UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

GISLAYNE APARECIDA RODRIGUES KELMER

**Caracterização química elementar e proteica da
polpa de graviola**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/04/2012

GISLAYNE APARECIDA RODRIGUES KELMER

**Caracterização química elementar e proteica da
polpa de graviola**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Química)*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Caracterização química elementar e proteica da polpa de graviola”

**GISLAYNE APARECIDA RODRIGUES
KELMER**

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 Ciências - Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
(Orientador e Presidente)

Prof. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
IQ - USP

Prof. Dra. Juliana Nãozuka
UNIFESP - Diadema

SÃO PAULO
27 de abril de 2012

*Às pessoas que mais amo: meus pais Elza e
Gilberto, minha irmã Gisele e ao irmão que
Deus me permitiu escolher Delmárcio, por
terem me acompanhado, apoiado e sempre
incentivado.*

Dedico

*Ao Professor Dr. Pedro Vitoriano Oliveira
pela excelente orientação e por fazer deste
trabalho uma jornada prazerosa e de muito
aprendizado.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que surgiram em minha vida, pela proteção e força para enfrentar os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira, pela excelente orientação, dedicação, apoio, confiança, amizade e pela oportunidade de realizar a pós-graduação em seu laboratório.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade oferecida para realização desse trabalho.

Aos meus pais Elza e Gilberto pelo incentivo, amor, cuidado e por sempre me acolherem com tanto carinho em Juiz de Fora. A distância é grande, mas o amor de vocês me fortalece nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Gisele pela amizade e carinho.

Ao meu amigo/irmão Del Gomes, pessoa com a qual divido os meus momentos mais felizes em São Paulo. Agradeço pela amizade, amor, carinho, respeito, valiosos conselhos e também pelos “puxões de orelha”. Sem você São Paulo seria impossível. Te amo meu irmão!

A minha filha Amy (chow chow) por ser essa grande companheira, carinhosa e por fazer eu chegar em casa sempre sorrindo.

A todos os queridos amigos e companheiros que passaram pelo Laboratório de Espectrometria Aplicada (LEA): Angerson, Maciel, Daniel, Alexandre, Valeska, Fabinho, Alexandre Japa, Mariana, André, Isis, Karina, Luiza, Caio, Rosana, e Raquel pelo agradável convívio, amizade, chás, cafés e por todo apoio para realização deste trabalho. Muito obrigada!

Às Professoras Marina Franco Maggi Tavares e Célia Colli pelas essenciais contribuições no meu exame de qualificação.

Às queridas Professoras Cassiana Seimi Nomura e Juliana Naozuka pela amizade, conversas, cafés, ensinamentos e conselhos fundamentais no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos Professores do IQ-USP em especial ao Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, Prof. Dr. Mauro Bertotti, Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Prof. Dr. Jorge Cesar Masini, Prof. Dr. Lucio Angnes e Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago pelos ensinamentos nas disciplinas.

Aos Professores da Universidade Federal de Juiz de Fora pela valiosa contribuição na minha formação.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação: Cibele, Emiliano, Milton, Marcelo e Paulo. Às amigas Fátima e Fernanda da diretoria. E as queridas técnicas Luciana e Priscila, muito obrigada pela ajuda e por atender atenciosamente aos meus pedidos.

Aos amigos e familiares de Juiz de Fora que apesar da distância estão sempre torcendo por mim.

Às minhas queridas amigas Natália de Classe e Renata Cavaca pela amizade, baladas e por todo carinho ao me receber em Minas.

Aos amigos Rafael Rangel, George, Luciano, Isaac, Raphael Alvim, Diego Altino e Tarcísio pelos bons momentos, risadas e carinho.

Aos vizinhos e amigos que conheci em São Paulo: Ana, Joaquim, Sr. Dorival, Nice, Mary, Andréia e Cássio pelos bons momentos e conversas ao levar os cachorrinhos para passear.

Ao Dr. Leônidas Paixão Passos e Maria Coletta Vidigal pela amizade e incentivo no início da minha vida científica e a todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora.

À amiga Polly muito obrigada pelos conselhos, amizade, torcida e inúmeros bons momentos em São Paulo. Você é muito especial!

Aos amigos Sidnei, Vivian, Samara, Rodrigo e Maria pelos ótimos momentos, conversas, risadas e ajuda na realização do meu trabalho.

Aos amigos da graduação da turma de Química do 2º semestre de 2005 da UFJF, pela agradável convivência, estudos, almoços, churrascos e festas.

Aos Amigos do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN), Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (LSEME), Laboratório de Instrumentação e Automação Analítica (LAIA), Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural (LQISE) e Laboratório de Química Analítica Ambiental e Aplicada (LQAAA). Obrigada pelos favores, festas e agradáveis conversas no corredor.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

*“Os vencedores da batalha da vida são
homens perseverantes que, sem se julgarem
gênios, se convenceram de que só pelo
esforço e perseverança poderiam chegar ao
fim almejado.”*

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

Kelmer, G. A. R. **Caracterização química elementar e proteica da polpa de graviola**. 2012. 89p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No presente trabalho foram desenvolvidos métodos para a determinação de Al, B, Ba, Ca, Co, Cu, Cr, Fe, K, Li, Mg, Mn, P, S, Si, Sn, Sr, Ti, V e Zn por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e As, Cd, Pb e Se por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e detecção simultânea (SIMAAS) em polpa de graviola (*Annona muricata* L.). A determinação de proteínas bem como a estimativa da presença de Fe, Cu, Mn e Zn a elas associados também foram investigados. Para as determinações elementares foi utilizada polpa de graviola, seca em estufa a 50° C, digeridas com mistura oxidante diluída (2 mL HNO₃ + 1 mL H₂O₂ + 3 mL H₂O) e aquecimento em forno de micro-ondas com frasco fechado. A avaliação da exatidão dos métodos foi feita a partir da análise de material de referência certificado (Citrus Leaves SRM 1572, NIST) e os resultados concordaram, para maioria dos elementos, em 95% como intervalo de confiança, quando aplicado o teste *t-Student*. A polpa também foi submetida a diferentes pré-tratamentos: 1) secagem por liofilização e moagem em moinho criogênico; 2) homogeneização da polpa *in natura* em moinho de facas; e 3) secagem em estufa a 50 °C e moagem em almofariz e pistilo. Nessa etapa, o objetivo foi avaliar a influência dos procedimentos de pré-tratamento nas extrações de proteínas. Massas de amostra (~5 g), após extração lipídica, foram submetidas à agitação (1 h) com 0,5 mol L⁻¹ NaOH, tampão Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mol L⁻¹ HCl e tampão CO₃²⁻/HCO₃¹⁻ (pH 10) para extração de proteínas. Os extratos foram analisados por ICP OES para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn e proteínas pelo método de Bradford. Alíquotas dos extratos foram submetidas à etapa de limpeza (*clean up*) utilizando acetona em banho de gelo, 0,5 mol L⁻¹ HCl e 20% m v⁻¹ de TCA para precipitação de proteínas. Somente acetona em banho de gelo foi eficiente na precipitação das proteínas. Os precipitados foram redissolvidos em tampão Tris-HCl e submetidos a separação por cromatografia de exclusão por tamanho e detecção por espectrofotometria UV (SEC-UV), a 280 nm. As proteínas totais nas amostras foram estimadas por análise elementar (CHN) e, em solução, pelo método de Bradford. Independente da solução extratora utilizada, o processo de liofilização e moagem criogênica foi o que proporcionou maior quantidade de proteínas extraídas. Porém, após a precipitação com 80 % v v⁻¹ de acetona, maior quantidade de proteínas foram precipitadas da amostra *in natura*, indicando possíveis alterações durante a liofilização e secagem. Em todos os extratos submetidos a análises por SEC-UV foi observado maior quantidade de compostos de baixo peso molecular (< 6,5 kDa). Melhor eficiência de extração de proteínas e dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn foi observada na extração com NaOH. Maiores concentrações dos elementos extraídos foram encontradas nas amostras *in natura* e menores nas amostras secas em estufa com moagem em almofariz e pistilo.

Palavras-chave: graviola, análise elementar, proteínas, GF AAS, ICP OES, cromatografia

ABSTRACT

Kelmer, G. A. R. **Elemental and protein determinations in graviola pulp**. 2012. 89p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work methods for the determination of Al, B, Ba, Ca, Co, Cu, Cr, Fe, K, Li, Mg, Mn, P, S, Si, Sn, Sr, Ti, V and Zn by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and As, Cd, Pb e Se by simultaneous graphite furnace atomic absorption spectrometry (SIMAAS) in graviola pulp (*Annona Muricata* L.) were developed. The determination of proteins and the possible presence of Fe, Cu, Mn and Zn associated to them were also investigated. For elements determination, graviola pulp was dry in wood stove at 50°C and digested using diluted oxidant mixture (2 mL HNO₃ + 1 mL H₂O₂ + 3 mL H₂O) in closed-vessel microwave oven. The accuracy and precision of the methods were done by certified reference material analysis (Citrus Leaves SRM 1572, NIST), and the obtained results were in accordance at 95%, according *Student-t* test. The graviola pulp was also submitted to different pretreatments: 1) lyophilization and cryogenic grinding; 2) homogenization of the *in natura* sample in a knife mill; and 3) drying in wood stove at 50°C and grinding in a mortar. The objective of this step was to evaluate the influence of sample pretreatment on the protein extractions. After lipid extraction, sample masses (~5 g) were shaken (1 h) with 0.5 mol L⁻¹ NaOH, Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.5 mol L⁻¹ HCl and CO₃²⁻/HCO₃¹⁻ buffer (pH 10) for protein extraction. The extractants solutions were analyzed for Cu, Fe, Mn and Zn determinations by ICP OES and for protein determinations by Bradford method. A clean up step, using acetone in ice-bath, 0.5 mol L⁻¹ of HCl and 20% m v⁻¹ of TCA was used for protein precipitation. In this way, only acetone in ice-bath was efficient for precipitation. After that, precipitates were dissolved in Tris-HCl buffer and analyzed by size exclusion chromatography with UV detection (SEC-UV), at 280 nm. Total protein contents in the sample and in the extracting solutions were determined by elemental analysis (CHN) and Bradford method, respectively. For all extracting solutions, the lyophilization and cryogenic grinding procedure showed the best efficiency for proteins extraction. However, after precipitation with acetone 80 v v⁻¹, higher amount of proteins were observed for *in natura* sample, indicating some structure protein modification during the lyophilization or drying pretreatment steps. In general, low molecular weight compounds (< 6,5 kDa) were observed for all extracting solutions. The NaOH extractor showed much better efficiency for proteins and Cu, Fe, Mn and Zn extraction. Higher concentration of the extracting elements were found for *in natura* samples and lower for drying in wood stove at 50°C and grinding in a mortar.

Keywords: graviola, elemental analysis, proteins, GF AAS, ICP OES, chromatography

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica; *Atomic Absorption Spectrometry*

ATP - Adenosina trifosfato

CID - *Charge Injection Device*

EDL - Lâmpada de descarga sem eletrodo; *Electrodeless Discharge Lamp*

FAAS - Espectrometria de absorção atômica com chama, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*

HCL - Lâmpada de Cátodo Oco, *Hollow Cathode Lamp*

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

PFA – perfluoralcóxi

IDR - Ingestão Diária Recomendada

P.M. – Peso Molecular

PI – Ponto Isoelétrico

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho, *Size Exclusion Chromatography*

SIMAAS – Espectrometria de absorção atômica simultânea, *Simultaneous Atomic Absorption Spectrometry*

SRM – Material de Referência Certificado, *Standard Reference Material*

TACO – Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos

TCA – Ácido Tricloroacético

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Concentração de proteínas nos diferentes meios extratores. (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....63

Figura 2: Concentração de proteínas nos diferentes meios extratores, após precipitação. (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....67

Figura 3: Perfis cromatográficos do extrato de NaOH da amostra *in natura*. (1) antes da precipitação com acetona, (2) após precipitação com acetona.....71

Figura 4: Perfis cromatográficos do extrato de HCl empregando precipitação com acetona gelada: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....73

Figura 5: Perfis cromatográficos do extrato de NaOH empregando precipitação com acetona gelada: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....74

Figura 6: Perfis cromatográficos do extrato de tampão Tris-HCl (pH 7,0) empregando precipitação com acetona gelada: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....76

Figura 7: Perfis cromatográficos do extrato de tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ (pH 10,0) empregando precipitação com acetona gelada: (1) amostra liofilizada seguida de

moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições instrumentais para determinação de As, Cd, Pb e Se por SIMAAS.....	37
Tabela 2: Programa de aquecimento para digestão ácida das amostras de graviola e do material de referência certificado em forno de micro-ondas.....	41
Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite para determinação simultânea de As, Cd, Pb e Se.....	42
Tabela 4: Parâmetros instrumentais para operação do ICP OES.....	49
Tabela 5. Parâmetros das curvas analíticas de calibração.....	51
Tabela 6: Determinação dos elementos no material de referência certificado (SRM 1572).....	52
Tabela 7. Concentração dos elementos em polpa de graviola (n=3 amostras).....	55
Tabela 8. Teores de macronutrientes comparados a dados da literatura (mg 100g ⁻¹)	56
Tabela 9. Teores de alguns micronutrientes comparados a dados da literatura (mg 100g ⁻¹).....	56
Tabela 10. Valores de ingestão diária recomendada (IDR) de minerais (mg/dia ou µg/dia) para adultos e contribuição mineral para IDR (%) com relação a 100 g de polpa de graviola.....	57
Tabela 11. Parâmetros das curvas analíticas de calibração de As, Cd, Pb e Se.....	58
Tabela 12. Determinação de As, Cd, Pb e Se no material de referência certificado (n=2).....	59

Tabela 13. Determinação de As, Cd, Pb e Se na polpa de graviola e valores de recuperação (n=2 amostras).....	60
Tabela 14. Estimativa do teor de proteínas presentes nas amostras de polpa de graviola.....	61
Tabela 15. Concentração de proteínas presentes nos extratos de polpa de graviola <i>in natura</i>	62
Tabela 16. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn nos extratos de polpa de graviola submetidos aos diferentes pré-tratamentos de amostra.....	69

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1 Aspectos gerais sobre a graviola.....	21
1.2 Sobre os elementos de interesse nessa pesquisa.....	23
1.3 Métodos espectroscópicos empregados para determinações elementares....	27
1.4 Extração de proteínas.....	31
2. Objetivo.....	33
3. Parte experimental.....	34
3.1 Instrumentação.....	34
3.2 Reagentes.....	37
3.3 Amostra.....	39
3.4 Procedimento experimental.....	40
3.4.1 Pré-tratamento das amostras.....	40
3.4.2 Determinação dos elementos de interesse por ICP OES e GF AAS.....	40
3.4.3 Extração e precipitação de proteínas.....	43
3.4.4 Determinação de proteínas nas amostras e nos extratos.....	44
3.4.5 Determinação dos elementos nos extratos.....	45
3.4.6 Separação por SEC-UV.....	46
4. Resultados e discussões.....	48
4.1. Determinação da concentração total dos elementos.....	48
4.1.1. Determinação dos elementos de interesse por ICP OES.....	48
4.1.2. Determinação de As, Cd, Pb e Se por SIMAAS.....	56
4.2. Determinação da concentração total de proteínas na polpa de graviola e nos extratos.....	59
4.3. Determinação da concentração de proteínas após precipitação com acetona.....	64
4.4. Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn nos extratos de NaOH, HCl, tampão Tris-HCl e tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$	68
4.5. Separação cromatográfica dos extratos proteicos.....	70
4.5.1. Calibração da coluna cromatográfica.....	70
4.5.2. Perfil cromatográfico dos extratos de NaOH antes e após precipitação.....	70
4.5.3. Perfis cromatográficos após precipitação.....	71
5. Conclusões.....	78
6. Referências bibliográficas.....	80
Súmula Curricular.....	i

1. Introdução

Elementos metálicos, metalóides e não metálicos, em diversas formas químicas, estão presentes nos sistemas biológicos e desempenham importantes papéis na manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos (SPAZIANI *et al.*, 2006; IYENGAR; SUBRAMANIAN; WOITTIEZ, 1997). Em torno de 25 elementos são reconhecidos como essenciais ao organismo humano, podendo ser divididos em duas categorias: a primeira engloba os elementos presentes em concentrações elevadas como C, H, N, O, P, Ca, S, Cl, K, Mg e Na, e a segunda envolve os que estão presentes em baixas concentrações (menos de 7 g em um indivíduo de 70 kg), tais como Fe, I, Zn, Se, Mn, Cu, Cr, Mo, Co, Ni, F, Sn, Si, e V e, por isso, são denominados elementos traços (WALRAVENS, 1980; PATRIARCA *et al.*, 1998; FÁVARO *et al.*, 2000). A maioria desses elementos são co-fatores de enzimas que participam de importantes eventos biológicos, tais como o transporte de oxigênio, o combate à formação de radicais livres, a organização estrutural de macromoléculas e a atividade hormonal (DIPLOCK, 1991; PATRIARCA *et al.*, 1998).

Em contraste com o papel benéfico atribuído aos elementos essenciais, existem elementos que são potencialmente tóxicos mesmo em doses muito baixas, dentre os quais podem ser destacados o Al, As, Cd, Hg e Pb. No geral, esses elementos, afetam negativamente vários processos metabólicos e, quando presentes em concentrações relativamente altas, podem causar danos irreversíveis e até levar a morte do indivíduo (MENEZES, 2010).

Entretanto, a carência, a essencialidade e a toxicidade de um elemento dependem da quantidade que é ingerido, das espécies químicas em que o mesmo está presente nas fontes naturais (alimentos, água, etc.) e da sua biodisponibilidade para o organismo humano (NAOZUKA, 2008). Atualmente não é usual falar de

elementos tóxicos, mas de quantidades e concentrações tóxicas. Em geral, para muitos elementos, cujos níveis de concentrações considerados essenciais para o organismo estão em níveis de traços, os intervalos de concentrações que determinam a essencialidade são muito estreitos, com implicações graves quando não são respeitados, seja para mais ou para menos. Concentrações abaixo daquelas consideradas ótimas para o bom funcionamento do organismo podem causar síndromes de deficiência e até a morte. O mesmo pode ser observado quando os limites de essencialidade são ultrapassados, as elevadas concentrações podem expressar efeitos tóxicos e também levar o indivíduo a morte (IYENGAR; SUBRAMANIAN; WOITTEZ, 1998; GOYER; KLAASSEN; WAALKERS, 1995)

Identificar, conhecer o comportamento, as funções e o papel desempenhado pelos elementos em termos de essencialidade e toxicidade tem sido de interesse em várias áreas da ciência, como a bioquímica, nutrição, química, etc. Esse interesse foi ampliado com o avanço nos estudos relacionados com a metalômica, que tem como objetivo conhecer melhor o papel dos metais em sistemas biológicos ao identificar espécies e determinar concentrações de metais em proteínas ou fragmentos de DNA. Esse tipo de estudo é importante, pois sabe-se que os íons metálicos ou metaloenzimas estão relacionados com a síntese e funções metabólicas dos genes e das proteínas, atuando como catalisadores na regulação das reações biológicas e das funções fisiológicas em células e órgãos (HARAGUCHI, 2004).

O conjunto de biomoléculas que inclui as metaloproteínas e as metaloenzimas que se ligam ou interagem com metais numa célula, tecido ou organismo, faz parte da metalômica, termo utilizado para nomear a ciência que estuda metais ou semimetais presentes em um sistema biológico, tendo como objetivo verificar a distribuição dessas espécies e elucidar os aspectos fisiológicos e funcionais das

biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas. Estima-se que cerca de 40% de todas as proteínas e enzimas contenham íons metálicos em suas estruturas. (HARAGUCHI, 2004; SZPUNAR, 2004; SZPUNAR, 2005; GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; BETTMER, 2005).

A principal fonte de elementos essenciais, não-essenciais e potencialmente tóxicos para o nosso organismo são os alimentos. Por isso, conhecer a composição química elementar dos alimentos é importante porque nos traz informações sobre o valor nutricional, os quais podem ser utilizados para calcular os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR), à presença ou não de elementos tóxicos, oriundos de contaminação durante o cultivo, preparo e armazenamento e, em alguns casos, à origem geográfica, importante para garantir padrões de qualidade e rastreabilidade (MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998).

Além das informações sobre concentração total, o conhecimento das formas químicas em que os elementos podem estar inseridos nos alimentos e sua distribuição podem ser importantes para auxiliar em estudos de nutrição, para avaliar biodisponibilidade, estimar absorção e, eventualmente, os riscos que podem ser causados para a saúde pela ingestão dos mesmos. Exemplos que podem ser citados são os diversos estudos realizados, nos últimos anos, para identificar espécies de selênio em castanha-do-pará (THOMSON *et al.*, 2008; CHUNHIENG *et al.*, 2004; VONDERHEIED *et al.*, 2002). Certamente, há descobertas para serem feitas, mas o que se sabe hoje sobre o selênio em castanha-do-pará permitiu um outro grau de valor nutricional e, conseqüentemente, econômico a esse alimento.

1.1 Aspectos gerais sobre a graviola

Em geral, frutos e castanhas, usados como alimentos, são ricos em gorduras insaturadas e em diversos outros constituintes tais como proteínas, fibras, esteróis e fitoquímicos, compostos orgânicos e elementos essenciais e não-essenciais (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2001; VALLILO *et al.*, 1999; RODUSHKIN *et al.*, 2008). Muitas castanhas e frutos do vasto território brasileiro, principalmente aquelas provenientes das regiões norte e nordeste, estão sendo comercializadas, se tornando cada vez mais populares e consumidas de várias formas. Algumas têm despertado o interesse da comunidade científica, devido às altas concentrações de elementos essenciais em sua composição. Porém, muitas dessas castanhas e frutos ainda não têm composição química inorgânica bem conhecida para vários elementos. Estas informações são importantes não só para a obtenção de tabelas de composição química (FILHO *et al.*, 2011) ou para auxiliar no balanço das dietas alimentares regionais, mas também para que se possa agregar valor comercial a esses produtos. Exemplos desses alimentos, que despertam interesse devido às características acima reportadas são: açaí, cupuaçu, graviola, castanha de caju, coco e mesocarpo de babaçu, sapucaia, entre outros (SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009).

A graviola (*Annona muricata*, L.), da família Annonaceae, de interesse nessa pesquisa, pertence ao gênero *Annona* que é o mais conhecido dessa família por ser uma importante fonte de frutos comestíveis. É uma frutífera originada de regiões tropicais da América do Sul e América Central. O principal cultivo ocorre nos estados do nordeste brasileiro, principalmente, Paraíba, Ceará, Pernambuco, Alagoas e Bahia, e no sudeste, Minas Gerais (JOSÉ, 2003). Seu fruto apresenta casca verde-

escura, polpa branca e aromática. Apresentam numerosas sementes negras ou marrons envoltas pela polpa. Tem se destacado por apresentar ótimo potencial de comercialização no mercado nacional e com grandes perspectivas para exportação.

A demanda pelos frutos é crescente e pode ser atribuída às suas qualidades organolépticas, que possibilitam a sua utilização tanto para consumo *in natura* quanto para aproveitamento pela agroindústria, visando obtenção de polpa, suco, néctar, etc., e ainda na forma de sorvetes, compotas, geléias, cremes, sucos e iogurtes (JOSÉ, 2003; SACRAMENTO *et al.*, 2003; VIÉGAS; FRAZÃO, 2004)

Do ponto de vista fitoquímico, já foram encontrados em plantas deste gênero, alcaloides, amidas, dipertenos, esteroides, flavonoides, acetogeninas e substâncias neurotóxicas (AUGUSTO *et al.*, 2000 ; MOHANTY *et al.*, 2008). Dentre essas classes de compostos tem destaque os chamados de acetogeninas de anoáceas. O interesse por esse grupo vem crescendo devido a variedade de ações biológicas encontradas, tais como atividades citotóxica, antiparasitárias e pesticida (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999).

É amplamente utilizada em medicina popular e suas preparações são indicadas para diversos fins como abscesso, anti-parasitas, asma, hipertensão, calmante e antitumoral, sendo comercializadas sob diversas formas farmacêuticas (pós, líquidos e capsulas) (LIMA, 2007). Há certo exagero nas informações a respeito do poder da graviola na cura de alguns tipos de câncer. Porém, há estudos sendo feitos no sentido de decifrar o que mito e o que é realidade nesse contexto (DAI *et al.*, 2011; CASSILETH, 2008).

Embora já se conheçam alguns componentes orgânicos importantes, pouco se sabe a respeito da composição química elementar da graviola. Estima-se que 100 g da polpa contenha 62 kcal, 15,8 g de carboidratos, 0,8 g de proteínas, 0,2 g de

lipídeos, além de Ca (40 mg), Fe (0,2 mg), P (19 mg), Mg (23 mg), Zn (0,1 mg), Mn (0,08 mg), Cu (0,04 mg), K (250 mg) e Na (4 mg) (FILHO *et al.*, 2011)

1.2 Sobre os elementos de interesse nessa pesquisa

Dentre os elementos de interesse nessa pesquisa, destacam-se os metais de transição como o Cu, Fe, Mn e Zn. Esses elementos, presentes em baixas concentrações nos alimentos, tem como características o pequeno raio atômico, densidade e seus íons apresentam fortes interações eletrostáticas e, por esse motivo, podem apresentar interações extremamente fortes com as proteínas, constituindo assim as metaloproteínas, que são uma possível fonte de incorporação dos elementos no organismo humano (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; SZPUNAR, 2005; NAOZUKA, 2008).

O cobre é componente de várias enzimas com atividade de oxidação e redução, sendo também essencial para absorção do ferro. A acumulação de cobre no fígado e em outros órgãos pode levar a doença de Wilson. Sua deficiência pode causar anemia, retardo mental e osteoporose (PATRIARCA *et al.*, 1998).

O ferro é constituinte da hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio. Sua deficiência é a principal causa da anemia. O excesso no organismo pode causar hemocromatose, acumulando-se principalmente no fígado, pâncreas e coração e prejudicando o funcionamento desses órgãos (NAOZUKA, 2008; COZZOLINO, 2007).

O manganês é ativador metálico das enzimas envolvidas na síntese de mucopolissacarídeos e glicoproteínas que contribuem na formação da matriz orgânica dos ossos. Compõe a enzima superóxido dismutase que tem ação

antioxidante. A deficiência pode afetar o combate a radicais livres e ocasionar osteoporose (BRITO *et al.*, 2006).

O zinco é constituinte de mais de 100 enzimas, sua deficiência pode causar distúrbios de crescimento ou perda de peso, diarreia, anormalidades na formação óssea e lesões na pele. Quando presente em altas concentrações pode interferir em processos metalo-dependentes ou inibir proteínas, além de afetar intestino, rins e fígado (MAFRA; COZZOLINO, 2004; PATRIARCA *et al.*, 1998).

Os outros elementos essenciais de interesse nessa pesquisa, também desempenham funções específicas no organismo humano. O fósforo é encontrado principalmente nos ossos e nos dentes. Sua deficiência pode causar hipofosfatemia (baixos níveis de fosfato no sangue) que acarreta diminuição da síntese de Adenosina trifosfato (ATP) e do teor de oxigênio nos vários tecidos corporais provocando sensação de mal-estar como náuseas e vômitos. Como 70% do fósforo ingerido na dieta é excretado na urina, um mau funcionamento renal aliado à ingestão excessiva, podem levar a graves desequilíbrios de eletrólitos podendo ocasionar até a morte do indivíduo (ESTELA; CERDÀ, 2005; NETO, 2006).

A maior parte do cálcio presente no organismo encontra-se nos ossos. Várias metaloenzimas e proteínas de coagulação do sangue contêm cálcio, sendo assim essencial para várias funções metabólicas. É importante na contração muscular, secreção de hormônios e neurotransmissores, adesão celular e função de proteínas do citoesqueleto. Sua deficiência pode causar osteoporose, hipertensão e raquitismo e o excesso pode provocar problemas renais (FAIRWEATHER-TAIT; HURRELL, 1996; COZZOLINO, 2007).

O enxofre é encontrado em proteínas ricas nos aminoácidos metionina, cistina e cisteína exercendo funções estruturais e reguladoras. Os sítios catalíticos de

várias enzimas e co-enzimas, tais como urease e coenzima A, contêm enxofre. Faz parte dos glicosaminoglicanos que são fundamentais na constituição das cartilagens, das secreções mucosas, do humor vítreo e do fluido sinovial (KINUPP; BARROS, 2008; FIORINI, 2008).

O potássio exerce importante papel na manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio hídrico e ácido-básico no interior do organismo. Pequenas alterações em sua concentração extracelular pode afetar a transmissão neural, a contração muscular e o tônus vascular. A deficiência de potássio pode causar doenças cardiovasculares e vasculares cerebrais. O consumo em excesso pode contribuir para o aumento da pressão arterial, porém o consumo via alimento, não oferece riscos a uma população com função renal normal, pois é prontamente excretado na urina (COZZOLINO, 2007).

O magnésio é necessário para o metabolismo energético e está envolvido na síntese protéica. Participa de mais de cem sistemas enzimáticos. Uma de suas funções principais é mediar o processo de catálise para as reações com fosfato e produção de ATP. Os processos fisiológicos da contração muscular e da coagulação sanguínea também são dependentes da presença desse elemento (BUENO, 2008).

O selênio compõe a enzima glutathione peroxidase a qual protege contra doenças oxidativas ocasionadas pela presença de radicais livres, além de formar numerosas selenoproteínas e participar do sistema imunológico e reprodutor. Sua deficiência é associada às doenças de Kashin-Beck (osteoartropatia endêmica), e de Keshan (cardiomiopatia endêmica). A toxicidade afeta unhas, cabelos, possivelmente dentes, pele, trato intestinal e sistema nervoso. Espécies inorgânicas desse elemento são mais tóxicas que as orgânicas (COZZOLINO, 2007; NAOZUKA, 2008).

O cromo tem papel importante na manutenção da normalidade na tolerância à glicose e sua deficiência prejudica a utilização desse monossacarídeo pelo organismo. A toxicidade desse elemento varia com seu estado de oxidação. Apenas a forma trivalente, que apresenta baixo grau de toxicidade, é encontrada nos alimentos (COZZOLINO, 2007).

O cobalto faz parte da molécula da vitamina B₁₂ (Cobalamina) que é um co-fator das enzimas necessárias para o metabolismo de lipídeos, síntese do ácido nucleico e reações de metilação do organismo. A carência desta vitamina pode levar a anemia megaloblástica e neuropatia. A toxicidade está relacionada a exposição ocupacional a diferentes compostos desse elemento, envolvendo principalmente o trato respiratório, pele, sistema cardíaco e glândula tireoide (ALVES; ROSA, 2003; COZZOLINO, 2007).

O estanho e seus compostos entram no organismo principalmente, por inalação ou ingestão. É um constituinte iônico da gastrina, hormônio que é liberado do estômago na corrente sanguínea. Na sua ausência há prejuízos na digestão e crescimento. Apresenta conhecido potencial de oxirredução e é um potente indutor da enzima heme oxigenase. Compostos organoestanhosos presentes no organismo podem levar a uma série de reações como a degradação enzimática (RÜDEL, 2003; AZEVEDO, 2009).

O silício é um elemento necessário para formação da cartilagem óssea e do colágeno do tecido conjuntivo. Elevadas concentrações de silício podem causar problemas nos pulmões e nos rins. Níveis elevados de compostos de silício na água potável pode conduzir a um aumento na frequência de aborto espontâneo (LUGOWSKI *et al.*, 1998).

O vanádio representa um elemento essencial para o normal crescimento das células. É co-fator das enzimas adenilciclase e das transaminases. Tem ação sobre a contração das fibras musculares cardíacas, metabolismo dos glicídios e lipídeos e regulação da bomba de sódio. A exposição industrial e ambiental a altos níveis desse elemento tem efeitos tóxicos, pode provocar opressão dos vasos, degeneração do fígado, hemorragia nos pulmões e insuficiência respiratória (FIORINI, 2008; SILVA, 2008).

1.3 Métodos espectroscópicos empregados para determinações elementares

Técnicas espectroanalíticas são amplamente empregadas nas determinações elementares em alimentos. Entre as quais destacam-se a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS), em chama (F AAS) ou geração de hidretos (HG AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). Dos aspectos gerais relacionados a essas técnicas merecem destaques a sensibilidade, excelente para ICP-MS, GF AAS e HG AAS, porém piores para FAAS e ICP OES. Devido a sua característica multielementar, ICP OES e ICP-MS possuem as maiores frequências analíticas, com capacidade para determinações de até 40 elementos simultaneamente (LAJUNEN; PERAMAKI, 2004).

No ICP-MS, o plasma é utilizado como fonte de ionização e os íons formados são introduzidos no analisador de massas onde são separados de acordo com a razão massa-carga e detectados. A faixa de concentração alcançada está na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Produz espectros simples e fáceis de interpretar e a maioria dos

elementos podem ser detectados em níveis abaixo de partes por bilhão. Pode ser empregado em determinação isotópica, que pode ser útil em aplicações ambientais e como técnica absoluta. A modernização dos instrumentos comercializados hoje, com células de reação e colisão dinâmicas, tem gerado melhores resultados analíticos com menor interferência isobárica (MONTASER, 1998).

F AAS é um dos métodos mais utilizados para análise de elementos individualmente em amostras. A faixa de concentração alcançada é de mg L^{-1} . Por outro lado, em GF AAS pode-se atingir níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Uma das limitações da AAS é a sua natureza monoelementar. F AAS é um método simples, com curto tempo de análise e de baixo custo em comparação a outros detectores, tais como espectrômetros de massa, e está disponível na maioria dos laboratórios, porém em geral requer volumes relativamente elevados de amostra. HG AAS é uma das técnicas mais usadas para derivatização de elementos voláteis, permite a separação e pré-concentração de elementos que formam hidretos voláteis. GF AAS fornece maior sensibilidade e seletividade, emprega menor volume de amostra se comparada com F AAS. Além disso, a possibilidade de realizar o pré- tratamento térmico *in situ* durante a etapa de pirólise é uma das características mais importantes do GF AAS que permite a eliminação dos concomitantes inorgânicos e orgânicos durante o programa de aquecimento. Devido a estas características, na maioria dos casos é possível introduzir amostras sem qualquer pré-tratamento (SKOOG *et al.*, 2007; WELZ; SPERLING, 1999; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2006).

A espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite e detecção simultânea (SIMAAS) permite monitorar simultaneamente até 6 elementos em nível de traços e ultratraços, essa característica somadas às vantagens do GF AAS proporciona redução nos custos das análises e aumento na frequência analítica

em comparação às técnicas monoelementares (CORREIA; NOMURA; OLIVEIRA, 2003).

Na ICP OES, a fonte que fornece energia para atomização, ionização e excitação de átomos e íons é o plasma. A intensidade da radiação emitida, em comprimentos de onda específicos, é proporcional a concentração do analito de interesse. A faixa de concentração detectada está na ordem de mg L^{-1} e o grande atrativo desta técnica é a capacidade multielementar e, para maioria dos equipamentos atuais, simultânea. A atomização ocorre em um ambiente quimicamente inerte e em temperaturas muito altas (entre 6000K e 10000K), possibilitando maior eficiência de atomização, ionização e excitação. Além disso, interferências químicas ou de ionização são pequenas ou inexistentes. Uma desvantagem é a pouca tolerância a solventes orgânicos (MANNING; GROW, 1997; MONTASER; GOLIGHTLY, 1992).

Na determinação instrumental a amostra deve ser convertida em uma forma adequada para que as espécies químicas de interesse sejam determinadas. O procedimento a ser adotado depende da matriz e do analito a ser determinado. Em geral, análises envolvendo alimentos requerem pré-tratamentos que podem envolver processos de digestão, pré-concentração de traços e remoção de interferentes. Dentro da sequência analítica a etapa de preparo de amostra é a que requer maior quantidade de tempo além de ser uma fonte de erros sistemáticos. Portanto é desejável que nessa etapa sejam minimizadas as perdas de analito e contaminação, através da redução de manipulação da amostra (BULDINI; RICCI; SHARMA, 2002; KRUG, 2010).

A maioria das técnicas analíticas utilizadas para determinações elementares requer que a amostra esteja na forma de solução aquosa, de modo que os

elementos de interesse estejam em uma forma inorgânica livre. Em geral, esse processo envolve digestão com uso de ácidos que podem estar sozinhos ou combinados entre si e com H_2O_2 . O HNO_3 é o agente oxidante mais comumente usado na digestão de amostras orgânicas por ser de simples manipulação, facilmente purificado e apresentar elevada capacidade oxidativa, sobretudo a altas pressões (ARAÚJO *et al.*, 2002). Nesse processo, ocorre oxidação da matriz orgânica convertendo-a em CO_2 e H_2O , os compostos nitrogenados em NO_x e os elementos em nitratos solúveis (KRUG, 2010).

Procedimentos que envolvem o emprego de ácidos diluídos no preparo de amostras por digestão em sistemas fechados têm sido aplicados devido aos menores valores de brancos gerados, conseqüentemente, melhorando os limites de detecção, à redução de custos e menor geração de resíduos, bem como proporcionam maior segurança ao analista (ARAÚJO *et al.*, 2002; NAOZUKA *et al.*, 2011).

Com o objetivo de determinar simultaneamente metais, metalóides e não-metais em diferentes castanhas por ICP OES, Oliveira e colaboradores empregaram digestão ácida assistida por micro-ondas com frasco fechado e mistura oxidante diluída (2mL HNO_3 + 1mL H_2O_2 + 3mL de H_2O). Após a digestão, o teor de carbono residual foi determinado e os percentuais obtidos para soluções digeridas variaram de 4,9% m/m a 13,4% m/m. Esses baixos teores confirmam a alta eficiência do método de digestão proposto (NAOZUKA *et al.*, 2011).

1.4 Extração de proteínas

Considerando os procedimentos de preparo de amostra que visam melhores condições de extração/solubilização de proteínas, deve-se levar em consideração suas solubilidades que dependem da composição em aminoácidos. Esta composição está relacionada aos tipos de aminoácidos que se agrupam para formar a molécula (aminoácidos ácidos ou básicos), bem como de partes não proteicas como lipídeos, carboidratos e fosfatos. A solubilidade pode ser alterada por influência de uma série de fatores tais como pH, temperatura, constante dielétrica do solvente e concentração de sais dissolvidos (SGARBIERI, 1996).

O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas das proteínas. Em geral as proteínas são mais solúveis em pHs baixos por causa do excesso de cargas positivas (protonação dos grupos amino) e em pHs elevados devido ao excesso de cargas negativas (grupos carboxílicos ionizados). O excesso de cargas do mesmo sinal produz repulsão entre as moléculas e, conseqüentemente, contribui para o aumento da solubilidade. Em um pH particular, denominado ponto isoelétrico (pI), a proteína terá carga líquida nula (mesmo número de cargas positivas e negativas), favorecendo a aproximação e agregação das moléculas levando à precipitação. Para um grande número de proteínas o pI está entre pHs 3,5 e 6,5 (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; MACHADO *et al.*, 2007).

A concentração de sais, que afeta diretamente a força iônica do meio, também pode afetar as interações eletrostáticas entre as macromoléculas. Em baixas concentrações de sais, a solubilidade de muitas proteínas tende a aumentar, pois íons em solução interagem com as proteínas contribuindo para uma maior hidratação (efeito *salting in*). Caso contrário, em elevadas concentrações de sais, há

perda de água de hidratação das moléculas proteicas para os íons salinos, acarretando atração mútua entre as moléculas e formação de precipitado (efeito *salting out*) (SGARBIERI, 1996).

Em estudo realizado por Machado e colaboradores, foi avaliado o efeito do pH e concentração salina sobre a solubilidade de proteína de ovo branco utilizando diferentes sais. Foi verificado que a solubilidade foi maior em pH alto em comparação com pH baixo, independente do sal utilizado. A menor solubilidade foi observada próximo ao pH 4,5, que é o ponto isoelétrico da ovoalbumina, principal componente da clara de ovo. Em pH 9,0 na presença de Na_2SO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi observada redução da solubilidade da proteína com aumento de teor do sal, consequência do efeito *salting out* (MACHADO *et al.*, 2007).

2. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi a caracterização elementar e proteica da polpa de graviola (*Annona muricata*, L), a partir das determinações de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, K, Li, Mg, Mn, P, Pb, S, Se, Si, Sn, Sr, Ti, V e Zn, da concentração de proteínas e investigação da presença de Fe, Cu, Mn e Zn a elas associadas.

3. Parte experimental

3.1 Instrumentação

Um moinho de facas Grindomix GM 200 (Retsch, Haan, Alemanha) foi utilizado para homogeneizar as amostras de polpa de graviola durante um intervalo de tempo de 5 minutos. Depois de homogeneizadas, as amostras foram separadas em quatro frações. Uma das frações foi usada para testes *in natura*, duas outras para secagem em estufa e liofilização e outra congelada, a -5°C, para eventuais testes posteriores.

Uma estufa, modelo Q317M32 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil), mantida a 50°C, foi usada para secagem até a amostra atingir massa constante. Em seguida, a moagem dessa amostra, seca em estufa, foi efetuada com almofariz e pistilo.

A liofilização foi realizada em um Liofilizador E – C Micro Módulo (Thermo, Alemanha). As amostras liofilizadas foram submetidas a moagem em um moinho criogênico modelo MA 775 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), constituído com frascos de policarbonato e tampas e barra magnética de aço inoxidável.

Para pesagem das amostras, foi utilizada uma balança da marca Ohaus Adventurer – Balanças Analíticas de Precisão (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão analítica de até 0,0001g.

Uma mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) e uma centrífuga para tubos, modelo Q222TM (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) foram utilizadas no procedimento de separação da fração lipídica bem como na extração de proteínas e separação dos precipitados protéicos.

A separação entre soluções extratoras e resíduos foi realizada por filtração com um sistema a vácuo utilizando membrana de éster de celulose de 0,45 µm de porosidade (Millipore – Brasil).

Um espectrofotômetro de absorção molecular UV-visível, modelo 700 S (Fento, São Paulo, Brasil) foi utilizado para determinação da concentração total de proteínas nas soluções extratoras.

A concentração total de proteínas também foi determinada, indiretamente, a partir da análise de nitrogênio total, realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, empregando um analisador elementar CHNS modelo 2400 (Perkin Elmer Norwalk, CT, USA).

A digestão das amostras de polpa de graviola e material de referência certificado (Citrus Leaves, SRM 1572, NIST, USA) foi realizada em forno de micro-ondas de alta pressão, com cavidade, modelo Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Áustria), equipado com 16 frascos de teflon PFA[®] (perfluoralcóxi), sistema de monitoramento de pressão e de temperatura no vaso de referência e controle individual da temperatura dos frascos durante o programa de aquecimento.

As amostras digeridas foram analisadas por um ICP OES (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Inglaterra), modelo iCAP 6300 Duo, com vista axial e radial, detector simultâneo CID (Charge Injection Device), ótica purgada com argônio, que permite um intervalo de trabalho de 166,25 a 847,0 nm, com 383 mm de distância focal, policromador Echelle com 52,91 linhas/mm e fonte de rádio-frequência de 27,12 MHz, que permite ajuste da potência aplicada de 750 a 1350 W. O gás utilizado para purgar a óptica e formar o plasma foi argônio 99,998% v v⁻¹ (Oxilúmen, São Paulo, SP). O sistema de introdução utilizado foi um nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tocha de quartzo do tipo desmontável com

diâmetro do canal central de 2,0 mm. Nesse aparelho, a amostra é bombeada para a câmara de expansão, passando pelo nebulizador, com uma bomba peristáltica acoplada ao equipamento e seu fluxo é controlado pelo programa (iTeva - Thermo Scientific).

As determinações de As, Cd, Pb e Se nas amostras digeridas foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização em forno de grafite e detecção simultânea, modelo SIMAA 6000 (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), com sistema de corretor de fundo longitudinal baseado no efeito Zeeman, sistema óptico de separação da radiação constituído de um prisma e uma rede Echelle, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada, aquecimento transversal e detectores de estado sólido, constituído de um arranjo contendo 60 fotodiodos. As soluções são dispensadas no tubo de grafite por meio do amostrador automático, modelo AS – 72, do mesmo fabricante. Os parâmetros instrumentais adotados para a determinação simultânea estão apresentados na Tabela 1. Todas as medidas foram baseadas em valores de absorbância integrada.

Tabela 1: Condições instrumentais para determinação de As, Cd, Pb e Se por SIMAAS.

Elemento	λ (nm)	Lâmpada	I (mA)	Resolução Espectral (nm)
As	193,7	EDL	380	0,7
Cd	228,8	EDL	200	0,7
Pb	283,3	HCL	10	0,7
Se	196,0	EDL	290	0,7

HCL=Hollow Cathode Lamp (Lâmpada de cátodo oco); EDL=Electrodeless Discharge Lamp (Lâmpada de descarga sem eletrodo)

Um cromatógrafo modelo CBM – 20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com desgaseificador (DGU – 20A3), duas bombas de pistão (LC – 6 AD), coletor de frações (FRC – 10A), contendo 110 posições e detector UV (SPD – 20A) foi utilizado para separação de compostos, segundo seus pesos moleculares. A injeção da amostra foi realizada com uma microseringa (Hamilton Company, Nevada, EUA) com capacidade para 250 μ L, sendo esta inserida diretamente em uma alça de amostragem de 100 μ L localizada na parte lateral do equipamento. A coluna utilizada foi a Superdex 75 10/300 GL com faixa de separação entre 3-75 kDa e volume de 25 mL (Amersham Biosciences).

3.2 Reagentes

Toda a vidraria e recipientes para a armazenagem de soluções foram lavadas com detergente neutro, enxaguados com água destilada, posteriormente, imersos, durante 24 horas, em solução de HNO_3 10% v v⁻¹.

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água deionizada em sistemas de ultrapurificação Milli Q (Milipore, Bedford, MA, EUA), permitindo obter água com elevado grau de pureza (18,2 MΩ cm).

Soluções estoque em concentrações de 1000 mg L⁻¹ de alumínio (AlCl₃), arsênio (As₂O₅), bário (BaCl₂), cálcio (CaCl₂), cádmio (CdCl₂), chumbo (Pb(NO₃)₂), cobalto (CoCl₂), cobre (CuCl₂), estanho (SnCl₄), estrôncio (Sr(NO₃)₂), ferro (FeCl₃), lítio (LiNO₃), magnésio (MgCl₂), manganês (MnCl₂), potássio (KCl), selênio (SeO₂), silício (SiO₂), titânio (TiCl₃), vanádio (VOSO₄), zinco (ZnCl₂) todas Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha), boro (H₃BO₃) (SpecSol Quimlab, São Paulo, Brasil) e fósforo (H₃PO₄) e enxofre (H₂SO₄) Fluka (Sigma Aldrich, Saint Louis, E.U.A) foram utilizadas para a preparação das soluções analíticas de referência, após diluições adequadas em meio de 0,1 % v v⁻¹ de HNO₃.

Soluções de Na₂WO₄.2H₂O (Merck, Darmstadt, Alemanha) e RhCl₃ (Sigma-Aldrich) foram utilizadas para preparar o modificador químico.

A extração da fase lipídica das amostras de polpa de graviola foi realizada com mistura contendo clorofórmio e metanol, ambos da Merck.

Hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, etanol, tampão Tris-HCl, preparado a partir de tris-(hidroximetil)-aminometano, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, todos da Merck, foram utilizados para extração de proteínas.

Ácido clorídrico, ácido tricloroacético e acetona da Merck foram utilizados para os ensaios de precipitação das proteínas.

Para a digestão da amostra e do material de referência certificado foram utilizados HNO₃ e H₂O₂, ambos da Merck.

A concentração total das proteínas foi determinada utilizando o reagente de Bradford, contendo o corante Comassie Blue Brilliant Blue G-250 (Bio Agency, São

Paulo, Brasil) em meio de metanol e ácido fosfórico 85% v v⁻¹, ambos da Merck. A calibração do espectrofotômetro foi realizada com soluções analíticas de referência, preparadas por meio de diluições sucessivas de uma solução padrão de Albumina de Soro Bovino (Sigma-Aldrich).

Para calibração da coluna Superdex 75, visando a determinação dos pesos moleculares das espécies separadas, foi utilizada uma mistura de aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e conalbumina (75 kDa) (GE Healthcare, Piscataway, USA).

Solução de 1,0 mg mL⁻¹ de Blue dextran 2000 (GE Healthcare, Piscataway, USA) foi usada para obtenção do volume morto da coluna (V₀).

A fase móvel foi preparada a partir de 0,2 mol L⁻¹ de tris-(hidroximetil)-aminometano e HCl até pH = 7,5.

3.3 Amostra

Polpa de graviola, cujos frutos foram adquiridos no Mercado Municipal de São Paulo e tendo origem confirmada pelo vendedor como sendo do nordeste do Brasil (estado da Bahia), foram empregadas para estudo dos métodos e análises.

Para avaliar a exatidão do método proposto para a determinação dos elementos foi utilizado um material de referência certificado (SRM) de folhas, Citrus Leaves, SRM 1572 da National Institute of Standards and Technology, USA.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Pré-tratamento das amostras

Amostras de graviola foram lavadas com água de torneira e destilada, retirada a casca e separada a polpa das sementes com faca de material plástico. A casca e sementes foram descartadas. A polpa foi homogeneizada em moinho de facas por, aproximadamente, 5 minutos. Após essa etapa, uma parte foi seca em estufa, uma segunda parte foi seca por liofilização, outra parte da amostra *in natura* foi submetida às extrações para determinação das proteínas e uma quarta parte guardada sob refrigeração (-5°C).

3.4.2 Determinação dos elementos de interesse por ICP OES e GF AAS

Para a determinação da concentração total dos elementos por ICP OES e GF AAS, as amostras secas em estufa, bem como o material de referência certificado foram submetidas à digestão ácida assistida por micro-ondas. Uma mistura oxidante diluída contendo 2,0 mL de HNO_3 , 1,0 mL de H_2O_2 e 3,0 mL de H_2O foi empregada na digestão. A massa utilizada foi de aproximadamente 200 mg tanto da amostra como do material de referência. O volume final da solução após digestão foi de 10 mL. Todas as amostras foram digeridas em triplicata. O branco analítico consistiu da mistura oxidante na ausência da amostra. O programa de aquecimento empregado no forno de micro-ondas está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Programa de aquecimento para digestão ácida das amostras de graviola e do material de referência certificado em forno de micro-ondas.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)	Exaustão
1	140	05	01	1
2	180	04	05	1
3	200	04	10	1
4*	0	-	20	2

*Etapa de resfriamento

A escolha dos melhores comprimentos de onda para determinação elementar em ICP OES foi realizada fazendo-se varreduras, em um amplo intervalo de comprimento de onda, de soluções da amostra e do material de referência digerido. As varreduras foram comparadas com aquelas obtidas com as soluções analíticas de referência contendo 10 mg L⁻¹ de Al, B, Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, P, S, Si, Sn, Sr, Ti, V, e Zn e 50 mg L⁻¹ de Ca, Mg e K. A maior razão sinal/ruído e a não sobreposição de linhas espectrais de outros elementos ou concomitantes foram os critérios utilizados para a escolha dos comprimentos de onda adequados.

O equipamento foi otimizado, utilizando solução aquosa de 2 mg L⁻¹ de Mg em meio de 0,1 % v v⁻¹ HNO₃ para obtenção das condições robustas de operação a partir da avaliação da razão Mg II(280,270 nm)/Mg I(285,213 nm), com método previamente proposto na literatura (MERMET; POUSSEL, 1995). Para obtenção das condições robustas, a potência de radiofrequência aplicada foi variada de 950 W até 1350 W, mantendo as vazões dos gases de nebulização e auxiliar fixos em 0,28 L min⁻¹ e 1 L min⁻¹, respectivamente. A vazão do gás de nebulização foi variada de 0,28 L min⁻¹ até 0,85 L min⁻¹, mantendo a vazão do gás auxiliar em 1 L min⁻¹ e a potência de radiofrequência em 1200 W. E, por fim, a vazão do gás auxiliar foi

variada de 0,5 a 1,5 L min⁻¹, mantendo o gás de nebulização fixo em 0,28 L min⁻¹ e a potência em 1200 W.

Os elementos As, Cd, Pb e Se foram determinados simultaneamente por GF AAS usando 250 µg de W + 250 µg de Rh como modificador químico permanente, (LIMA; KRUG; JACKSON, 1998; NOMURA *et al.*, 2004). O programa de aquecimento empregado está mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite para determinação simultânea de As, Cd, Pb e Se.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (mL/min)	Leitura
Secagem 1	110	10	5	250	Não
Secagem 2	130	10	10	250	Não
Pirólise	650	10	15	250	Não
Atomização	2200	0	4	0	Sim
Limpeza	2200	1	4	250	Não

Condição otimizada para As, Cd, Pb e Se na presença de 250 µg de W + 250 µg de Rh como modificador químico permanente; Tempo total do programa: 69s; Temperatura de injeção: 20°C.

3.4.3 Extração e precipitação de proteínas

Nas amostras de polpa de graviola, submetidas aos diferentes pré-tratamentos (secagem em estufa, liofilização e *in natura*), foram realizadas extrações com diferentes soluções extratoras.

Antes das extrações de proteínas, foi feita a extração lipídica. Para isso, 5,0g das amostras foram utilizadas e adicionou-se 20 mL de uma mistura 1:2 ($v v^{-1}$) de metanol (CH_3OH) e clorofórmio ($CHCl_3$). O extrator e as amostras foram submetidos à agitação em mesa agitadora com rotação 350 rpm, durante 1 hora. Esse procedimento foi feito em duplicata. Para separação do sobrenadante, foi utilizado sistema de filtração a vácuo com filtro de membrana de éster de celulose de 0,45 μm de porosidade. Para assegurar a evaporação completa da mistura $CH_3OH/CHCl_3$ a amostra, após filtração, foi mantida em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, durante 24 horas.

Após as extrações lipídicas, frações das amostras de polpa *in natura* foram submetidas a outras extrações individuais com 0,5 mol L^{-1} de NaOH, 0,5 mol L^{-1} de NaCl, 70 % ($v v^{-1}$) de etanol, 0,2 mol L^{-1} de tampão Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mol L^{-1} de HCl e 0,2 mol L^{-1} de tampão CO_3^{2-}/HCO_3^{1-} (pH 10).

Nas amostras submetidas aos pré-tratamentos de secagem em estufa e liofilização foram realizadas extrações em meio de 0,5 mol L^{-1} de NaOH, 0,2 mol L^{-1} de tampão Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mol L^{-1} de HCl e 0,2 mol L^{-1} de tampão CO_3^{2-}/HCO_3^{1-} (pH 10). Em cada caso, foram empregados ~5 g de amostra e 30 mL dos extratores. A extração foi efetuada em mesa agitadora, com rotação de 350 rpm, durante 1 hora. A separação entre amostra e extrator foi feita por centrifugação a 4000 rpm, durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado em tubo de polipropileno. Todos os procedimentos de extração foram realizados em triplicata. As

soluções extratoras foram analisadas para a determinação das concentrações de proteínas e dos elementos Fe, Cu, Mn e Zn por ICP OES.

Com objetivo de separar compostos de baixo peso molecular e outras espécies que foram extraídas juntamente com as proteínas e melhorar o perfil de separação por cromatografia de exclusão por tamanho, um procedimento de “*clean up*”, baseado na precipitação das proteínas foi adotado. Alíquotas de 10 mL dos extratos foram misturadas com os agentes precipitantes. Para tanto, foram avaliadas soluções de 1 mol L⁻¹ de HCl até obter pH=5, solução de 20% m v⁻¹ de ácido tricloroacético (TCA) e solução 80% v v⁻¹ de acetona em banho de gelo.

Após a precipitação, foi realizada centrifugação a 4000 rpm, por 20 minutos, o precipitado foi coletado e ressuspenso no tampão Tris-HCl para determinação das proteínas e injeção na coluna SEC.

3.4.4 Determinação de proteínas nas amostras e nos extratos

Foi realizada a determinação de nitrogênio total presentes nas amostras submetidas aos diferentes procedimentos de pré-tratamento (secagem em estufa, liofilização e *in natura*), empregando um analisador elementar CHNS com objetivo de avaliar o teor total de proteínas.

Em todas as amostras, após extração lipídica, também foram determinados nitrogênio total com o intuito de avaliar a influencia da extração na concentração total de proteínas.

As determinações de proteínas nos extratos, antes e após a precipitação com acetona, foram realizadas pelo método espectrofotométrico de Bradford (BRADFORD, 1976). Nesse método é utilizado um corante (Comassie Brilliant Blue

G-250), o qual complexa as proteínas presentes na amostra, fazendo com que a solução adquira coloração azul, que absorve em 595 nm.

A calibração foi feita com solução estoque da proteína ovoalbumina, preparada dissolvendo-se 0,800 mg em 4 mL de água deionizada. Agitação por efeito vortex foi aplicada para homogeneização. O espectrofotômetro foi calibrado com soluções analíticas contendo 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ovoalbumina. As medidas foram realizadas após a adição de 1,0 mL do reagente de Bardford em volumes definidos da solução padrão de ovoalbumina.

O extrato de NaOH foi diluído 20 vezes. Volumes de 100 μL dos extratos (com e sem precipitação) foram misturados com 1,0 mL do reagente de Bradford. Após aguardar 5 minutos, os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 595 nm (NAOZUKA, 2008).

3.4.5 Determinação dos elementos nos extratos

As soluções extratoras das amostras, submetidas aos diferentes pré-tratamentos (secagem em estufa, liofilização e *in natura*), foram analisados por ICP OES para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn. As condições instrumentais utilizadas foram otimizadas como descrito no item 3.4.2.

3.4.6 Separação por SEC-UV

A cromatografia de exclusão por tamanho foi empregada para separação dos compostos macromoleculares, segundo pesos moleculares. Utilizou-se a coluna Superdex 75, composta de agarose e ligação cruzada com dextran (volume de 25 mL) e tampão Tris-HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5) como fase móvel (eluente). O fluxo da fase móvel, o tempo de corrida e o comprimento de onda do detector UV foram $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, 75 min e 280 nm, respectivamente (NASCIMENTO; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2010).

A fase móvel foi filtrada antes da corrida usando um sistema de filtração à vácuo com filtro de membrana de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ para remoção das partículas sólidas, com o intuito de evitar entupimento na coluna.

Para calibração da coluna Superdex 75, um volume de $100 \mu\text{L}$ de solução com mistura de proteínas de 6,5 a 75 kDa, dissolvidas em fase móvel Tris-HCl (pH=7,5) foi empregado. Os pesos moleculares foram obtidos através da construção de uma curva analítica de calibração, relacionando o logaritmo dos pesos moleculares (PM) com o coeficiente de partição ($K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$), onde V_e , V_0 , V_t são os volumes de eluição, morto e total da coluna, respectivamente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; NAOZUKA, 2008).

As proteínas do extrato de NaOH da polpa de graviola *in natura* foram avaliadas por SEC-UV, antes e após a precipitação com acetona em banho de gelo. As proteínas dos extratos de NaOH, tampão Tris-HCl (pH 7,5), tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ (pH 10) e HCl, obtidas a partir das amostras *in natura*, liofilizadas e secas em estufa foram analisados, por SEC-UV, somente aquelas submetidas ao procedimento de precipitação com acetona em banho de gelo.

O extrato de NaOH da polpa de graviola *in natura* foi neutralizado com solução de HCl até pH~7 e uma alíquota de 100 µL foi, diretamente, injetada na coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-UV) para obtenção dos perfis das proteínas. Para o procedimento envolvendo precipitação das proteínas, antes da injeção na coluna cromatográfica, o precipitado foi redissolvido com o eluente (solução tampão Tris/HCl).

4. Resultados e discussões

4.1. Determinação da concentração total dos elementos

4.1.1. Determinação dos elementos de interesse por ICP OES

As condições de operação do ICP OES podem influenciar na robustez do método, a qual está relacionada à capacidade do equipamento em aceitar variações na matriz da amostra sem alterar significativamente os sinais analíticos e, conseqüentemente, os resultados. A razão das intensidades das linhas de emissão iônica (280,270 nm) e atômica (285,213 nm) do magnésio (Mg II/ Mg I) de uma solução aquosa de Mg foi proposta por Mermet e colaboradores para avaliar e otimizar a robustez de ICPs. Um valor de razão acima de 10 indica que o ICP OES não deve ser, particularmente, sensível aos efeitos da matriz, enquanto que uma proporção inferior a 4 corresponde a uma alta susceptibilidade aos efeitos de matriz (MERMET; POUSSEL, 1995).

Seguindo recomendação de Stepan e colaboradores, a razão Mg II/ Mg I deve ser multiplicada por um fator ε , calculado a partir da razão dos valores de sinais de fundo (S_x) nos dois comprimentos de onda ($S_{\text{fundo}285,213}/S_{\text{fundo}280,270}$) com o objetivo de corrigir desvios da óptica (STEPAN *et al.*, 2001). Nesse trabalho, o valor adotado foi de 1,8. Sendo assim, as condições robustas foram alcançadas com uma potência de 1250 W, 0,57 L min⁻¹ de vazão do gás de nebulização e 0,5 L min⁻¹ de vazão do gás auxiliar, com valor de razão Mg II / Mg I de 10,7. Os melhores comprimentos de onda e os parâmetros instrumentais otimizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros instrumentais para operação do ICP OES.

Rotação da bomba	25 rpm
Vazão do gás de nebulização	0,57 L min ⁻¹
Vazão de gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Orientação da tocha	Modo Duo (Axial e Radial)
Potência de Radiofrequência	1250 W
Vazão do gás do plasma	12 L min ⁻¹
	Alto comprimento de onda: 5 s
Tempo de integração	Baixo comprimento de onda: 15 s

Comprimento de onda (nm) – vista axial			
Al (II) 396, 152	Cr (I) 425, 435	Mg (I) 285, 213	Sn (I) 270, 651
B (I) 249, 773	Cu (I) 327, 396	Mn (II) 257, 610	Sr (II) 421, 552
Ba (II) 233,527	Fe (II) 259, 940	P (I) 185, 891	Ti (II) 323,452
Ca (II) 396, 847	K (I) 769, 896	S (I) 180, 731	V (II) 292,464
Co (II) 238, 892	Li (I) 323,263	Si (I) 288,158	Zn (I) 213, 856

(I) Linhas Atômicas e (II) Linhas Iônicas

Parâmetros das curvas analíticas (intervalo linear, coeficiente de determinação, coeficiente de variação das medidas das soluções de calibração (n=3), coeficiente angular e coeficiente linear) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros das curvas analíticas de calibração.

Elemento	Intervalo linear (mg L ⁻¹)	a*	b*	R ²	CV (%)
Al	0,5-20	810,9	800,6	0,99977	0,3
B	0,5-20	4919,4	1218,6	0,99997	1,1
Ba	0,5-20	1575,8	391,2	0,99999	0,5
Ca	1-100	34788,9	25235,7	0,99841	4,7
Co	0,5-20	4077,3	1235,6	0,99983	5,0
Cr	1-50	4578,9	-1894,8	0,99998	2,7
Cu	0,5-20	3747,9	-244,8	0,99998	0,3
Fe	0,5-20	6386,6	1597,2	0,99987	0,6
K	1-100	14844,1	-12164,8	0,99977	1,4
Li	1-50	630,3	400,5	0,99955	3,8
Mg	1,100	19296,4	-9923,9	0,99983	3,8
Mn	0,5-20	28061,6	20668, 8	0,99981	0,5
P	5-300	801,3	102,6	0,99918	2,4
S	5-300	804,6	49,9	0,99881	1,9
Si	1-100	162,4	-90,2	0,99943	1,3
Sn	1-50	3420,3	-46,3	0,99913	4,0
Sr	0,5-10	26332,3	-2256,0	0,99984	4,8
Ti	0,5-20	96535,2	4526,2	0,99999	0,7
V	0,5-20	55259,0	3272,2	0,99989	3,7
Zn	0,5-20	8542,2	4068,3	0,99967	0,4

*a= coeficiente angular, b= coeficiente linear

Os resultados das determinações dos elementos no material de referência certificado (SRM 1572), obtidos experimentalmente, e os valores certificados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Determinação dos elementos no material de referência certificado (SRM 1572).

Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	92 ± 15	66 ± 5	Mg	$0,58 \pm 0,03^b$	$0,53 \pm 0,12$
B	ND ^a	53 ± 3	Mn	23 ± 2	22 ± 1
Ba	21 ± 3	17 ± 2	P	$0,13 \pm 0,02^b$	$0,11 \pm 0,03$
Ca	$3,15 \pm 0,10^b$	$3,13 \pm 0,88$	S	$0,407 \pm 0,009$	$0,402 \pm 0,007$
Co	$0,02^c$	< LQ	Si	ND	214 ± 13
Cr	$0,8 \pm 0,2$	< LQ	Sn	$0,24^c$	< LQ
Cu	$16,5 \pm 1,0$	$14,1 \pm 2$	Sr	100 ± 2	90 ± 9
Fe	90 ± 10	95 ± 2	Ti	ND	$2,9 \pm 0,7$
K	$1,82 \pm 0,06^b$	$1,64 \pm 0,36$	V	ND	< LQ
Li	ND	< LQ	Zn	29 ± 2	23 ± 3

^a Não determinado; ^b %m/m; ^c Concentração não certificada.

Para verificar a concordância dos resultados, foi aplicado o teste *t-Student*, exceto para B, Co, Cr, Li, Si, Sn e V, cujos valores estão abaixo do LD ou não foram determinados. Para os elementos em que foi possível a determinação no material de referência certificado, os valores concordam a um nível de confiança de 95%, quando aplicado o teste *t-Student*, exceto para Al, Zn e Cr.

Na Tabela 7, estão apresentadas as concentrações dos elementos de interesse nas amostras digeridas bem como as recuperações obtidas para as adições de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} ou 50 mg L^{-1} dos elementos. As ótimas recuperações apresentadas na Tabela 7, atestam que as análises foram executadas na ausência de interferências espectrais e de matriz. Para a maioria dos elementos, as recuperações variaram de 80% a 112%, mesmo para o Zn que não tinha mostrado boa recuperação na determinação do material de referência. No caso do Al, baixas recuperações também foram observadas na adição e recuperação. Não foi possível uma investigação sistemática para avaliar possíveis interferências na determinação de Al, entretanto, os baixos valores de recuperação podem estar relacionados a uma possível interferência espectral (SOUZA *et al.*, 2011), possivelmente relacionada a proximidade entre as linhas de emissão iônicas do Ca ($396,847 \text{ nm}$) e Al ($396,152 \text{ nm}$).

Os limites de quantificação (LQ) foram considerados como 10 vezes o valor do limite de detecção (LD). Os valores do LD foram calculados usando a concentração equivalente à radiação de fundo (BEC) e a razão sinal/ruído (SBR): $\text{BEC} = C_{sr}/\text{SBR}$, $\text{SBR} = I_{sr} - I_{branco}/I_{branco}$; $\text{LD} = 3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}/100$; onde, C_{sr} é a concentração da solução de referência multi-elementar (10 mg L^{-1}), I_{sr} e I_{branco} são as intensidades de emissão das soluções de referência multi-elementar e do branco, e RSD é o desvio padrão relativo para dez medidas consecutivas da solução do branco (NAOZUKA *et al.*, 2011). Esses limites foram convertidos em concentração massa/massa, baseando-se na massa de 200 mg e volume final da solução de 10 mL.

Dentre os elementos avaliados, K foi o que apresentou maior concentração na polpa de graviola, seguido pelo P, Ca, S e Mg. A presença dos elementos P e S em concentrações elevadas pode ser um indicativo de proteínas na amostra.

Nas Tabelas 8 e 9, estão apresentados os teores de macro e micronutrientes em 100 g da parte comestível da graviola, comparados aos valores reportados na literatura.

Os teores de K foram comparáveis com os valores obtidos pela Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos-TACO (FILHO *et al.*, 2011) e por um estudo feito com frutos do nordeste brasileiro (ALMEIDA *et al.*, 2009). Porém, as concentrações encontradas no presente estudo foram cerca da metade dos encontrados no fruto cultivado na Colômbia (LETERME *et al.*, 2006). Os teores de P foram cerca de 3 vezes maiores que os encontrados por Leterme *et al.* e por Almeida *et al.*, e ao comparar com os dados da TACO, essa diferença se torna mais discrepante. As concentrações de Ca e Mg foram, aproximadamente, o dobro se comparado aos outros estudos. Os teores de Mn e Cu foram cerca de 10 vezes maiores que os reportados anteriormente. Os teores de Fe e Zn foram próximos aos reportados por Almeida e colaboradores (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Tabela 7. Concentração dos elementos em polpa de graviola (n=3 amostras).

Elemento	Graviola ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}$)	Adição (mg L^{-1})	Recuperação (%)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	$6,7 \pm 1,1$	1,0	60	1,2
B	$8,7 \pm 0,7$	1,0	80	3,9
Ba	$13,6 \pm 2,0$	1,0	94	0,11
Ca	874 ± 18	20	112	5,0
Co	< LQ	1,0	95	0,045
Cr	< LQ	1,0	106	0,38
Cu	$3,9 \pm 0,2$	1,0	89	0,42
Fe	$8,2 \pm 0,7$	1,0	92	0,35
K	3049 ± 137	50	112	22
Li	< LQ	1,0	106	0,39
Mg	481 ± 20	20	103	3,6
Mn	$6,9 \pm 0,5$	1,0	106	0,0052
P	993 ± 19	50	91	6,2
S	683 ± 14	20	111	3,1
Si	49 ± 8	10	91	3,7
Sn	< LQ	1,0	100	0,31
Sr	$6,7 \pm 0,1$	1,0	94	0,32
Ti	< LQ	1,0	102	0,039
V	< LQ	1,0	101	0,82
Zn	$3,3 \pm 0,1$	1,0	88	0,37

Tabela 8. Teores de macronutrientes comparados a dados da literatura (mg 100g⁻¹).

Referência	K	P	Ca	Mg
Neste estudo	291-382	97-101	85-89	46-50
(FILHO <i>et al.</i> , 2011)	250	19	40	23
(LETERME <i>et al.</i> , 2006)	523	30	38	25
(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2009)	227,67 ± 41,90	32,43 ± 1,46	14,19 ± 2,18	23,14 ± 0,5

Tabela 9. Teores de alguns micronutrientes comparados a dados da literatura (mg 100g⁻¹).

Referência	Mn	Fe	Cu	Zn
Neste estudo	0,64-0,74	0,75-0,89	0,37-0,41	0,32-0,34
(FILHO <i>et al.</i> , 2011)	0,08	0,2	0,04	0,1
(LETERME <i>et al.</i> , 2006)	0,07	0,38	0,1	0,11
(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2009)	0,07 ± 0,02	0,83 ± 0,13	0,15 ± 0,03	0,46 ± 0,13

Diversos fatores podem contribuir para as diferenças encontradas no nosso estudo e as referências mencionadas, tais como composição do solo, condições climáticas, diferença na genética, bem como a prática agrícola (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Com os valores obtidos é possível correlacionar a contribuição percentual de alguns elementos presentes na graviola, com relação a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos (ANVISA, 2005). Essa relação é apresentada na Tabela 10. De acordo com os resultados, a graviola pode ser considerada uma fonte de Cu e Mn, suprimindo 43% e 30% da IDR em 100 gramas de polpa, bem como boa fonte de Mg e P, com contribuições de 19% e 14%, respectivamente. Estudos de biodisponibilidade são necessários para avaliar o quanto da fração ingerida do

elemento presente na polpa de graviola é absorvida e, conseqüentemente, usado para funções fisiológicas. Entretanto, esses dados contribuem para informações com respeito à concentração elementar da graviola.

Tabela 10. Valores de ingestão diária recomendada (IDR) de minerais (mg/dia ou µg/dia) para adultos e contribuição mineral para IDR (%) com relação a 100 g de polpa de graviola (ANVISA, 2005).

Nutriente	IDR	Contribuição da graviola para IDR (%)
Ca	1000 mg	8,7
Fe	14 mg	5,9
Mg	260 mg	18,5
Zn	7 mg	4,7
P	700 mg	14,2
Cu	900 µg	43,3
Mn	2,3 mg	30

4.1.2. Determinação de As, Cd, Pb e Se por SIMAAS

Os elementos As, Cd, Pb e Se foram determinados simultaneamente por GF AAS usando 250 µg de W + 250 µg de Rh como modificador químico permanente (LIMA; KRUG; JACKSON, 1998; NOMURA *et al.*, 2004). O programa de aquecimento empregado está mostrado na Tabela 3 (item 3.4.2) e, nessas condições, foram construídas as curvas analíticas de calibração e os parâmetros obtidos para cada equação estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros das curvas analíticas de calibração de As, Cd, Pb e Se.

Elemento	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	a*	b*
As	10-80	0,9917	0,0002	0,0019
Cd	0,2-1,6	0,9992	0,0017	-0,0004
Pb	5-40	0,9926	0,0007	-0,0011
Se	10-80	0,9541	0,0008	-0,0002

*a= coeficiente angular, b= coeficiente linear

Seguindo recomendação da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), os limites de detecção (LD) foram calculados como três vezes o desvio padrão de dez leituras do branco analítico (IUPAC, 1978). Para a conversão desses limites em concentração, os valores desses desvios padrão foram divididos pelas inclinações das curvas de calibração. Os limites de quantificação (LQ) foram definidos como 3 vezes o valor do LD. Os limites foram convertidos em concentração massa/massa, baseando-se na massa de 200 mg e volume final da solução de 10 mL.

Os resultados das determinações no SRM 1572 obtidos experimentalmente e os valores certificados estão apresentados na Tabela 12. Os valores encontrados concordam entre si a um nível de confiança de 95%, quando aplicado o teste *T-Student*. Exceto para o Se, no qual o valor certificado encontra-se abaixo do limite de detecção do método. As recuperações obtidas para os elementos mostram que não ocorreu interferência e atestam a exatidão do método para esses elementos.

Tabela 12. Determinação de As, Cd, Pb e Se no material de referência certificado (n=2).

Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)
As	$3,1 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$
Cd	$0,03 \pm 0,01$	$0,028 \pm 0,001$
Pb	$13,3 \pm 2,4$	$11,6 \pm 0,1$
Se	$0,025^a$	< LQ

^a Concentração não certificada

Na Tabela 13, estão apresentadas as concentrações de As, Cd, Pb e Se na amostra digerida bem como as recuperações obtidas para adição de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente

Os valores encontrados para todos os elementos encontram-se abaixo do limite de quantificação. Para As, Pb e Se estão também abaixo do limite de detecção e para Cd o valor de concentração coincide com o limite de detecção.

Os resultados mostram que a graviola não é uma fonte de Se e, além disso, não estão presentes elementos potencialmente tóxicos como As, Cd e Pb.

Tabela 13. Determinação de As, Cd, Pb e Se na polpa de graviola e valores de recuperação (n=2 amostras).

Elemento	Graviola ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{desvio padrão}$)	Adição ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
As	<LQ	20	116	0,47
Cd	<LQ	0,4	113	0,011
Pb	<LQ	10	102	0,48
Se	<LQ	20	98	0,62

4.2. Determinação da concentração total de proteínas na polpa de graviola e nos extratos

Para a determinação da concentração total de proteínas multiplicou-se o teor de nitrogênio total, encontrado na análise elementar, por um fator que o converteu em porcentagem de proteína. Esse fator é específico para cada tipo de proteína e depende do teor de nitrogênio na composição proteica. Logo, deve-se considerar a composição de cada alimento para estabelecer esse fator, por exemplo, para leite e produtos lácteos o fator de multiplicação é de 6,38; para o trigo e derivados, 5,70; gelatina, 5,55; e para ovos 6,68. Quando o fator de multiplicação é desconhecido, utiliza-se 6,25, pois este considera que a maioria das proteínas é composta por 16% de nitrogênio ($100/16 = 6,25$) (SGARBIERI, 1996). Desta forma, foram estimados os teores de proteínas presentes na amostra *in natura*, liofilizada e seca em estufa com e sem extração da fase lipídica. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

As amostras *in natura*, com e sem extração da fase lipídica apresentaram as maiores concentrações de proteínas. Em contrapartida, os teores de proteínas encontrados nas amostras liofilizadas e secas em estufa foram menores, sobretudo para a secagem em estufa.

Os teores de proteínas encontrados nas amostras de graviola são maiores que os reportados na TACO, de 0,8 % m/m.

Tabela 14. Estimativa do teor de proteínas presentes nas amostras de polpa de graviola.

Amostra	Extração de lipídeos	% de Nitrogênio	Teor de Proteínas % (m/m)
<i>In natura</i>	Não	1,31	8,4*
<i>In natura</i>	Sim	2,3	14
Liofilizada	Não	1,2	7,8
Liofilizada	Sim	1,30	8,3
Seca em estufa	Não	0,96	6,0
Seca em estufa	Sim	1,1	6,9

* Nos cálculos foram desconsiderados a porcentagem de umidade (82,2%)

Foi avaliada a eficiência de extração e solubilização de proteínas em diferentes meios extratores utilizando-se a polpa *in natura*, previamente homogeneizada em moinho de facas. Os resultados obtidos, para as diferentes soluções extratoras, pelo método de Bradford estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Concentração de proteínas presentes nos extratos de polpa de graviola *in natura*

Extrato	Concentração % (m/m) $\pm$ DP
NaOH	2,1 $\pm$ 0,1
HCl	0,50 $\pm$ 0,02
Tampão Tris-HCl	0,57 $\pm$ 0,03
Etanol	0,17 $\pm$ 0,02
Tampão CO_3^{2-} / HCO_3^{1-}	1,30 $\pm$ 0,01
NaCl	< LD*

*LD= 0,07 % (m/m)

Os extratos de NaOH, HCl, tampão Tris-HCl (pH= 7,5) e tampão CO_3^{2-} / HCO_3^{1-} (pH 10) foram os que apresentaram maior eficiência de extração. Sendo assim, esses extratores foram escolhidos para avaliar a influencia do preparo de amostra (liofilização, secagem em estufa e *in natura*) na determinação de proteínas em polpa de graviola.

As extrações com soluções ácidas e alcalinas diluídas promovem a separação de proteínas do grupo das glutelinas e em meio neutro (c.a. água) há separação de proteínas do grupo das albuminas. Como mencionado anteriormente, o pH afeta a natureza e a distribuição de cargas das proteínas. Em geral, as proteínas são mais solúveis em pHs baixos por causa do excesso de cargas positivas e em pHs elevados devido ao excesso de cargas negativas. O NaOH não é um extrator seletivo, podendo extrair outros grupos de proteínas além das glutelinas (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; MACHADO *et al.*, 2007; NAOZUKA, 2008). Adicionalmente, esse extrator pode não extrair somente proteínas e sim outros compostos de diferentes pesos moleculares.

Considerando o método de preparo de amostra, é de interesse conhecer a influência dos procedimentos, tais como, moagem e secagem, sobre a extração e

concentração de proteínas. Nesse contexto, a amostra foi submetida a três pré-tratamentos: 1) liofilização seguida de moagem em moinho criogênico; 2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; ou 3) secagem em estufa a 50° e moagem com almofariz e pistilo. A Figura 1 mostra como o preparo da amostra influenciou na extração e solubilização de proteínas nos melhores extratores avaliados (NaOH, HCl, tampão Tris-HCl e tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$), por meio da determinação da concentração total de proteínas pelo método de Bradford.

Figura 1: Concentração de proteínas nos diferentes meios extratores. (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.

Comparando os resultados da Figura 1 com os teores de proteínas obtidos na Tabela 14, observa-se que, em geral, o tratamento que envolveu o processo de liofilização e moagem criogênica foi o que proporcionou maior quantidade de proteínas extraídas, cerca de 9% no extrato de HCl, 12% no extrato de tampão Tris-HCl, 25% no extrato de tampão $\text{CO}_3^{-2} / \text{HCO}_3^-$ e 29% no extrato de NaOH. Entre os 4 meios testados, HCl extraiu menor quantidade de proteínas 9%, 4% e 2% para as amostras liofilizadas, *in natura* e seca em estufa, respectivamente. NaOH extraiu maior quantidade de proteínas, 29%, 14% e 25% para as amostras liofilizadas, *in natura* e seca em estufa, respectivamente. Observa-se também que, com exceção do extrato HCl, maior quantidade de proteínas foram extraídas da amostra seca em estufa se comparada com amostra *in natura*. Porém, com exceção do extrato Tris-HCl, as concentrações de proteínas das amostras *in natura* foram maiores com relação às amostras secas em estufa.

Cabe ressaltar que as extrações foram feitas apenas em presença da amostra e extrator, sem a adição de qualquer concomitante. Também é importante destacar que, o uso desses extratores não deve evitar a extração de outros compostos, além das proteínas, o que pode alterar os resultados, sobretudo aqueles obtidos na separação por SEC-UV. Portanto, com o intuito de separar as proteínas de prováveis outros compostos extraídos, foram testados diferentes agentes precipitantes (acetona, HCl e ácido tricloroacético). Esta etapa do procedimento foi introduzida com o objetivo de realizar o “*clean up*” das soluções extratoras. Após a precipitação, o sobrenadante foi separado e o precipitado redissolvido com solução Tris-HCl.

4.3. Determinação da concentração de proteínas após precipitação com acetona

Antes do processo de separação cromatográfica, foram avaliados três diferentes agentes precipitantes: ácido tricloroacético que é comumente utilizado para precipitar proteínas no sangue, ácido clorídrico e acetona. Porém não foi observada a formação de precipitados utilizando as duas primeiras soluções. Esse resultado pode estar associado à presença de maior quantidade compostos de baixa massa molecular nos extratos de polpa de graviola. Em estudo realizado por Kannamkumarath e colaboradores, foi avaliado o emprego de soluções de HCl e NaOH no processo de extração de proteínas em diferentes amostras de castanhas-do-pará (KANNAMKUMARATH; WUILLOUD; CARUSO, 2004). A análise dos extratos proteicos revelou que compostos de baixo peso molecular apresentavam grande afinidade pela solução de HCl. Dessa forma, pode-se inferir, que ao introduzir uma etapa de precipitação com ácidos, os compostos de baixo peso molecular devem se tornar solúveis neste meio, consequentemente não foi observada a formação de precipitados em uma amostra com maior quantidade de compostos de baixa massa molecular.

Para avaliar melhor os resultados obtidos pelos diferentes procedimentos de pré-tratamento de amostra foi utilizada acetona em banho de gelo como agente precipitante.

A solubilidade das proteínas em soluções contendo solventes orgânicos, por exemplo, acetona, é menor do que em água. Esse solvente orgânico é miscível em extrato aquoso contendo proteínas, sendo assim ele é capaz de reduzir o poder de solvatação da água sobre as proteínas. Isso pode ser explicado pelo fato da acetona

apresentar constante dielétrica bem inferior a da água e, portanto, a adição desse solvente orgânico diminui a solubilidade das proteínas por aumentar a força de atração entre as moléculas protéicas, levando à agregação e precipitação das mesmas. Outro fator importante é a temperatura, a precipitação de proteínas em solventes orgânicos é mais eficiente em temperaturas mais baixas, pois assim, as proteínas tem sua solubilidade diminuída sem sofrer desnaturação (SGARBIERI, 1996).

A Figura 2 mostra as concentrações totais de proteínas determinadas pelo método no Bradford, nos extratos de polpa de graviola submetidas aos diferentes procedimentos de preparo de amostra, após a precipitação das proteínas e ressuspensão em $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão Tris- HCl.

Os resultados da Figura 2 mostram que maior quantidade de proteínas foram precipitadas da amostra *in natura*. As reduções nas concentrações de proteínas das amostras submetidas aos processos de liofilização e secagem em estufa podem estar relacionadas a uma mudança de estrutura provocada pelas variações de temperatura.

A modificação estrutural de proteínas, em alimentos, depende de uma série de fatores, tais como: composição do alimento, se o alimento se encontra *in natura* ou processado, bem como do tipo de processamento, condições e tempo de armazenamento (SGARBIERI, 1996). Os tratamentos térmicos, incluindo processos de congelamento, conduzem frequentemente à modificações físicas das proteínas, conhecidas como desnaturação ou ao desdobramento da estrutura nativa. A proteína desnaturada perde solubilidade e funcionalidade, além disso, a desnaturação produz na proteína mudanças de conformação com a abertura das moléculas podendo aumentar sua reatividade química (CAVALCANTI *et al*, 2010;

SGARBIERI, 1996). Essas variações não influenciaram as determinações totais pelo método de Bradford (Fig 1), entretanto alteraram a precipitação. Diversos eventos podem afetar a estabilidade de soluções contendo proteínas, tais como: aquecimento, agitação, congelamento, mudanças no pH e exposição a interfaces ou agentes desnaturantes. Estudos utilizando espectroscopia no infravermelho mostraram que o processo de secagem por liofilização envolve etapas de congelamento e desidratação que podem levar a alterações estruturais das proteínas (desdobramento molecular da proteína) (TATTINI; PARRA; PITOMBO, 2006). Os resultados apresentaram uma tendência semelhante aos obtidos pela análise elementar (nitrogênio total).

Figura 2: Concentração de proteínas nos diferentes meios extratores, após precipitação. (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.

Comparando os resultados da Figura 2 com os obtidos a Figura 1, verifica-se que a porcentagem de proteínas precipitadas nas amostras submetidas ao processo de liofilização e moagem criogênica variou entre 32% e 50%, nas amostras *in natura* essa variação ficou entre 60% e 90% e nas amostras secas em estufa de 54% a 83%. Sendo que nos extratos de NaOH foram alcançadas as maiores eficiências de precipitação. Devido a essa perda observada em todos os meios, pode-se inferir que

a acetona precipita um mesmo grupo de proteínas, essa observação é melhor confirmada nos resultados obtidos por cromatografia.

4.4. Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn nos extratos de NaOH, HCl, tampão Tris-HCl e tampão Carbonato-Bicarbonato

A fim de verificar uma provável correlação entre as proteínas extraídas nos diferentes meios e elementos de interesse, os extratos proteicos foram analisados por ICP OES, visando à determinação de Cu, Fe, Mn e Zn. Massas das amostras, após a extração lipídica, foram consideradas para os cálculos das concentrações (Tabela 16).

Os resultados da Tabela 16 mostram que, independente do tratamento utilizado, a melhor eficiência de extração dos elementos também foi encontrada nos extratos de NaOH, seguido dos extratos tamponados em pH 10,0 e por último os extratos de HCl. Em geral, maior concentração dos elementos foi encontrada na amostra *in natura* e os menores teores foram encontrados nas amostras submetidas à secagem em estufa.

Considerando os teores totais, a porcentagem de Cu extraído nas amostras liofilizadas variou de 30% a 75%; nas amostras *in natura* de 48% a 87% e nas secas em estufa a variação foi de 23% a 47%. O teor de Fe nas amostras liofilizadas variou de 36% a 59%; 35% a 73% nas amostras *in natura* e 24% a 48% nas amostras que foram secas em estufa. A porcentagem de Mn foi de 23% a 57% nas amostras liofilizadas; 28% a 78% nas amostras *in natura* e de 15 a 40% nas amostras secas em estufa. Por fim, o teor de Zn foi de 21% a 62% nas amostras liofilizadas; 39% a 76% nas amostras *in natura* e de 12% a 49% nas amostras secas em estufa.

Tabela 16. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn nos extratos de polpa de graviola submetidos aos diferentes pré-tratamentos de amostra.

Extrato		Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
HCl	Liofilizada	1,17 $\pm$ 0,03	2,97 $\pm$ 0,01	1,62 $\pm$ 0,04	0,758 $\pm$ 0,004
	<i>In natura</i>	1,87 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3
	Estufa	0,90 $\pm$ 0,05	1,93 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,1
Tris-HCl	Liofilizada	1,9 $\pm$ 0,1	3,71 $\pm$ 0,03	1,98 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,02
	<i>In natura</i>	2,28 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	1,57 $\pm$ 0,43
	Estufa	0,71 $\pm$ 0,1	2,64 $\pm$ 0,01	1,41 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01
CO ₃ ²⁻ /HCO ₃ ⁻	Liofilizada	2,5 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	1,56 $\pm$ 0,02
	<i>In natura</i>	2,97 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,2	3,78 $\pm$ 0,02	1,91 $\pm$ 0,02
	Estufa	1,23 $\pm$ 0,05	2,65 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,01
NaOH	Liofilizada	2,9 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,1	3,91 $\pm$ 0,01	2,06 $\pm$ 0,04
	<i>In natura</i>	3,39 $\pm$ 0,5	5,98 $\pm$ 0,04	5,38 $\pm$ 0,03	2,5 $\pm$ 0,5
	Estufa	1,83 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	2,77 $\pm$ 0,01	1,61 $\pm$ 0,02
Total*		3,9 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,1

* Valores totais retirados da Tabela 7.

Considerando que Cu, Fe, Mn e Zn são metais de transição que interagem fortemente com aminoácidos que podem fazer parte de proteínas, formando as metaloproteínas (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006 (SZPUNAR, 2005), a presença desses elementos nos extratos permite lançar a hipótese de os mesmos podem estar associados a grupos de proteínas.

4.5. Separação cromatográfica dos extratos proteicos

4.5.1. Calibração da coluna cromatográfica

Para a estimativa do peso molecular das espécies presentes nos extratos, o sistema de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) foi calibrado usando padrões de proteínas de peso molecular conhecidos, tais como: aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa) e Blue Dextran (2000kDa). A partir dos valores de volume de eluição, obtidos para cada padrão de peso molecular, calculou-se o coeficiente de partição (K_{AV}), o qual apresentou uma resposta linear com relação ao logaritmo dos pesos moleculares dos padrões de proteínas utilizados. A equação da curva de calibração obtida permitiu o cálculo dos pesos moleculares dos compostos separados pela cromatografia.

A equação da curva de calibração foi $K_{AV} = 0,73239 - 0,35638 \times \log PM$ ($R^2 = 0,9843$) e o volume morto, obtido com Blue Dextran, de 7,4 mL. A partir desta equação foram calculados os pesos moleculares dos compostos eluídos em diferentes procedimentos de extração e preparo de amostra, sem (com extrator NaOH) e após precipitação com acetona em banho de gelo.

4.5.2. Perfil cromatográfico dos extratos de NaOH antes e após precipitação

A Figura 3 mostra o perfil molecular obtido por SEC-UV para amostra de polpa de graviola *in natura*, antes e após a precipitação das proteínas com acetona. Como pode ser observado, o uso do agente precipitante teve como objetivo o “*clean*

up” das proteínas extraídas, reduzindo a quantidade de outros compostos de massas moleculares altas, que podem co-eluir com as proteínas, durante a separação por SEC-UV. Um aspecto relevante que deve ser considerado ao comparar as Figuras 3(1) e 3(2) é a redução da intensidade do sinal analítico, observada após a etapa de precipitação. Apesar de ocorrer uma melhora na resolução, houve perdas e aparecimento de sinal intenso em, aproximadamente, 20 mL de volume de eluição.

Apesar de observada uma perda de intensidade de sinal, mas melhora na resolução da separação, os estudos posteriores com amostras de graviola, submetidas aos diferentes procedimentos de pré-tratamento e extratores, foram realizados após a precipitação das proteínas com acetona em banho de gelo.

Figura 3: Perfis cromatográficos do extrato de NaOH da amostra *in natura*. (1) antes da precipitação com acetona, (2) após precipitação com acetona.

4.5.3. Perfis cromatográficos após precipitação

A adição de acetona, como comentado anteriormente, reduz a solubilidade das proteínas devido à diminuição da constante dielétrica da solução. Portanto,

foram comparados os perfis de distribuição molecular, obtidos por SEC-UV, das amostras submetidas aos diferentes procedimentos de preparo de amostra e extrações com NaOH, HCl, tampão Tris-HCl, tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4-7.

No geral, as análises das soluções por SEC-UV mostraram que, independente do extrator utilizado, os perfis cromatográficos dos extratos da amostra *in natura* e seca em estufa apresentaram compostos de alto e baixo peso molecular, acima do limite de exclusão ($\text{PM} > 75 \text{ kDa}$) e abaixo da faixa de permeação do gel ($\text{PM} < 6,5 \text{ kDa}$). Em contrapartida, para os extratos das amostras submetidas ao processo de liofilização e moagem criogênica, foram observados compostos entre a faixa de calibração da coluna e nesse caso não foram observados compostos em regiões acima da região de exclusão.

O extrato HCl da amostra liofilizada apresentou perfil cromatográfico na faixa de 27,2 kDa e no volume de eluição por volta de 30 mL, o que corresponde a regiões abaixo de 6,5 kDa. Para a amostra *in natura*, foi observado um perfil de distribuição na região maior que 75 kDa e no volume de eluição entre 15 e 20 mL ($\text{PM} < 6,5 \text{ kDa}$). Perfil semelhante foi observado para a amostra seca em estufa, com compostos acima e abaixo da faixa de permeação do gel (Figura 4).

No extrato alcalino (Figura 5), onde foi verificado maior eficiência de extração de proteínas, como determinado pelo método de Bradford, foi observado para amostra liofilizada um perfil de distribuição na faixa de 9,2 kDa e entre um volume de eluição de 20 e 35 mL ($\text{PM} < 6,5 \text{ kDa}$). Novamente, os perfis obtidos para as amostras seca em estufa e *in natura* foram semelhantes, identificando compostos em regiões acima do limite de exclusão ($\text{PM} > 75 \text{ kDa}$) e abaixo da faixa de permeação total do gel ($\text{PM} < 6,5 \text{ kDa}$).

Figura 4: Perfis cromatográficos do extrato de HCl empregando precipitação com acetona em banho de gelo: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.

Figura 5: Perfis cromatográficos do extrato de NaOH empregando precipitação com acetona em banho de gelo: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50° e moagem com almofariz e pistilo.

No extrato Tris-HCl da amostra liofilizada, o perfil cromatográfico mostrou uma distribuição na faixa de 39,2 kDa e na região de volume de eluição entre 20 e 30 mL, correspondendo a peso molecular abaixo de 6,5 kDa. Os extratos das amostras *in natura* e seca em estufa apresentaram compostos abaixo e acima do limite de permeação do gel (Figura 6).

O extrato tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ da amostra liofilizada, apresentou perfil cromatográfico distribuído na faixa de 18,4 kDa a 6,7 kDa. Para as amostras *in natura* e secas em estufa os perfis moleculares mostraram compostos abaixo de 6,5 kDa e acima de 75 kDa (Figura 7).

Em geral, a diferença nos perfis obtidos para as amostras secas em estufa e *in natura* esta relacionado à perda de resolução no perfil de distribuição dos compostos separados na coluna. Exceto para o extrato de NaOH, foi observado uma banda mais estreita e intensa no volume de eluição próximo de 20 mL para as amostras *in natura*. Em todos os cromatogramas obtidos dos precipitados de proteínas dos diferentes extratos, os compostos de baixo peso molecular (< 6,5 kDa) apresentaram maiores intensidades de sinais em comparação aos compostos de alto peso molecular. Esses resultados podem explicar a não precipitação das proteínas quando os precipitantes HCl e TCA foram empregados.

Figura 6: Perfis cromatográficos do extrato de tampão Tris-HCl (pH 7,0) empregando precipitação com acetona em banho de gelo: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.

Figura 7: Perfis cromatográficos do extrato de tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ (pH 10,0) empregando precipitação com acetona gelada: (1) amostra liofilizada seguida de moagem em moinho criogênico; (2) amostra *in natura* homogeneizada em moinho de facas; (3) secagem em estufa a 50°C e moagem com almofariz e pistilo.

5. Conclusões

As determinações elementares revelaram a presença de alguns elementos que não estão incluídos nas Tabelas de Composição de Alimentos, merecem destaque Al, B, Ba, Si e Sr. As determinações por ICP OES foram realizadas com boas precisão e exatidão. Os maiores problemas de recuperação, tanto no material de referência como nas amostras, foram observados para o Al, que pode estar relacionado a interferências espectrais. Com base nos valores de ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos, a graviola pode ser considerada uma possível fonte de Cu, Mn, Mg e P suprimindo, 43%, 30%, 18% e 14% da IDR em 100 gramas de polpa, respectivamente. Entretanto, estudos de biodisponibilidade são necessários para avaliar o quanto desses nutrientes é absorvido e usado para funções fisiológicas.

A estimativa do teor total de proteínas, com base na determinação de nitrogênio total, mostrou que a amostra *in natura* foi a que apresentou maior concentração, seguida da amostra liofilizada e moída em moinho criogênico, e amostra seca em estufa e moída em almofariz/pistilo. Os teores de proteínas das amostras submetidas à extração de lipídios foram sistematicamente maiores, indicando possível contaminação da mistura extratora com compostos nitrogenados.

As soluções extratoras de NaOH, HCl, tampão Tris-HCl (pH 7,5) e de tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ (pH=10) foram as que apresentaram melhor eficiência de extração de proteínas nas amostras. Na determinação da concentração total de proteínas, independente da solução extratora utilizada, o processo de liofilização e moagem criogênica foi o que proporcionou maior quantidade de proteínas extraídas. Porém, após a precipitação com 80% v v⁻¹ de acetona, maior quantidade de proteínas foram precipitadas da amostra *in natura*, seguida da amostra liofilizada e da polpa seca em

estufa. Esses resultados apresentaram uma tendência semelhante aos obtidos pela análise elementar (nitrogênio total).

A melhor eficiência de extração de Cu, Fe, Mn e Zn foi observada para o extrator NaOH, seguido do tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{1-}$ (pH=10) e, por ultimo, do extrator HCl. Em geral, maiores concentrações dos elementos foram encontradas nas amostras *in natura* e menores naquelas submetidas à secagem em estufa. Apesar de não ter sido objetivo desse projeto a correlação entre os perfis moleculares e elementares, obtidos por SEC-UV, é possível supor que a presença desses metais nos extratos pode indicar possível associação dos mesmos às proteínas extraídas pelas diferentes soluções extratoras.

O melhor agente precipitante foi acetona em banho de gelo. A baixa eficiência de precipitação com HCl e TCA pode estar relacionado à presença de compostos de baixa massa molecular nos extratos da polpa de graviola. Nos cromatogramas obtidos por SEC-UV foi observado que em todos os extratos prevaleceram os compostos de baixo peso molecular (< 6,5 kDa).

Em resumo, os resultados obtidos com esse projeto de pesquisa, contribuem para entender um pouco mais da química elementar e proteica da graviola.

6. Referências bibliográficas

ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products** , v. 62, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M. D.; FONSECA, M. L.; MAGALHÃES, C. E. C.; LOPES, M. D. F. G.; LEMOS, T. L. G. D. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 581-586, 2009.

ALVES, A. N. L.; ROSA, H. V. D. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 129-139, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Setembro 2005.

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 2121–2132, 2002.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; TADA, E. D. S.; RIVELLINO, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 873 , p. 117–127, 2000.

AZEVEDO, S. V. D. **Determinação dos níveis de estanho em fluidos biológicos de população exposta ambientalmente na Vila Massangana, RO.** Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro. 2009.

BETTMER, J. Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 370–371, 2005.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, J. Á. G. D.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, É. J.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F. D. Uso de microminerais sob a forma de complexo orgânico em rações para frangas de reposição no período de 7 a 12 semanas de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1342-1348, 2006.

BUENO, L. Efeito do triacilglicerídeo de cadeia média, da fibra e do cálcio na disponibilidade de magnésio e de zinco pelo método in vitro e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, p. 306-311, 2008.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47–70, 2002.

CASSILETH, B. Complementary Therapies, Herbs, and Other OTC Agents. **Oncology-New York**, v. 22, p. 1202, 2008.

CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; FLORÊNCIO; I. M.; FLORENTINO, E. R.; DA SILVA, F. L. H. Avaliação da Estabilidade Térmica das Proteínas das Amêndoas da Faveleira. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p 37-43, 2010.

CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR C.; BROCHIER J.; GOLI T.; MONTET D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4318-4322, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, v. 1, 2006.

CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. **Revista Analytica**, v. 5, p. 52-59, 2003.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Editora Manole LTDA, 2007.

DAI, Y.; HOGAN, S.; SCHMELZ, E. M.; JU, Y. H.; CANNING, C.; ZHOU, K. Selective Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells by Graviola Fruit Extract In Vitro and In Vivo Involving Downregulation of EGFR Expression. **Nutrition and Cancer**, v. 63, p. 795–801, 2011.

DIPLOCK, A. T. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 189S-193S, 1991.

ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. **Talanta**, v. 66, p. 307–331, 2005.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R. F. Bioavailability of Minerals and Trace Elements, v. 9, p. 295-324, 1996.

FÁVARO, D. I. T.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M. B. A.; COZZOLINO, S. M. F. Determinação de elementos minerais e traços por ativação neutrônica, em refeições

servidas no restaurante da Faculdade de Saúde Pública/USP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 176-182, 2000.

FILHO, A. D. A. B. et al. Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). 4^a. ed. Campinas: BookEditora, 2011.

FIORINI, L. S. Dossiê: Os minerais na alimentação. **Food Ingredients Brasil**, v. 4, 2008.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S. D.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1–15, 2006.

GOYER, R. A.; KLAASSEN, C. D.; WAALKERS, M. P. **Metal Toxicology**. Inc. San Diego: Academic Press, 1995.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 5-14, 2004.

IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. data interpretation Analytical chemistry division. **Spectrochimica Acta part B**, v. 33, p. 241, 1978.

IYENGAR, G. V.; SUBRAMANIAN, K. S.; WOITTIEZ, J. R. W. **Element Analysis of Biological Samples: Principles and Practice** (Elemental Analysis of Biological Systems). CRC-Press: Boca Raton, 1997.

IYENGAR, G. V.; SUBRAMANIAN, K. S.; WOITTIEZ, J. R. W. **Element Analysis of Biological Samples - Principles and Practice**. New York: CRC Press, 1998.

JOSÉ, A. R. S. **Cultivo e Mercado da Graviola**. Fortaleza-CE: Instituto Frutal, 2003.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSO, J. A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associated with Different Molecular Weight Fractions in Brazil Nuts. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5773–5780, 2004.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. D. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 846-857, 2008.

KRIS-ETHERTON, P. M.; ZHAO, G.; BINKOSKI, A. E.; M.COVAL, S.; ETHERTON, T. D. The Effects of Nuts on Coronary Heart Disease Risk. **Nutrition Reviews**, v. 59, p. 103-111, 2001.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª. ed. Piracicaba: [s.n.], 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; JORGE MANCINI-FILHO, R. F. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726-732, 2005.

LAJUNEN, L. H. J.; PERAMAKI, P. **Spectr ochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**. 2ª. ed. University of Oulu, Finland: The Royal Society of Chemistry, 2004.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v. 95, p. 644-652, 2006.

LIMA, É. C.; KRUG, F. J.; JACKSON, K. W. Evaluation of tungsten–rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 53, p. 1791-1804, Julho 1998.

LIMA, M. D. **Perfil Cromatográfico dos Extratos Brutos das Sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. Através da Cromatografia Líquida da Alta Eficiência**. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2007.

LUGOWSKI, S. J.; SMITH, D. C.; LUGOWSKI, J. Z.; PETERS, W.; SEMPLE, J. A review of silicon and silicone determination in tissue and body fluids – a need for standard reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 486–488, 1998.

MACHADO, F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. G.; MINIMA, L. A.; OLIVEIRA, F. C.; SOUSAA, R. D. C. S. Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, p. 1304–1307, 2007.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 79-87, 2004.

MANNING, T. J.; GROW, W. R. Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry. **The Chemical Educator**, v. 2, p. 1-19, 1997.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of green coffee varieties according to their metal content. **Analytica Chimica Acta**, v. 358, p. 177-183, 1998.

MENEZES, E. D. A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em Amostras de Carnes Bovinas, Suínas e de Frango In natura e Processadas Termicamente.** Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP. 2010.

MERMET, J.-M.; POUSSEL, E. ICP Emission Spectrometers:1995 Analytical Figures of Merit. **Applied Spectroscopy**, v. 49, p. 12-18, 1995.

MOHANTY, S. et al. Annona muricata (Graviola): Toxic or Therapeutic. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 31-33, 2008.

MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.** New York: Wiley-VCH, 1998.

MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry.** New York: Wiley-VCH, 1992.

NAOZUKA, J. **Especiação Química Elementar em Castanha-do-Pará, Coco e Cupuaçu.** Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Minimization of sample pretreatment for Al, Cu and Fe determination in coconut water by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 521-526, 2006.

NAOZUKA, J.; VIEIRA, E. C.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1667–1672, 2011.

NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. In vitro evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by off-line coupled SEC–UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 58–63, 2010.

NETO, O. D. P. **Determinação de Fósforo em Tônicos Fortificantes por Fotometria de Chama Usando um Titulador Fluxo-Batelada**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2006.

NOMURA, C. S.; CORREIA, P. R. M.; OLIVEIRA, P. V.; OLIVEIRA, E. W. Rh as Permanent Chemical Modifier in Simultaneous Atomic Absorption Spectrometry: Interference Studies on As, Cd, Pb and Se Determination. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 15, p. 75-82, 2004.

PATRIARCA, M.; MENDITTO, A.; FELICE, G. D.; PETRUCCI, F.; CAROLI, S.; MERLI, M.; VALENTE, C. Recent Developments in Trace Element Analysis in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Diseases. **Microchemical Journal**, v. 59, p. 194–202, 1998.

RODUSHKIN, I.; ENGSTRÖMA, E.; SÖRLIN, D.; BAXTER, D. Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish mark. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 290-304, 2008.

RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 180-189, 2003.

SACRAMENTO, C. K. D.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L. D.; BARRETTO, W. D. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 25, p. 329-331, 2003.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela LTDA, 1996.

SILVA, E. S. D. **Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para determinação de vanádio (V) em águas.** Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto. 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** 8ª. ed. São Paulo: Thomsom Learning, 2007.

SOUZA, A. L. ; LEMOS, S. G.; NAOZUKA J.; CORREIA P. R. M.; OLIVEIRA, P. V. Exploring the emission intensities of ICP OES aided by chemometrics in the geographical discrimination of mineral waters. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** , v. 26, p. 852-860, 2011.

SOUZA, M. G.; VIEIRA, E. C.; OLIVEIRA, P. V. Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, sapucaia, xixá e castanha-do-pará por espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v. 32, p. 1442-1446, 2009.

SPAZIANI, M.; OLIVEIRA, P. V. D.; CADORE, S.; OLIVEIRA, E. D. Determinação de alguns constituintes inorgânicos em amostras de vinhos por espectrometria atômica: ICP OES e ETAAS. **Revista Analytica**, v. 20, p. 48-54, 2006.

STEPAN, M.; MUSIL, P.; POUSSEL, E.; MERMET J. M. Matrix-induced shift effects in axially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p. 443-453, 2001.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 54-56, 2004.

SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, p. 442-465, 2005.

TATTINI, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. D. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 127-136, 2006.

THOMSON, C. D.; CHISHOLM A.; MCLACHLAN S. K.; CAMPBELL J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 379-384, 2008.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S.; CAMPOS, N. C.; NETO, J. M. M. *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food Chemistry*, v. 66, p. 197-200, 1999.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern Methods for Trace Element Determination**. USA: Wiley, 1997.

VIÉGAS, I. D. J. M.; FRAZÃO, D. A. C. **Graviola: Nutrição, calagem e adubação**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, p. 6p. 2004.

VONDERHEIDE A. P.; WROBEL K.; KANNAMKUMARATH S. S.; B'HYMER C.; MONTES-BAYÓN M.; DE LEÓN C. P.; CARUSO.J. A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5722-5728, 2002.

WALRAVENS, P. A. Nutritional Importance of Copper and Zinc in Neonates and Infants. **Clinical Chemistry**, v. 26, p. 185-189, 1980.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 2^a. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 1999.