **57/3** (2002) 527-525.
48. DA VEIGA, M. A. M. S., Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração por ponto nuvem, usando dietilditiofosfato como agente quelante. Tese de doutorado, Universidade Federal de Florianópolis Q.A., 2000.
49. WATANABE, H.; TANAKA, H., A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, **25** (1978) 585-589.
50. BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, **72** (1976) 248-254.
51. VOET, D.; VOET, J. G., Biochemistry, second edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995.
52. LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227** (1970) 680 -685.
53. BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J.; Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, (1987), 93-99.
54. SILVA, M.M.; ARRUDA, M. A. Z.; KRUG, F. J.; OLIVEIRA, P. V.; QUEIROZ, Z. F.; GALLEGRO, M.; VALCARCEL, M., On-line separation and preconcentration of cadmium, lead and nickel in a fullerene (C-60) minicolumn coupled to flow injection tungsten coil atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **368 /3** (1998), 255-263.

- 
55. BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L., Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *Journal of Chromatography A*, **975** (2001) 47-70.
  56. SKOOG; WEST; HOLLER; *Fundamental of Analytical Chemistry*, (1992), 6<sup>a</sup> ed, Saunders College Publishing.
  57. HARRIS, D. C.; *Quantitative chemical analysis*, (1995), 4<sup>a</sup> ed, W. H. Freeman and Company.