

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

ALEXANDRE MINAMI FIOROTO

**Estudo de métodos para avaliar a
biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença
de mesocarpo de babaçu**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

27/06/2013

ALEXANDRE MINAMI FIOROTO

**Estudo de métodos para avaliar a biodisponibilidade
de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de
babaçu**

*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

2013

Nome: Fioroto, Alexandre Minami

Título: Estudo de métodos para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Thiago Regis Longo César da Paixão
IQ – USP

Profa. Dra. Célia Colli
FCF - USP

*Aos meus pais, Alceu e Magali, por todo o
carinho, apoio e incentivo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho, me proporcionando oportunidades que me fazem crescer e aprender, pela proteção que recebo diariamente e pela permissão de realizar mais essa conquista.

Ao Professor Pedro Vitoriano de Oliveira, pela orientação, incentivo, apoio e amizade. Agradeço pela oportunidade de aprendizado e seu cuidado, que vai além do projeto científico, se preocupando também com o desenvolvimento pessoal e bem estar de seus alunos.

Aos meus pais, Alceu e Magali, por todo amor e carinho, por estarem sempre presentes, me incentivando e apoiando em todos os momentos, pois sem eles não chegaria onde estou, nem teria conquistado tantas coisas boas em minha vida. Agradeço à minha mãe por ter a paciência de ouvir minhas preocupações e ouvir como foi o meu dia sempre que chego em casa, obrigado pela companhia.

À minha irmã Kátia e meu cunhado Ademir, por sempre desejarem o melhor para mim, pelo apoio, carinho e amizade,

À minha sobrinha e afilhada Luana, por toda alegria que me proporciona. Obrigado por todo seu carinho.

Aos meus padrinhos Dirceu e Maria pelo carinho, apoio e incentivo.

À minha amiga Karen pela companhia, carinho e amizade. Agradeço por estar sempre ao meu lado, pelas conversas, passeios e risadas.

Aos amigos Thiago, Carol, Cinthia e Vanessa.

Aos meus amigos da graduação, em especial ao Eder, à Jéssica e ao Alexandre.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria (GAPE): Angerson, Gislayne, Daniel, Maciel, Mariana, Valeska, Vivian, Rodrigo, Alexandre, Diego, Leandro, Guilherme, Karina, Luiza e Rosana pela companhia, colaboração, troca de conhecimentos e amizade.

Às Professoras Cassiana Seimi Nomura e Juliana Naozuka pelos ensinamentos, conversas e amizade.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade e infraestrutura oferecida para a realização do mestrado.

Aos Professores do Instituto de Química em especial Fabio Rodrigo Piovezani Rocha, Mauro Bertotti, Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Nina Coichev, Paulo Celso Isolani, Claudemir Lúcio do Lago, e pela colaboração para a minha formação, pelas disciplinas e monitorias.

Aos funcionários do IQ em especial para a Priscila e Luciana, técnicas do laboratório, pelas ajudas, conversas e amizade, e à Fernanda e à Fátima da Diretoria, pela amizade.

Às Professoras Marina Franco Maggi Tavares e Silvia Helena Pires Serrano, pela contribuição a esse trabalho ao compor a banca do meu exame de qualificação.

Aos Professores da Faculdade Oswaldo Cruz, que fizeram parte da minha formação. Em especial, agradeço ao Professor Lincoln Goncalves Couto e à Professora Maria Inês Almeida Gonçalves, que me incentivaram a cursar o mestrado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Obrigado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Fioroto, A. M. **Estudo de métodos para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu**. 2013. 93p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a disponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu, pois o mesocarpo contém compostos antinutricionais (fitato e lignina) que podem diminuir a disponibilidade de nutrientes minerais. As concentrações de Fe, Cu e Zn encontradas no mesocarpo de babaçu foram 17, 7,0 e 2,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para um melhor entendimento das interações dos elementos com o mesocarpo, foi realizada a extração de substâncias complexantes com soluções de NaOH (pH 7 e 12). Análises por espectrometria de absorção molecular indicaram que o principal complexante presente no extrato era o fitato. Soluções de Fe, Cu e Zn (10 a 300 mg L^{-1}) foram adicionadas aos extratos, para que, após agitação e centrifugação, fossem determinadas as recuperações desses elementos. Os resultados mostraram que os elementos formam complexos com o fitato e a solubilidade desses complexos é dependente da razão elemento/fitato, quanto maior essa razão menor é a solubilidade. Também foi avaliada a interação dos elementos com o sólido remanescente da extração. Fe, Cu ou Zn foram adicionados ao mesocarpo lavado. Não foi possível afirmar que houve interação do mesocarpo lavado com Fe e Cu devido à precipitação decorrente da hidrólise. Porém, o Zn não sofreu hidrólise e teve baixas recuperações, indicando que houve interação com o sólido. Além disso, pode ser observado que ao adicionar maiores concentrações de Zn obtiveram-se melhores recuperações, provavelmente devido à saturação dos sítios de ligação. Para os estudos de disponibilidade, foi utilizado o procedimento de digestão simulada *in vitro* da US Pharmacopeia. Fe e Zn não foram extraídos durante a digestão do mesocarpo, portanto esses elementos não estariam disponíveis para absorção pelo organismo. Entretanto, cerca de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu foi extraído do mesocarpo. Foram realizadas digestões do mesocarpo com adição de Fe, Cu e Zn e apenas 48% do Fe, 65% do Cu e 75% do Zn foram recuperados. Digestões contendo essa mesma concentração dos elementos foram realizadas com adições de Ca e Mg. A presença do Ca diminuiu a recuperação de Fe e Zn. Para simular uma situação próxima ao real, foram realizadas digestões gastrointestinais de leite, mistura de leite e mesocarpo e mistura de leite e lignina. Apesar do ferro presente no leite apresentar baixa disponibilidade, quando o mesmo foi misturado ao mesocarpo observou-se um aumento da concentração de Fe solúvel. Compostos presentes no leite ou no mesocarpo podem aumentar a solubilidade dos elementos. Não foi possível observar se havia alguma alteração da disponibilidade do Cu presente no leite na presença do mesocarpo, pois a concentração de Cu no leite é muito baixa. A fração de Zn solúvel na mistura de leite e mesocarpo permaneceu a mesma, porém a fração dialisável foi praticamente nula. A adição de lignina ao leite aumentou a extração dos elementos. Entretanto, esses elementos continuaram não sendo dialisados.

Palavras-chave: babaçu, mesocarpo, disponibilidade, fitato, lignina

ABSTRACT

Fioroto, A. M. **Study of methods to assess the bioavailability of Fe, Cu and Zn in the presence of mesocarp of babassu.** 2013. 93p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The aim of this study was to evaluate the availability of Fe, Cu and Zn in the presence of mesocarp of babassu because it contains antinutritional compounds (phytate and lignin) that may decrease the availability of mineral nutrients. The concentrations of Fe, Cu and Zn found in the mesocarp of babassu were 17, 7.0 and 2.6 mg g⁻¹, respectively. For a better understanding of elements interactions with mesocarp, it was performed the extraction of complexing substances with NaOH solutions (pH 7 and 12). Analysis by molecular absorption spectrometry indicated that the main complexing present in the extract was the phytate. Solutions of Fe, Cu and Zn (10 to 300 mg L⁻¹) were added to the extracts for determining the recoveries of these elements, after agitation and centrifugation. The results showed that the elements form complexes with phytate and the solubility of these complexes is dependent on the ratio element / phytate, the greater this ratio the lower the solubility. The elements interaction with the remaining solid from extraction was also evaluated. Fe, Cu or Zn were added to the washed mesocarp. It was not possible to affirm that there was interaction of washed mesocarp with Fe and Cu due to precipitation derived from hydrolysis. However, Zn did not suffer hydrolysis and had low recoveries, indicating that there was an interaction with the solid. Furthermore, it can be seen that adding higher concentrations of Zn, better recoveries were obtained, probably due to saturation of the binding sites. For the studies of availability, it was used an *in vitro* simulated digestion procedure from U.S. Pharmacopeia. Fe and Zn were not extracted during digestion of the mesocarp, therefore these elements would not be available for absorption by the organism. However, about 120 mg L⁻¹ of Cu was extracted from the mesocarp. Mesocarp digestions were performed with addition of Fe, Cu and Zn and only 48% of Fe, 65% of Cu and 75% of Zn were recovered. Digestions containing the same concentration of the elements were performed with additions of Ca and Mg. The presence of Ca decreased the recovery of Fe and Zn. For simulating a real situation, gastrointestinal digestion of milk, milk and mesocarp mixture and milk and lignin mixture were performed. Although the iron present in milk had low availability, when it was mixed with mesocarp it was observed an increase in the concentration of soluble Fe. Compounds present in milk or in mesocarp can increase the solubility of the elements. It was not possible to observe if there was any change in the availability of Cu present in milk in the presence of mesocarp, because the Cu concentration in the milk is very low. The fraction of soluble Zn in milk and mesocarp mixture remained the same, but the dialysable fraction was practically null. Lignin addition increases the milk elements extraction. However, these elements remain not dialyzed.

Keywords: babassu mesocarp, availability, phytate, lignin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CID - *Charge Injection Device*

CRM - Material de referência certificado, *Certified Reference Material*

F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*

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

HCL - Lâmpadas de cátodo oco, *Hollow cathode lamp*

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

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

LD - Limites de Detecção

LQ - Limites de Quantificação

RSD - Desvio padrão relativo, *Relative Standard Deviations*

SD - Desvio padrão, *Standard Deviation*

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

SIMAAS - Espectrômetro de absorção atômica simultânea, *Simultaneous Atomic Absorption Spectrometry*

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

USP - *United States Pharmacopeia*

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotografia do corte transversal de um babaçu. Fonte: LORENZI <i>et al.</i> (2006).....	19
Figura 2. Estrutura molecular do ferro-heme (a) e hemoglobina associada às moléculas de ferro-heme (b). Fonte: www.proteinstructures.com	24
Figura 3. Esquema de sistema de cultura de células Caco-2 para avaliação da disponibilidade de ferro	29
Figura 4. Fórmula estrutural do ácido Fítico. Fonte: QUIRRENBACH <i>et al.</i> , 2009...	30
Figura 5. Fórmulas estruturais da lignina: (a) Representação das unidades estruturais e (b) estrutura da lignina proposta por Adler (1977). Fonte: TEJADO <i>et al.</i> , 2007	32
Figura 6. Desenho esquemático ilustrando o processo de diálise.....	49
Figura 7. Curvas de pirólise para o Ferro (—♦—) e para o Cobre (—■—) e de atomização para o Ferro (—●—) e o Cobre (—▲—) em meio da amostra após digestão gastrointestinal.....	55
Figura 8. Curvas de calibração para o Ferro em meio aquoso (♦), em meio ao branco (■) e em meio da amostra (▲)	57
Figura 9. Curvas de calibração para o Cobre em meio aquoso (♦), em meio ao branco (■) e em meio à amostra (▲)	58
Figura 10. Extratos das adições crescentes de Fe(III) (10-400 mg L ⁻¹) à 100 mg de mesocarpo de babaçu, em pH=7, após separação do sólido remanescente.....	65
Figura 11. Gráfico de porcentagens de recuperação em função da concentração de Ferro adicionado ao mesocarpo de babaçu	65
Figura 12. Extratos obtidos em (a) pH 7 e (b) pH12	66

Figura 13. Espectro de absorvância do (—) ácido fítico, (—) extrato em pH 7 e (—) extrato em pH 12	67
Figura 14. Adição de Fe, Cu e Zn aos extratos em pH 7 e 12 (10-300mg.L ⁻¹)	69
Figura 15. Recuperação do (—■—) Ferro, (—▲—) Cobre e (—◆—) Zinco adicionados aos extratos preparados em (a) pH 7 e (b) pH 12 e ajustados para pH 7	70
Figura 16. Recuperação do (—■—) Ferro, (—▲—) Cobre e (—◆—) Zinco adicionados ao mesocarpo lavado	71
Figura 17. Mesocarpo em digestão gastrointestinal (a) com e (b) sem adição de solução multielementar (Fe, Cu e Zn)	75
Figura 18. Mesocarpo em digestão gastrointestinal com adição de (a) solução multielementar (Fe, Cu e Zn), (b) solução multielementar com Ca e (c) solução multielementar com Mg	77
Figura 19. Disponibilidade de Fe em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).....	79
Figura 20. Disponibilidade de Cu em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).....	80
Figura 21. Disponibilidade de Zn em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da farinha de mesocarpo de babaçu	22
Tabela 2. Parâmetros instrumentais e operacionais adotados para o F AAS	39
Tabela 3. Parâmetros operacionais e instrumentais adotados para o SIMAAS	40
Tabela 4. Parâmetros instrumentais e comprimentos de onda adotados para as determinações por ICP OES	43
Tabela 5. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas	46
Tabela 6. Programa de aquecimento para determinação simultânea de Fe e Cu por SIMAAS	56
Tabela 7. Programa de aquecimento para determinação Cu por GF AAS	59
Tabela 8. Valores de LDs e LQs para a determinação elementar total e análise da digestão <i>in vitro</i> por ICP OES	60
Tabela 9. Resultados das determinações de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg nos materiais de referência certificados	61
Tabela 10. Resultados das determinações de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg nas amostras de leite e mesocarpo	62
Tabela 11. Concentrações de Fe, Cu e Zn solubilizado durante a digestão gastrointestinal simulada do mesocarpo de babaçu	73
Tabela 12. Recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo de babaçu na digestão simulada <i>in vitro</i> com interrupção após etapa da digestão gástrica	74
Tabela 13. Recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo de babaçu após o processo de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	75
Tabela 14. Concentração de Fe, Cu e Zn solúvel durante digestão gastrointestinal simulada de mesocarpo de babaçu com adição de Ca e Mg	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O babaçu	18
1.2. Importância nutricional dos elementos Fe, Cu e Zn	23
1.3. Estudos de biodisponibilidade	25
1.4. Compostos antinutricionais	30
2. OBJETIVO	34
3. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Instrumentação	35
3.2. Materiais, reagentes e soluções.....	37
3.3. Amostra.....	38
3.4. Procedimento Experimental	39
3.4.1. Otimização dos parâmetros instrumentais	39
3.4.1.1. Espectrômetro de absorção atômica com chama	39
3.4.1.2. Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite.....	40
3.4.1.3. Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado	42
3.4.2. Digestão ácida das amostras para determinação elementar total	44
3.4.3. Avaliação da interação de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo de babaçu.....	46
3.4.3.1. Teste de adição e recuperação de Fe ao mesocarpo de babaçu	46
3.4.3.2. Extração de complexantes do mesocarpo de babaçu	47
3.4.3.3. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn nos extratos	47
3.4.3.4. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn ao mesocarpo lavado	48
3.4.4. Procedimento geral para digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	48
3.4.4.1. Digestão gastrointestinal do mesocarpo de babaçu	50
3.4.4.2. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Fe, Cu e Zn	51
3.4.4.3. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Ca e Mg	52
3.4.4.4. Digestão gastrointestinal de leite, mistura de leite com mesocarpo e mistura de leite com lignina	52

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Resultados das otimizações instrumentais	54
4.1.1. Espectrômetro de absorção atômica com chama	54
4.1.2. Espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite	54
4.1.3. Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado	59
4.2. Determinação elementar após digestão em forno de micro-ondas	61
4.3. Avaliação da interação de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo de babaçu	64
4.3.1. Teste de adição e recuperação de Fe ao mesocarpo de babaçu	64
4.3.2. Extração de complexantes do mesocarpo de babaçu	66
4.3.3. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn nos extratos	67
4.3.4. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn no mesocarpo lavado	70
4.4. Digestões simuladas <i>in vitro</i>	72
4.4.1. Digestão gastrointestinal do mesocarpo de babaçu	72
4.4.2. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Fe, Cu e Zn	73
4.4.3. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Ca e Mg	75
4.4.4. Digestão gastrointestinal de leite, mistura de leite com mesocarpo e mistura de leite com lignina	78
5. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
SÚMULA CURRICULAR	i

1. INTRODUÇÃO

Diversos elementos desempenham um papel importante para o bom funcionamento do organismo humano. 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., 1988). Cerca de 21 elementos são considerados essenciais para o bom funcionamento do organismo, alguns deles, como P, Ca, S, Cl, K, Mg e Na são encontrados nos alimentos em maiores concentrações, enquanto outros elementos, por terem baixas concentrações, são denominados de elementos traços, entre eles estão o Cu, Co, Cr, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V e Zn (WALRAVENS, 1980; PATRIARCA et al., 1988; FÁVARO *et al.*, 2000).

Os nutrientes minerais são de extrema importância para manter a boa saúde dos seres humanos. Entretanto, tais elementos não são produzidos pelo organismo, sendo necessário que seu fornecimento seja oriundo de fontes externas, a partir da ingestão de alimentos e suplementos nutritivos (Dossiê: os minerais na alimentação, 2008). Os valores de ingestão diária de nutrientes são estabelecidos com o objetivo de suprir as necessidades do organismo e garantir a saúde do indivíduo. O consumo de nutrientes minerais abaixo ou acima dos valores recomendados pode trazer riscos à saúde e, em casos mais agudos levar a morte do indivíduo (WHO, 1996).

O Brasil é um país que possui grande diversidade de frutos, que são importantes fontes de minerais, bem como de outros nutrientes essenciais para o organismo humano. Entretanto, muitos frutos da flora brasileira ainda têm composição pouco conhecida e, desta forma, não é possível caracterizá-los quanto ao valor nutricional em termos dos minerais. Além da falta de conhecimento em

termos de composição, muitos desses frutos são tipicamente regionais e ainda não são explorados comercialmente, por isso, não estão disponíveis para toda a população brasileira.

Apesar da enorme diversidade de frutos disponíveis na nossa flora, no Brasil existe um grave problema de saúde pública, que é a desnutrição infantil. A deficiência de nutrientes tem ocasionado o baixo peso, atraso no crescimento e a vulnerabilidade a diversos tipos de infecções. Esses problemas nutricionais ocorrem em todas as regiões e estados brasileiros, mas são agravados principalmente nas regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). De um modo geral, têm-se poucas informações a respeito de quais são as principais deficiências de micronutrientes no país, porém sabe-se que o maior problema relacionado a esse aspecto tem sido a anemia causada pela deficiência de ferro (ferropriva) (COZZOLINO, 2007).

Uma alimentação balanceada e adequada é de fundamental importância para se ter uma população saudável e pode prevenir os riscos de anemia ferropriva e de outras doenças provocadas pela deficiência de minerais essenciais. Para isso, é necessário que se tenha conhecimento da composição química dos alimentos e dos vários fatores sinérgicos relacionados à ingestão dos mesmos, sozinhos ou combinados entre si. A composição química, seja mineral ou não, é conhecida a partir de análises químicas. Em muitos casos, são necessários métodos analíticos sensíveis, sobretudo para a determinação dos micronutrientes. Por outro lado, informações sobre a biodisponibilidade (ou disponibilidade) desses micronutrientes requerem estudos *in vitro* ou *in vivo*, os quais são feitos a partir da simulação de digestão gastrointestinal ou diretamente com seres vivos. Nesses casos, a análise química é fundamental e de extrema importância porque, a partir dos resultados

analíticos, é possível fazer interpretações que levem a elaboração de uma dieta equilibrada e entenda mais profundamente o papel dos alimentos e suas relações para o bom funcionamento do corpo humano.

1.1. O babaçu

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é um fruto nativo de regiões brasileiras, que pode ser encontrado, principalmente, nos estados do Maranhão, Mato Grosso e Piauí (LORENZI *et al.*, 2006; PASCOAL; BEZERRA; GONÇALVES, 2006). O babaçueiro, apesar de ser uma palmeira não cultivada, é abundante na natureza (LORENZI *et al.*, 2006). Atividades extrativistas envolvendo esse fruto tem sido de grande importância econômica e social para comunidades do Maranhão (Globo Rural, 2011; PINHEIRO; FRAZÃO, 1995).

O babaçu é constituído de epicarpo, mesocarpo (polpa seca e farinácea), endocarpo (material lenhoso e duro) e amêndoas (sementes oleaginosas) (SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009; MELO *et al.*, 2007). A Figura 1 traz uma foto do corte transversal de um coco de babaçu, mostrando claramente cada uma das partes acima mencionadas.

O principal produto retirado do babaçu são as amêndoas, que servem de matéria prima para indústrias cosméticas e alimentícias e também para a produção de biocombustível (LORENZI *et al.*, 2006; Globo Rural, 2011). Na alimentação, as amêndoas podem ser consumidas *in natura*, como castanhas, ou empregadas na culinária na forma de óleo. Uma farinha proteica resultante da extração do óleo da castanha também tem sido utilizada na culinária (SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009; PASCOAL; BEZERRA; GONÇALVES, 2006).

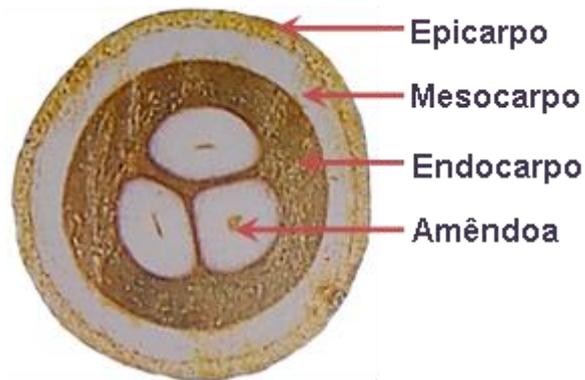


Figura 1. Fotografia do corte transversal de um coco de babaçu. Fonte: LORENZI *et al.* (2006)

Visando ao aproveitamento total do fruto, o mesocarpo, que antes era descartado, começou a ser utilizado para diferentes fins e se tornou um importante subproduto das atividades extrativistas do babaçu.

O mesocarpo de babaçu vem sendo proposto como material biossorvente para tratamento de resíduos, agindo na remoção de corantes têxteis orgânicos (VIEIRA *et al.*, 2009) e de um corante metalado, a ftalocianina de cobre (VIEIRA *et al.*, 2011). Também foram propostos, tratamentos químicos do mesocarpo para a remoção de cobre inorgânico de água (VIEIRA *et al.*, 2010; SANTANA *et al.*, 2010). Além disso, existe um procedimento de modificação química do mesocarpo de babaçu para a remoção de íons metálicos (AIROLDI *et al.*, 2012).

Trabalhos científicos de interesses pecuários avaliaram a adição de mesocarpo de babaçu a rações (PASCOAL; BEZERRA; GONÇALVES, 2006), sendo este considerado uma fonte energética alternativa para a alimentação animal, podendo substituir o capim da ração de ovinos (MIOTTO *et al.*, 2012b) ou o milho fornecido para bovinos (MIOTTO *et al.*, 2012a; SILVA *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2012).

Baruque Filho e colaboradores apresentam uma proposta de produção de combustível utilizando o mesocarpo de babaçu. Um processo em escala industrial é descrito para a produção de etanol, por meio de processos enzimáticos e fermentação do amido presente no mesocarpo (BARUQUE FILHO *et al.*, 1998).

Segundo relatos populares, o mesocarpo de babaçu apresenta algumas propriedades medicinais. Entrevistas feitas com mulheres que trabalham na extração de amêndoas de babaçu indicam que o mesocarpo tem sido usado principalmente para o tratamento de gastrites e doenças inflamatórias. Acredita-se, também, que o mesocarpo pode trazer benefícios para dores, constipação, obesidade, reumatismo, úlcera e doenças inflamatórias, como a colite e artrite (SOUZA *et al.*, 2011). Alguns trabalhos tem demonstrado o interesse de estudar as possíveis propriedades medicinais do mesocarpo, como por exemplo, um trabalho de Azevedo e colaboradores que comprovou o benefício do uso de mesocarpo como tratamento para trombose, a partir de um estudo *in vivo* com camundongos (AZEVEDO *et al.*, 2007).

O mesocarpo também tem sido incluído na alimentação humana. Transformado em farinha, ele é utilizado no preparo de bolos, pães e mingaus, ou adicionado a sucos, vitaminados e ao leite (LORENZI *et al.*, 2006; SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009).

O mesocarpo tem sido utilizado para substituir 20% da farinha de trigo no preparo de pães destinados à alimentação de crianças em algumas escolas no município de Itapecuru Mirim, Maranhão. Nutricionistas indicam essa adição pelo fato do mesocarpo de babaçu conter carboidratos, proteínas, lipídios e fibras (informações apresentadas no Programa Globo Rural, 2011). Em São João do Arraial, Piauí, o mesocarpo também tem sido usado na merenda escolar. A farinha

de mesocarpo é adicionada ao leite, preparando-se uma bebida similar a um achocolatado (informações apresentadas no Programa TV Cidade Verde, 2009).

Além disso, o Governo Federal tem incentivado a adição de mesocarpo de babaçu à merenda escolar de algumas comunidades do interior do Maranhão como medida de combate ao beribéri, pois se acredita que ele possa ser uma fonte de vitamina B1 (SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009; MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL, 2006).

Na Tabela 1 encontram-se algumas substâncias que fazem parte da composição da farinha de mesocarpo de babaçu. Os valores foram extraídos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA-UNICAMP, 2011). As concentrações da composição elementar da tabela TACO foram comparadas com os valores determinados por Naozuka e colaboradores (NAOZUKA *et al.*, 2011). Nesse caso, merece destaque a concentração de Fe, cerca de 10 vezes menores do que aqueles reportados na tabela TACO. Os teores de vitaminas da tabela TACO são muito baixos, o que contradiz as informações dadas pelo Governo Federal com respeito à elevada concentração de Vitamina B1.

Tabela 1. Composição da farinha de mesocarpo de babaçu.

Parâmetros/ Compostos	NEPA- UNICAMP, 2011	Elemento	NEPA- UNICAMP, 2011 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	NAOZUKA <i>et al.</i> ,2011 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Umidade (%)	15,8	Fe	183	16 \pm 0
Energia (kcal)	329	Cu	2,2	2,1 \pm 0,1
Proteína (g/100g)	1,4	Zn	3	2,4 \pm 0,2
Lipídeo (g/100g)	0,2	Ca	610	432 \pm 2
Carboidrato (g/100g)	79,2	Mg	390	679 \pm 8
Fibra Alimentar (g/100g)	17,9	Mn	3,8	<0,010
Cinzas (g/100g)	3,4	P	260	456 \pm 22
Tiamina (mg/100g)	< 0,005	Na	120	NA
Riboflavina (mg/100g)	< 0,005	K	3620	4224 \pm 147
Piridoxina (mg/100g)	< 0,005			
Niacina (mg/100g)	2,58			
Ácido Ascórbico (mg/100g)	< 0,05			

NA: determinação não realizada

Um estudo recente mostrou que Cu e Fe apresentam forte interação com o mesocarpo de babaçu durante simulação *in vitro* de digestão gastrointestinal. Uma das conclusões desse trabalho foi que a lignina, presente no mesocarpo de babaçu (1,5% m m⁻¹), poderia ser um dos constituintes principais que complexa esses elementos durante, principalmente, a digestão intestinal (SOUZA, 2011). Se isso for comprovado para estudos com humanos, o mesocarpo pode ter um efeito negativo diferente ao que tem sido divulgado nos meios de comunicação e literatura regional.

Espera-se que os resultados obtidos com essa dissertação, juntamente com os anteriores possam criar um alerta de que a adição de mesocarpo à merenda escolar poderia agravar o quadro de anemia ferropriva, bastante comum em regiões do nordeste brasileiro, e de outros micronutrientes minerais importantes.

1.2. Importância nutricional dos elementos Fe, Cu e Zn

O ferro desempenha funções importantes para o organismo, ele é um nutriente essencial para o crescimento humano, desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico (MARQUES *et al.*, 2012). O ferro atua no transporte de oxigênio, transferência de elétrons e como co-fator de enzimas, inclusive na síntese do DNA. Nos alimentos, o ferro é encontrado em duas formas, heme (Figura 2a) e não heme (LOMBARD; CHUA; O'TOOLE, 1997). O ferro-heme pode estar associado a proteínas, como a hemoglobina (Figura 2b) e presente nos músculos ligado à mioglobina (HENRIQUES; COZZOLINO, 2007). O ferro da hemoglobina liga-se ao oxigênio nos pulmões e o transporta para músculos e outros tecidos. A biodisponibilidade do ferro é afetada dependendo da forma na qual ele se encontra, o ferro-heme presente em carnes é mais bem absorvido pelo organismo do que as espécies de ferro não heme, que são encontradas em vegetais e cereais (LOMBARD; CHUA; O'TOOLE, 1997).

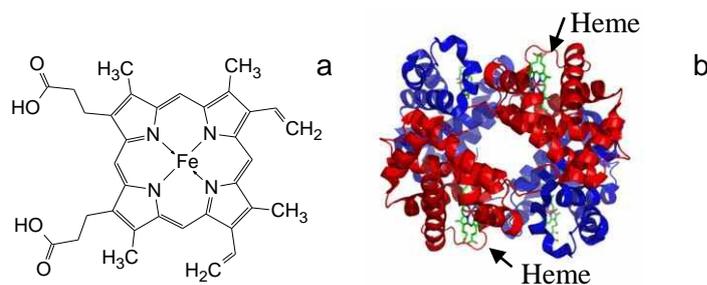


Figura 2. Estrutura molecular do ferro-heme (a) e hemoglobina associada às moléculas de ferro-heme (b). Fonte: www.proteinstructures.com.

A deficiência de ferro pode causar a anemia, ou seja, a redução de hemoglobinas circulantes, o que afeta a oxigenação de tecidos. Os sintomas apresentados da anemia são: diminuição da capacidade de trabalho, apatia, cansaço, respiração curta, palpitação, dores de cabeça, tontura e irritabilidade (HENRIQUES; COZZOLINO, 2007).

O cobre é um constituinte de diversas enzimas com atividades de oxidação e redução, sua função no sistema biológico está relacionada à ação dessas metaloenzimas (PEDROSA; COZZOLINO, 2007). Reações metabólicas importantes são dependentes dessas enzimas associadas ao cobre, tais como o consumo de oxigênio durante a respiração celular e a síntese de proteínas de tecidos conjuntivos e vasos sanguíneos (WHO, 1996). O cobre também está envolvido no metabolismo ósseo, resposta imunológica e na prevenção de doenças cardiovasculares (PEDROSA; COZZOLINO, 2007). Em destaque, o cobre exerce uma função importante para absorção de ferro pelo organismo e sua deficiência pode conduzir o indivíduo a um quadro de anemia que não responde a terapia com Fe. Isto ocorre porque o cobre está associado a uma enzima que catalisa a oxidação de Fe(II) para Fe(III) na ferritina, permitindo que o mesmo seja transferido para a transferrina,

sendo que este mecanismo é essencial para absorção pelo organismo (PEDROSA; COZZOLINO, 2007).

O zinco é essencial para a ação catalítica de mais de 300 enzimas (YUYAMA *et al.*, 2007). Entre as diversas funções dessas metaloenzimas dependentes de zinco, encontra-se a síntese de RNA e DNA e o metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (MAFRA; COZZOLINO, 2004). Além disso, o zinco atua na estabilização da estrutura molecular de componentes subcelulares e membranas. A deficiência de zinco pode afetar a concentração do hormônio de crescimento, ocasionando um retardamento do crescimento, bem como da maturação sexual e óssea (MAFRA; COZZOLINO, 2004; WHO, 1996). O zinco, também, está relacionado ao sistema imune, portanto sua deficiência pode tornar o organismo mais suscetível às infecções. O desenvolvimento de dermatite, diarreia, falta de apetite, alterações comportamentais também podem estar relacionadas à carência desse elemento no organismo (WHO, 1996).

1.3. Estudos de biodisponibilidade

Sabe-se que os nutrientes de uma dieta não são completamente absorvidos pelo organismo. O termo biodisponibilidade, que inicialmente era utilizado na área de farmacologia, passou a ser empregado em estudos nutricionais, para estabelecer a fração de nutrientes ingeridos que é aproveitado pelo organismo para suprir as demandas fisiológicas em tecidos alvos (COZZOLINO; MICHELAZZO, 2007).

Existem diversas metodologias *in vivo* para estimar a biodisponibilidade de nutrientes. O balanço químico avalia a diferença entre o que foi consumido e excretado. O método de repleção avalia o quanto o organismo consegue se

recuperar depois de uma etapa de depleção. Em outro método é quantificado o aparecimento do nutriente no plasma sanguíneo, após a sua ingestão. Em algumas propostas, radioisótopos são utilizados como traçadores, que podem ser rastreados no organismo e assim seu metabolismo pode ser acompanhado. Isótopos estáveis também são utilizados para estimar a biodisponibilidade, porém não possibilitam o rastreamento de elementos (RIBEIRO; COZZOLINO, 2007; FAIRWEATHER-TAIT, 1992).

Apesar de serem mais exatos, os métodos *in vivo* são mais trabalhosos e demorados, sendo também necessário que se tenha a aprovação de um Comitê de Ética para a Pesquisa. Os métodos *in vitro*, comparados aos *in vivo*, são mais simples, rápidos e de baixo custo. Por ter maior controle das condições experimentais e poder avaliar diferentes etapas da digestão, os métodos *in vitro* podem trazer informações que não são alcançadas em todos os estudos com animais (MILLER *et al.*, 1981; HUR *et al.*, 2011).

Os métodos *in vitro* são baseados em simulações da digestão humana e permitem apenas estimar a disponibilidade de nutrientes, quantificando as frações solúveis ou dialisáveis. Seria incorreto dizer que as digestões simuladas avaliam a biodisponibilidade, pois nesses métodos não são reproduzidas a maioria dos fatores fisiológicos. São modelos que podem apresentar boa correlação com os métodos *in vivo*, mas não se tem a garantia de que todo nutriente disponível será utilizado ou estocado pelo organismo. Entretanto, auxiliam o entendimento de certos sistemas, e a partir dessas informações, caso necessário, podem ser sugeridos ensaios *in vivo* (RIBEIRO; COZZOLINO, 2007).

Os métodos de digestão simulada *in vitro* aplicados a estudos de disponibilidade podem variar o número de etapas da digestão representadas e a

composição dos fluídos utilizados (HUR *et al.*, 2011). O modelo proposto pela United States Pharmacopeia (USP) é um dos mais aceitos e empregados. Neste procedimento são simuladas as duas principais etapas da digestão humana, a digestão gástrica e intestinal. Para representar os fluídos liberados no estômago são utilizadas soluções contendo ácido clorídrico e pepsina. O ácido clorídrico desnatura proteínas tornando as ligações peptídicas mais acessíveis à ação das enzimas. A pepsina é uma protease, que atua na decomposição das proteínas. Durante a digestão no organismo, quando o conteúdo gástrico chega ao intestino é liberado bicarbonato (HCO_3^-) pelo pâncreas com a finalidade de neutralizar a acidez proveniente do estômago. Portanto nessa etapa, antes de adicionar o fluído intestinal recomenda-se ajustar o pH para 6,8 com solução de NaHCO_3 . O fluído intestinal é constituído de pancreatina e sais biliares. A pancreatina é composta por amilase, lipase e proteases, que são responsáveis pela digestão de amidos, lipídeos e proteínas, respectivamente. Os sais biliares são esteroides, que tem um papel importante na digestão de gorduras, pois atuam como surfactantes, solubilizando os lipídios e permitindo que estes tenham uma melhor interação com as enzimas (SILVERTHORN, 2003; US Pharmacopeia XXIV & National Formulary, 2000).

A análise do sobrenadante das digestões simuladas *in vitro* fornecem informações da solubilidade dos nutrientes. Elementos solúveis estão mais propensos a serem absorvidos pelo organismo. Porém esses nutrientes podem estar associados a moléculas de alta massa molecular, impedindo sua absorção. A inclusão de uma etapa de diálise com membrana de celulose pode ser útil para fazer esse tipo de avaliação. No trabalho de Nascimento e colaboradores foi avaliada a disponibilidade de Fe em castanhas de caju. As frações solúveis e o conteúdo retido durante a diálise das amostras foram analisados por cromatografia de exclusão por

tamanho com detecção UV (SEC-UV) acoplado a um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). A utilização de duas técnicas de detecção permitiu relacionar perfis moleculares e elementares. Os resultados indicaram que o Fe associado a espécies com cerca de 9,2 kDa não foi completamente dialisado, portanto não estaria disponível (NASCIMENTO; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2010).

Uma etapa adicional empregada a estudos de disponibilidade de Fe que tem sido encontrada na literatura é a cultura de células Caco-2 (células de carcinoma do cólon humano) (HUR *et al.*, 2011). Estas células apresentam propriedades funcionais e morfológicas parecidas com as células intestinais responsáveis pela absorção de nutrientes minerais. O uso desse método aproxima-se mais das condições reais do organismo, incluindo fatores fisiológicos ao experimento. A cultura dessas células é feita sobre uma membrana porosa de uma câmara apropriada, esquematizada na Figura 3. Essa membrana é inserida em uma segunda câmara (câmara basal). Então, após se realizar a digestão simulada *in vitro* da amostra, a fração solúvel é adicionada na câmara apical. Depois de um período de incubação esse sistema permite a estimativa do consumo do elemento, a partir da análise das células, e a fração transportada pode ser determinada no conteúdo da câmara basal (PERALES *et al.*, 2007; GLAHN *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2010).

Em ambos os casos (estudos *in vivo* e *in vitro*) a química analítica apresenta um papel relevante no desenvolvimento de métodos para a determinação de espécies de interesse. As amostras possuem grande diversidade e, na maioria das vezes, apresentam matrizes complexas, que tornam a análise um desafio. Portanto é necessário que se tenha um bom conhecimento sobre o preparo das amostras e domínio das técnicas analíticas empregadas. Além disso, no caso de estudos com

nutrientes minerais, as concentrações que já são baixas, se tornam ainda menores quando se deseja avaliar a fração biodisponível (ou disponível), tornando o desafio ainda maior. Deste modo, os cuidados durante o preparo de amostra e o uso de técnicas de alta sensibilidade, como por exemplo, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é primordial para o sucesso das análises.

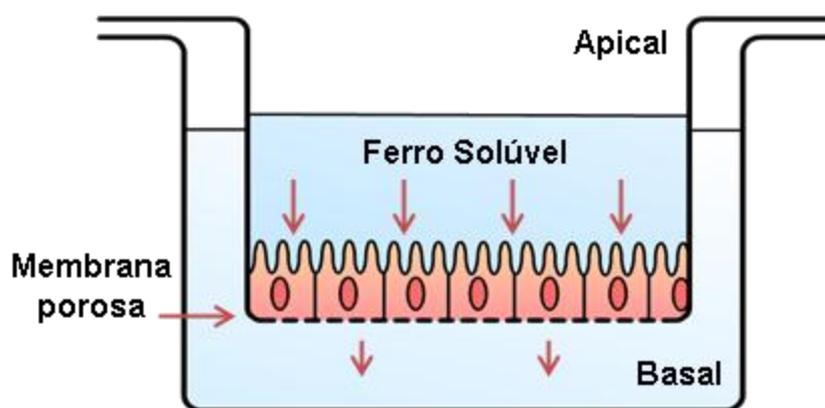


Figura 3. Esquema de sistema de cultura de células Caco-2 para avaliação da disponibilidade de ferro.

A biodisponibilidade dos nutrientes é dependente de sua forma química, quantidade ingerida, presença de outros nutrientes e agentes ligantes encontrados na dieta. Também existem os fatores fisiológicos, como a genética, idade, sexo, saúde e gravidez (FILISSETTI; LOBO, 2007). O estado nutricional do indivíduo também pode alterar a biodisponibilidade dos nutrientes. A absorção de Fe, por exemplo, depende de sua concentração no organismo. Mecanismos que ocorrem nas células intestinais podem aumentar a biodisponibilidade do elemento quando o indivíduo encontra-se anêmico (LOMBARD; CHUA; O'TOOLE, 1997). Fibras insolúveis, fitatos, polifenóis, oxalatos, taninos e flavonoides, conhecidos como

compostos antinutricionais, podem afetar negativamente a biodisponibilidade de minerais (FILISSETTI; LOBO, 2007; COSTA; ROSA, 2008).

1.4. Compostos antinutricionais

O ácido fítico, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 4, é abundante em cereais, leguminosas, castanhas, sementes oleaginosas e tubérculos. Tem a função de reservar grupos fosfatos reativos e estocar energia nas plantas (SILVA; SILVA, 1999; DOST; TOKUL, 2006). Em pH próximo ao encontrado na região intestinal, o ácido fítico é fortemente ionizável e a elevada densidade de carga negativa proveniente dos grupos fosfatos lhe permite interagir com íons metálicos e formar complexos estáveis, tornando-os indisponíveis para absorção pelo organismo humano (QUIRRENBACH *et al.*, 2009; DOST; TOKUL, 2006; SILVA; SILVA, 1999; KUMAR *et al.*, 2010).

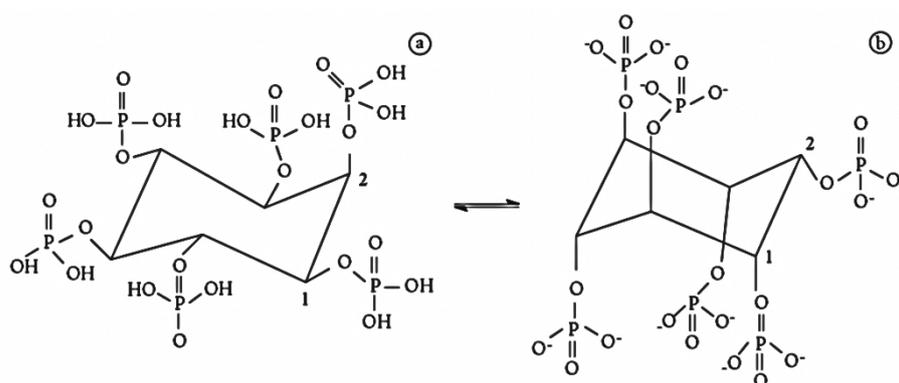


Figura 4. Fórmula estrutural do ácido Fítico. Fonte: QUIRRENBACH *et al.*, 2009.

As fibras alimentares são consideradas uma classe de compostos derivados de vegetais, que não sofrem hidrólise, digestão e absorção pelo intestino humano.

Essas fibras incluem polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e outras substâncias associadas à planta (FILISSETTI; LOBO, 2007) e por possuir a capacidade de se associar a íons metálicos em soluções, também podem apresentar uma influência negativa em relação à biodisponibilidade de elementos essenciais para o organismo (FILISSETTI; LOBO, 2007; TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1995).

A lignina, constituinte da parede celular de vegetais, é uma macromolécula polifenólica, constituída basicamente de três monômeros, guaiacil, siringil e p-hidroxifenilpropano (Figura 5a). Sua estrutura complexa pode ser encontrada com diversas variações em seus grupos funcionais (Figura 5b) (TEJADO *et al.*, 2007). A lignina é inserida na alimentação a partir de cereais, frutas e vegetais (FLY; FAHEY JUNIOR; CZARNECKI-MAULDEN, 1998). A estrutura rígida da lignina torna-a resistente à digestão, além do mais, possui a capacidade de se ligar a metais, portanto, quando elementos essenciais são associados a ela, esses podem não ser absorvidos pelo organismo (TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1995; FLY; FAHEY JUNIOR; CZARNECKI-MAULDEN, 1998).

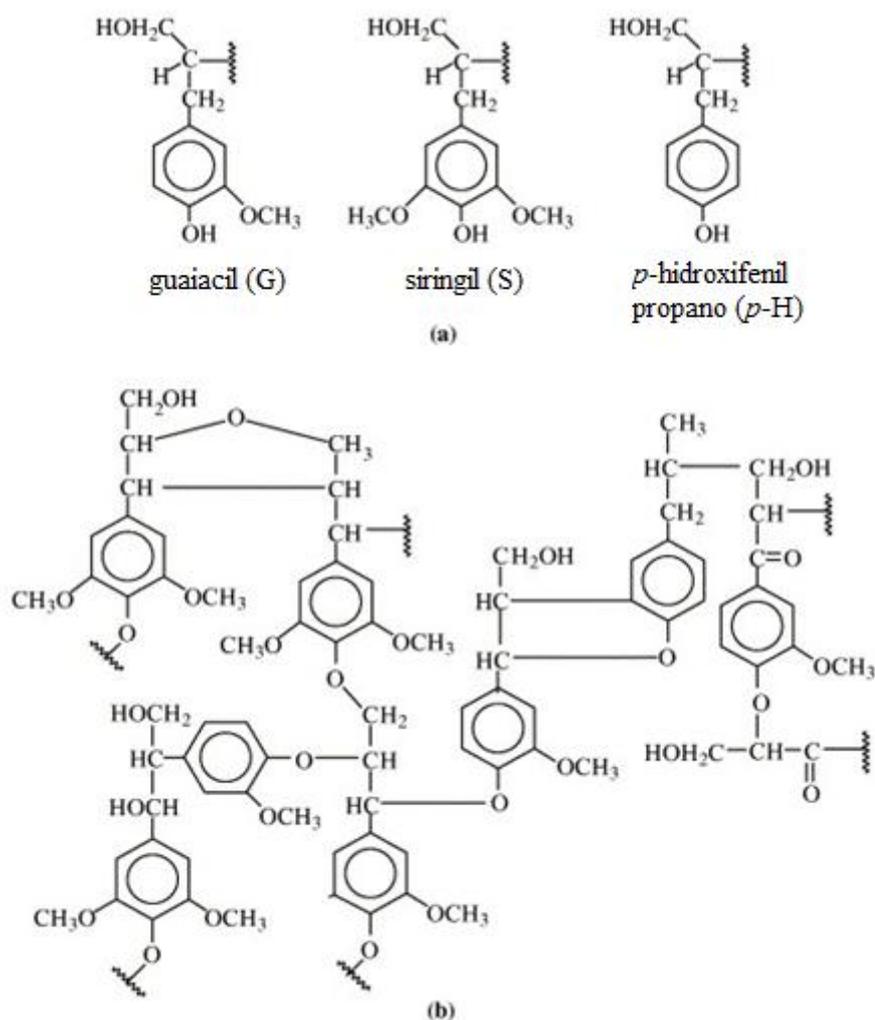


Figura 5. Fórmulas estruturais da lignina: (a) Representação das unidades estruturais e (b) estrutura da lignina proposta por Adler (1977). Fonte: TEJADO *et al.*, 2007.

Apesar da existência de compostos com propriedades antinutricionais, para que seja feita uma avaliação adequada da qualidade de um alimento é preciso realizar um balanço entre os benefícios e os efeitos negativos que ele pode ocasionar. Muitos alimentos apresentam prós e contras, portanto é necessário identificar também os prejuízos gerados pelo seu consumo. Por exemplo, fibras apresentam características antinutricionais, relacionadas à diminuição da biodisponibilidade de metais, porém seu consumo é indicado por nutricionistas, e

apresenta benefícios para a saúde, como a redução de colesterol (COSTA; ROSA, 2008).

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi o estudo de métodos para avaliar a disponibilidade de Fe, Cu e Zn em leite integral em pó na presença de mesocarpo de babaçu, por meio de digestões gastrointestinais simuladas *in vitro* e estudo das interações entre os elementos e o mesocarpo, utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) como técnicas de detecção.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama (F AAS), modelo AAS vario 6 (AnalytikJenaAG, Jena, Alemanha), com amostrador automático, modelo AS52, do mesmo fabricante. Nas determinações de Fe, Cu e Zn foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (HCL) (Narva, Alemanha).

Também foi utilizado na pesquisa um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), modelo iCAP 6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Inglaterra), com vista axial e radial, detector simultâneo CID (Charge Injection Device), com intervalo de trabalho de 166,25 a 847,0 nm, 383 mm de distância focal, policromador Echelle com 52,91 linhas/mm e fonte de radiofrequência de 27,12 MHz, que permite ajuste da potência aplicada de 750 a 1350 W. O gás utilizado para purgar a ótica e permitir a escolha de linhas de emissão na região do ultravioleta e para formar o plasma foi argônio grau solda, com pureza 99,998% v v⁻¹ (Oxilúmen, São Paulo, SP, Brasil).

Quando a análise exigia uma técnica de maior sensibilidade, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e detecção simultânea, modelo SIMAA 6000[®] (PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA), equipado com corretor de radiação de fundo por efeito Zeeman longitudinal, forno de grafite com plataforma integrada e aquecimento transversal, arranjo ótico do tipo Echelle e detector de estado sólido, composto por um arranjo de 60 fotodinodos, com capacidade para detecção simultânea. Lâmpadas de cátodo oco de Cu e Fe do mesmo fabricante foram utilizadas.

Também foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), modelo ZEE nit 60 (AnalytikJenaAG, Jena, Alemanha), dotado de lâmpadas de catodo oco, corretor de fundo baseado no efeito Zeeman com campo variável e amostrador automático, modelo MPE60, do mesmo fabricante.

Argônio grau solda, com pureza 99,998% v v⁻¹ (Oxilúmen, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como gás de proteção do tubo de grafite e como gás de purga.

Os extratos de mesocarpo e as soluções de ácido fítico foram analisados em um espectrofotômetro de absorção molecular, modelo 8453 (Agilent Technologies, California, EUA), dotados de lâmpadas de tungstênio e de deutério e um arranjo de fotodiodos, que possibilita a medição simultânea do espectro completo da região do ultravioleta e visível.

Para a digestão das amostras e material de referência certificado foi utilizado um forno de micro-ondas de alta pressão, com cavidade, modelo Speedwave[®] OPC four (Berghof, Eningen, Alemanha), equipado com 12 frascos de TFM[™]PTFE (modelo DAC-17) e sensores de infravermelho (IR) não invasivos para medidas individuais de temperatura e pressão em cada frasco.

Para a pesagem das amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica (Ohaus Adventurer, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão de até 0,0001g.

Um medidor de pH, modelo PH-710 (Unity, Guarulhos, SP, Brasil) com resolução de 0,01 e precisão de $\pm 0,1$, foi utilizado durante o ajuste de pH da amostra.

A secagem das amostra de mesocarpo e leite em pó foi realizada em uma estufa, modelo Q317M-32 (Quimis[®], São Paulo, SP, Brasil).

Uma mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis[®]) foi utilizada para promover a homogeneização e agitação constante durante as extrações de ácido fítico e lignina do mesocarpo.

Uma centrífuga para tubos, modelo Q222TM (Quimis[®]) foi empregada na separação do sobrenadante das misturas preparadas com o mesocarpo de babaçu e dos resíduos remanescentes das digestões simuladas.

Um banho Dubnoff Microprocessado, modelo Q226M2 (Quimis[®]) foi utilizado durante a simulação das digestões gastrointestinais.

3.2. Materiais, reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água de elevado grau de pureza (18,2 M Ω cm), obtida em um deionizador com sistemas de ultrapurificação Milli-Q[®] (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

Ácido nítrico (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado na preparação de soluções analíticas de referência e para digestão das amostras. Peróxido de hidrogênio (Merck KgaA) foi utilizado em combinação com o ácido nítrico para a digestão das amostras. Hidróxido de sódio (Merck KgaA) e ácido clorídrico (Merck KgaA) foram utilizados para o ajuste de pH e no preparo das soluções para as digestões simuladas. As soluções analíticas de referência foram preparadas a partir de soluções estoques contendo 1000 ± 2 mg L⁻¹ de ferro (FeCl₃ em 0,1 mol L⁻¹ de HCl), cobre (CuCl₂ em H₂O), zinco (ZnCl₂ em $8,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de HCl), cálcio (CaCl₂ em H₂O) e magnésio (MgCl₂ em $8,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de HCl) Titrisol[®] (Merck KgaA).

Os fluídos da digestão simulada foram preparados com NaCl (Merck KgaA), pepsina (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), HCl (Merck KgaA), NaHCO₃ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), K₂HPO₄ (Synth[®], Diadema, Brasil), NaOH (Merck KgaA), pancreatina (Sigma Aldrich) e sais biliares (mistura de colato de sódio e desoxicolato de sódio) (Sigma Aldrich).

Membranas de éster celulose (Sigma Aldrich) em tubos de 32 mm com porosidade de 12,4 kDa foram utilizadas na etapa de diálise.

Lignina alcalina em pó, com baixo teor de sulfonato (Sigma Aldrich) foi utilizada nos ensaios de digestão gastrointestinal simulada. Também foram preparadas soluções de referência a partir de solução de ácido fítico, 50% (m m⁻¹) em água (Sigma Aldrich).

3.3. Amostra

As amostras de mesocarpo extraídas do babaçu e processada na forma de um pó finamente moído de coloração castanha clara foram adquiridas em comunidades do nordeste brasileiro (Maranhão) e fornecidas pelo Professor Dr. Edivan Carvalho Vieira (Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí).

Leite em pó integral Ninho[®] (Nestlé), fortificado com ferro, foi utilizado nos ensaios de disponibilidade juntamente com o mesocarpo.

Para avaliar a exatidão do método de determinação elementar total, desenvolvido para o ICP OES, foram feitas análises em paralelo dos materiais de referência certificados (CRM) de folhas de pêssigo (SRM[®] 1547) e fígado bovino (SRM[®] 1577) do National Institute of Standards and Technology (NIST).

3.4. Procedimento Experimental

Toda vidraria e recipientes utilizados nos experimentos foram previamente lavados com detergente neutro, descontaminados em banho de HNO₃ 10% (v v⁻¹) durante 24hs, enxaguados com água Milli-Q[®], secos no interior de capela de fluxo laminar e mantidos em recipiente fechado durante armazenamento.

3.4.1. Otimização dos parâmetros instrumentais

3.4.1.1. Espectrômetro de absorção atômica com chama

As determinações de Fe, Cu e Zn no espectrômetro de absorção atômica com chama foram executadas seguindo os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros instrumentais e operacionais adotados para o F AAS

Elemento	λ (nm)	I (mA)	Resolução Espectral (nm)	Altura de observação (mm)	Vazão de Acetileno (L h ⁻¹)	Vazão de ar (L h ⁻¹)
Cu	324,8	4,0	0,8	5	65	400
Fe	248,3	4,0	0,2	5	65	400
Zn	213,9	4,0	0,5	5	65	400

Efeitos de matriz na determinação de Fe, Cu e Zn nas digestões simuladas foram avaliados pelo método de adição e recuperação. Foram adicionados 1mg L⁻¹ de Fe e Cu e 0,1 mg L⁻¹ de Zn à solução gastrointestinal e posteriormente analisada.

3.4.1.2. Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite

O programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica simultânea (SIMAAS) foi baseado em um estudo prévio do grupo (NASCIMENTO; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2010). As etapas de secagem e limpeza mantiveram-se sob as mesmas condições, apenas as temperaturas de pirólise e atomização foram otimizadas, pois são as etapas mais críticas do programa de aquecimento. As condições instrumentais adotadas para as determinações de Cu e Fe estão descritas na Tabela 3. É importante destacar que foi usado o modo simultâneo do equipamento, sendo possíveis as determinações de Cu e Fe em um mesmo ciclo de aquecimento.

Tabela 3. Parâmetros operacionais e instrumentais adotados para o SIMAAS.

Elemento	λ (nm)	I (mA)	Resolução Espectral (nm)
Cu	324,8	12	0,8
Fe	248,3	25	0,8

A temperatura de pirólise e de atomização foram otimizadas buscando condições compromissadas que permitissem as determinações simultâneas dos elementos. Para a otimização da pirólise, foram realizadas leituras dos sinais de absorbância de soluções de referência, soluções das digestões gastrointestinais e do branco de fluido gastrointestinal, variando-se de forma crescente a temperatura de pirólise do programa de aquecimento e mantendo-se constante a temperatura de atomização em 2500°C. A melhor temperatura de pirólise foi aquela que respeitou as

características térmicas dos elementos, ou seja, tomou-se como referência para a escolha a temperatura do elemento mais volátil.

Depois de se estabelecer a melhor temperatura de pirólise, foi feita a otimização da etapa de atomização. Nesse caso, foram realizadas leituras das soluções variando-se a temperatura de atomização de 1700 à 2500°C. A temperatura que teve a maior razão sinal/ruído e com menor desvio padrão relativo foi selecionada. Nesse caso, tomou-se como referência para a escolha a temperatura do elemento menos volátil. Em nenhuma das condições foi utilizado modificador químico.

Para verificar a existência de interferências da matriz, foram realizadas calibrações com adição de padrão, uma em meio do branco (fluídos gástrico e intestinal) e outra em meio da amostra após digestão gastrointestinal. As soluções foram preparadas em frascos de 1000 μL , adicionou-se 125 μL do branco ou da amostra e os padrões foram adicionados em concentrações que variaram de 10 a 80 $\mu\text{g L}^{-1}$. Também foi realizada a calibração aquosa, preparada com as mesmas concentrações.

O espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), ZEE nit 60, também foi utilizado para as determinações de Cu. As condições instrumentais dotadas para essas determinações foram similares a do SIMAAS. O comprimento de onda do Cu e a resolução espectral continuaram os mesmos (Tabela 3). Apenas a corrente da lâmpada que foi alterada para 4,0 mA. O programa de aquecimento do GF AAS foi baseado no programa otimizado para o SIMAAS.

A avaliação dos efeitos de matriz nas determinações de Cu nos extratos das digestões simuladas por GF AAS foi realizada a partir do teste de adição e

recuperação. Adicionou-se $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu ao sobrenadante da digestão gastrointestinal do mesocarpo, que, posteriormente, foi analisada.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as determinações efetuadas por F AAS e GF AAS foram determinados a partir do desvio padrão (SD) de 10 leituras do branco (branco da digestão ácida e fluido gastrointestinal) dividindo-se pelo coeficiente angular (a), de acordo com as Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3 \cdot SD}{a} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot SD}{a} \quad \text{Equação 2}$$

3.4.1.3. Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

A escolha dos melhores comprimentos de onda para determinação elementar no ICP OES foi realizada com base na maior razão sinal/ruído e na não sobreposição de linhas espectrais de outros elementos ou concomitantes. Para a determinação de Ca optou-se por escolher um comprimento de onda menos sensíveis devido à alta concentração desse elemento nas amostras. Os comprimentos de onda e os parâmetros instrumentais empregados encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais e comprimentos de onda adotados para as determinações por ICP OES

Potência de radiofrequência	1250 W
Gás do plasma	12 L min ⁻¹
Gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Gás de nebulização	0,2 Mpa
Nebulizador	Babington
Câmara de nebulização	Ciclônica
Orientação da tocha	Modo Axial
Comprimentos de onda (nm)	
Fe (II) 259,940	Ca (II) 184,0
Cu (I) 324,754	Mg (I) 285,213
Zn (II) 202,548	

(I) Linhas atômicas e (II) Linhas iônicas

Visando minimizar possíveis variações nos sinais de emissão, o que poderia resultar em aumento nos desvios padrões e inexatidão do método, as determinações foram feitas em condições robustas do ICP. A avaliação da robustez do método empregado para as análises foi feita a partir da 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 1,0 mg L⁻¹, como proposto por Mermet e colaboradores. Uma razão com valor acima de 10 demonstra que o método encontra-se com uma robustez notável, ou seja, o método tolera variações das matrizes das amostras, sem alterar significativamente os sinais analíticos. Valores inferiores a 4 indicam que o método está muito susceptível a interferências de matriz (MERMET; POUSSSEL,

1995). Para análises por ICP OES com a tocha no modo axial é necessário que a razão de Mg II/ Mg I seja multiplicada por um fator, calculado a partir da razão dos valores de sinais de fundo (S_{fundo}) de ambas as linhas de Mg ($\varepsilon = S_{\text{fundoMg(I)}}/S_{\text{fundoMg(II)}}$), para corrigir desvios da óptica do equipamento (STEPAN *et al.*, 2001).

Para a avaliação dos efeitos de matriz nas análises dos extratos da digestão gastrointestinal por ICP OES foram realizados testes de adição e recuperação. As soluções foram preparadas adicionando-se $120 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe e Zn ao sobrenadante da digestão gastrointestinal da mistura de leite com mesocarpo, que, posteriormente, foi analisada.

Os limites de detecção (LD) foram calculados de acordo com a Equação 3, a partir dos desvios padrões relativos (RSD) de dez medidas do branco analítico, a concentração equivalente à radiação de fundo ($\text{BEC} = C_{\text{sr}}/\text{SBR}$) e a razão sinal/ruído ($\text{SBR} = (I_{\text{sr}} - I_{\text{branco}})/I_{\text{branco}}$), onde: C_{sr} é a concentração da solução de referência contendo Fe, Cu, Zn (1 mg L^{-1}), Ca e Mg (10 mg L^{-1}), I_{sr} é a intensidade de emissão dessa solução e I_{branco} é a intensidade de emissão do branco. Para a determinação do limite de quantificação, o LD foi multiplicado por 10 (NAOZUKA *et al.*, 2011).

$$LD = \frac{3 \cdot \text{BEC} \cdot \text{RSD}}{100}$$

Equação 3

3.4.2. Digestão ácida das amostras para determinação elementar total

As determinações das concentrações totais de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg em mesocarpo de babaçu e leite em pó tiveram como objetivo a caracterização desses materiais para posterior correlação com as quantidades disponíveis, após ensaios

de digestão simulada. As análises em paralelo dos materiais de referência certificados de folhas de pêssego (SRM[®] 1547) e fígado bovino (SRM[®] 1577) tiveram como propósito de avaliar a exatidão do método. O material de folhas de pêssego foi escolhido por possuir uma matriz vegetal, portanto similar ao mesocarpo de babaçu e o fígado bovino, uma matriz de composição gordurosa, mais próxima da composição do leite.

As amostras de leite em pó e mesocarpo de babaçu foram secas em estufa a 60°C. Durante esse processo, consecutivas pesagens foram realizadas até que massas constantes fossem obtidas, indicando a eliminação total da umidade presente na amostra.

Para o pré-tratamento, massas de aproximadamente 200 mg das amostras (leite em pó, mesocarpo de babaçu e dos materiais de referência certificados) foram diretamente pesados nos frascos de TFMTMPTFE e submetidos à decomposição por via úmida em forno de micro-ondas, com mistura oxidante diluída, composta de 2,0 mL de HNO₃ + 1,0 mL de H₂O₂ + 3,0 mL de H₂O. Esta mistura vem sendo recomendada e apresenta ótima eficiência de digestão para várias matrizes com alto teor de matéria orgânica (NAOZUKA *et al.*, 2011). O programa de aquecimento do forno de micro-ondas encontra-se descrito na Tabela 5. Após o término do programa de aquecimento, os frascos foram resfriados em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos até atingir a temperatura ambiente para que pudessem ser abertos. Posteriormente, os digeridos foram transferidos para tubos tipo Falcon de polipropileno e diluídos com água ultra-pura (Milli-Q[®]) para 10 mL. Todas as digestões das amostras foram feitas em duplicatas. Além do uso de materiais de referência certificados para avaliar a exatidão do método, também foram realizados testes de adição e recuperação nas amostras antes da digestão.

Para isso, alíquotas de soluções de referência com concentrações baseadas nos teores naturais dos elementos contidos no leite e no meocarpo foram adicionadas às amostras antes de serem levadas ao forno de micro-ondas.

Tabela 5. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	140	5	1
2	180	4	5
3	200	4	10

3.4.3. Avaliação da interação de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo de babaçu

Para um melhor entendimento das interações de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo de babaçu foram realizados os seguintes experimentos sem a utilização de fluídos gastrointestinais.

3.4.3.1. Teste de adição e recuperação de Fe ao mesocarpo de babaçu

Massas de mesocarpo (100 mg) foram pesadas e misturadas a 10 mL das soluções de Fe^{3+} (10 a 400 mg L^{-1}). O pH da mistura foi ajustado com NaOH de modo a obter valores aproximados da digestão intestinal (pH 7). As amostras foram homogeneizadas em uma mesa agitadora por 2h (400 rpm). As soluções foram centrifugadas e o sobrenadante analisado por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (F AAS).

3.4.3.2. Extração de complexantes do mesocarpo de babaçu

Com o intuito de avaliar o efeito de substâncias complexantes, fracamente ligadas ao mesocarpo, foram realizadas extrações em pHs 7 e 12. Para massas de 2 g de mesocarpo foram adicionados 200 mL de água e o pH foi ajustado com solução de NaOH para 7 ou 12. As misturas foram homogeneizadas em uma mesa agitadora por 30 min (400 rpm) e logo após, foram realizadas filtrações simples com papel de filtro. O resíduo sólido da extração em pH 12 foi lavado novamente com NaOH (pH 12) e, posteriormente, com três alíquotas de 200 mL de água. O sólido foi colocado em vidro de relógio e levado à estufa (60°C) para secagem.

Para confirmar a hipótese de que parte dos compostos extraídos do mesocarpo de babaçu poderia ser o fitato, foram feitas varreduras (260-800 nm) por espectrometria de absorção molecular na região do UV-Vis de uma solução de ácido fítico e dos extratos obtidos nos pHs 7 e 12. Antes de proceder as varreduras, as soluções de ácido fítico (5% m/v) e o extrato em pH 12 tiveram o pH ajustado para 7 com NaOH e HCl, respectivamente. O ácido fítico foi diluído 8 vezes e os extratos 10 vezes antes das medidas.

3.4.3.3. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn nos extratos

Retirou-se 7 alíquotas de 2 mL de cada um dos extratos, descritos no item anterior, e a eles foram adicionadas concentrações conhecidas de Fe, Cu e Zn (10 a 300 mg L⁻¹). As soluções foram diluídas com água para 3 mL. O pH das soluções foram ajustados para 7, próximo aquele da digestão intestinal. Em seguida foram homogeneizadas em uma mesa agitadora por 30 min (400 rpm), centrifugadas a

1700 rpm e os sobrenadantes analisados por F AAS. Esse estudo foi realizado, individualmente, para cada elemento (Fe, Cu e Zn).

3.4.3.4. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn ao mesocarpo lavado

Pesou-se 7 alíquotas de 50 mg do mesocarpo lavado, em pH 12, obtido no item 3.4.3.2, e foram adicionados 5 mL de soluções de 10 a 300 mg L⁻¹ de Fe, Cu ou Zn. As misturas tiveram seus pHs ajustados para 7 e foram homogeneizadas em uma mesa agitadora por 30 min (400 rpm), em seguida foram centrifugadas a 1700 rpm e os sobrenadantes analisados por F AAS. Esse procedimento foi realizado, separadamente, para cada elemento (Fe, Cu e Zn).

3.4.4. Procedimento geral para digestão gastrointestinal *in vitro*

Os estudos de disponibilidade foram realizados a partir de um método *in vitro*, recomendado pela US Pharmacopeia XXIV (US Pharmacopeia XXIV & National Formulary, 2000). Nesse método recomenda-se o emprego de fluídos gástricos e intestinais, simulando as duas etapas da digestão do organismo humano. Além disso, é importante manter a temperatura sob controle e agitação constante para garantir a interação dos reagentes.

O fluído gástrico foi preparado a partir da mistura de 0,2 g de NaCl, 0,32 g de pepsina e 7,0 mL de HCl 10% (v v⁻¹). Do mesmo modo, o fluído intestinal foi preparado misturando-se 0,680 g de K₂HPO₄, 1,0 g de pancreatina, 1,25 g de sais biliares e 7,7 mL de NaOH (0,2 mol L⁻¹). Em ambos os casos essas substâncias foram diluídas para 100 mL com água Mili-Q[®].

No geral, os procedimentos para a digestão gastrointestinal *in vitro* seguiram o roteiro a seguir. Adicionou-se 3 mL de fluido gástrico (pH ~ 1,5) à amostra e a mistura foi mantida em um banho termostático por 2 horas à 36°C, sob agitação constante (100 rpm). Para prosseguir com a digestão intestinal, foram adicionados 0,4 mL de NaHCO_3 3% (m v^{-1}), com a finalidade de ajustar o pH da etapa da digestão gástrica para 6,8 (condição necessária para a digestão intestinal). Em seguida, 3 mL do fluido intestinal foram adicionados e a mistura permaneceu novamente em um banho termostático. Depois de terminada a digestão, um banho de gelo foi utilizado para diminuir bruscamente a temperatura, e assim cessar a atividade das enzimas e, conseqüentemente, a digestão. Os digeridos, contendo material sólido em suspensão foram centrifugados e os sobrenadantes analisados por SIMAAS, GF AAS, F AAS ou ICP OES.

Para a etapa de diálise, 2 mL do sobrenadante das amostras digeridas foram transferidas para um membrana de éster celulose com porosidade de 12,4 kDa. Fitas de polietileno foram usadas para fechar as membranas, mantendo as duas extremidades unidas, conforme mostrado na Figura 6.

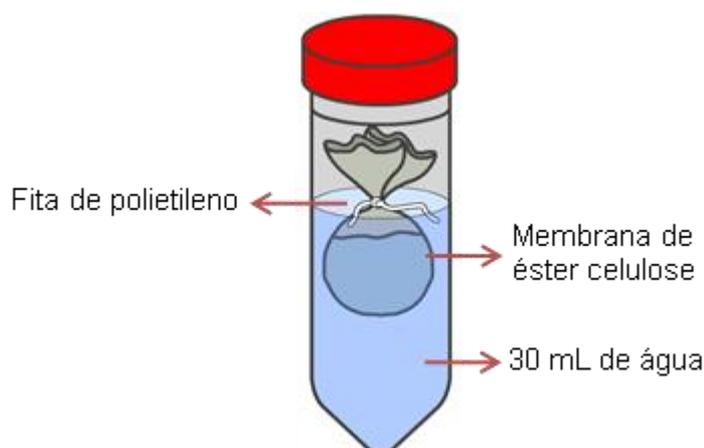


Figura 6. Desenho esquemático ilustrando o processo de diálise.

Em seguida, a membrana de diálise foi introduzida em um tubo de polipropileno contendo 30 mL de água deionizada, sem que suas extremidades fossem submersas na água e permaneceu durante 12h. Após esse tempo, a membrana foi cuidadosamente aberta e o conteúdo foi coletado para a determinação dos elementos de interesse. Para calcular a fração dialisada, subtraiu-se a concentração dos elementos do conteúdo do interior da membrana (fração que ficou retida) da concentração total dos elementos determinados no sobrenadante das amostras depois de digeridas.

Para reduzir o teor de matéria orgânica nas amostras e evitar possíveis interferências no ICP OES, os digeridos, assim como as amostras dialisadas, passaram pelo processo de decomposição em forno de micro-ondas. Foi adicionada uma mistura 2,0 mL de HNO_3 + 1,0 mL de H_2O_2 a 3 mL do sobrenadante da digestão ou ao conteúdo integral do interior das membranas de diálise. O programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado foi o mesmo apresentado na Tabela 5. Após digestão, as amostras foram diluídas para 7 mL com água Mili-Q[®] e analisadas.

3.4.4.1. Digestão gastrointestinal do mesocarpo de babaçu

Massas de 200 mg de mesocarpo de babaçu foram submetidas à digestão gastrointestinal simulada, com a finalidade de avaliar a disponibilidade de Fe, Cu e Zn. Os sobrenadantes dos digeridos foram analisados por F AAS para a determinação de Zn e SIMAAS para determinação simultânea de Fe e Cu.

3.4.4.2. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Fe, Cu e Zn

Para estudar a influência do mesocarpo de babaçu na disponibilidade de Fe, Cu e Zn, procedeu-se uma digestão gastrointestinal, com adição de solução multielementar contendo os elementos de interesse na pesquisa. A uma massa de 200 mg de mesocarpo de babaçu adicionou-se 0,6 mL de uma solução multielementar com 0,28 mg de Fe^{3+} , 0,018 mg de Cu^{2+} e 0,14 mg de Zn^{2+} . Então, essa mistura foi submetida à digestão gastrointestinal simulada. As determinações das frações solúveis de Fe, Cu e Zn foram feita por F AAS. As massas dos elementos adicionados foram baseadas no valor de ingestão diária recomendada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Supondo que um indivíduo consuma uma colher de sopa de mesocarpo por dia (cerca de 10 g) e os valores de ingestão diária recomendada para o Fe, Cu e Zn são 14 mg, 0,9 mg e 7 mg, respectivamente (ANVISA, 2005), a massa de mesocarpo utilizada de 200 mg combinada com os valores adicionados mantiveram essa mesma proporção.

Para avaliar a recuperação desses elementos adicionados na etapa da digestão gástrica, as amostras foram digeridas seguindo o mesmo procedimento, porém foi interrompida nesse primeiro estágio de reação, após 2 h sob agitação no banho termostático. Depois da digestão, a mistura foi colocada em banho de gelo para interromper o processo e posteriormente submetida à centrifugação. O sobrenadante dessa digestão foi analisado por F AAS.

Um detalhe importante que deve ser ressaltado é que as soluções de referência utilizadas para as adições encontravam-se em meio ácido. Portanto as mesmas alteravam o pH das digestões simuladas, deste modo foi necessário adicionar mais 0,4 mL de NaHCO_3 6,7% (m v^{-1}) antes de se iniciar a etapa da digestão intestinal para ajustar o pH para aproximadamente 7.

3.4.4.3. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Ca e Mg

Para avaliar o efeito de Ca(II) e Mg(II) na disponibilidade dos elementos foram feitas digestões gastrointestinais do mesocarpo de babaçu com adição de Ca²⁺ ou Mg²⁺ juntamente com uma solução multielementar de Fe (280 µg), Cu (18 µg) e Zn (140 µg), mencionada no item 3.4.4.2. Nesse caso o foco principal foi avaliar a recuperação das massas de Fe, Cu e Zn adicionadas ao mesocarpo de babaçu na presença e ausência de Ca ou Mg.

Os experimentos foram realizados na presença de 1,0 mL de soluções de Ca²⁺ (0,88 mg) ou Mg²⁺ (0,067 mg), essas adições foram baseadas nas concentrações totais do leite. As determinações das frações solúveis de Fe, Cu e Zn nessas amostras foram feita por FAAS.

3.4.4.4. Digestão gastrointestinal de leite, mistura de leite com mesocarpo e mistura de leite com lignina

Os procedimentos de digestão gastrointestinal foram realizados com leite integral em pó (100 mg) na presença e ausência de mesocarpo de babaçu (100 mg) com o intuito de avaliar a influência do mesocarpo na disponibilidade de Fe, Cu e Zn presentes no leite. Após a digestão gastrointestinal, foi realizada a etapa de diálise das amostras.

Uma das hipóteses dessa pesquisa está relacionada ao efeito da lignina, presente no mesocarpo, como um sequestrante de Fe, Cu e Zn. Por isso, também foi avaliado o efeito da lignina fazendo-se digestão gastrointestinal de lignina (3,2 mg) e de uma mistura de leite em pó (100 mg) com lignina (3,4 mg). Nesse

experimento, informações adicionais foram obtidas a partir dos procedimentos de diálise.

Em ambos os estudos, as frações dos elementos solúveis e dialisados foram determinadas por ICP OES, exceto para o Cu, que foi determinado por GF AAS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados das otimizações instrumentais

4.1.1. Espectrômetro de absorção atômica com chama

Nas determinações por F AAS foram empregadas as condições apresentadas na Tabela 2. A avaliação dos efeitos de matriz na determinação de Fe, Cu e Zn nos extratos da digestão gastrointestinal por F AAS foi feita pelo método de adição e recuperação. Para adição de 1 mg L^{-1} de Fe e Cu à amostra a recuperação foi de 93% e 96%, respectivamente, e para a adição de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn a recuperação foi de 95%, indicando a ausência de interferências causadas pela matriz.

Para as determinações das concentrações de Fe, Cu e Zn nos extratos das digestões simuladas obteve-se LDs iguais a 0,1, 0,02 e 0,02 mg L^{-1} e LQs iguais a 0,4, 0,07 e 0,08 mg L^{-1} , respectivamente.

4.1.2. Espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite

No caso do SIMAAS, as otimizações do programa de aquecimento para determinações simultâneas de Fe e Cu mostraram como melhores temperaturas de pirólise e atomização 1200°C e 2000°C , respectivamente. Na Figura 7, pode ser observado que durante o estudo de pirólise, o Fe resistiu a temperaturas mais elevadas, chegando a 1400°C sem que houvesse perda do analito, porém, para manter uma condição compromissada para as duas espécies determinadas, foi estabelecida uma temperatura de 1200°C para a pirólise, pois a partir dessa temperatura pode se observar a perda de sinal analítico do Cu, devido à sua

volatilização. A temperatura de atomização, também, foi escolhida buscando condições compromissadas para a determinação simultânea, bem como as maiores razões sinal/ruído e menores valores de desvio padrão entre as medidas (n=2). O programa de aquecimento estabelecido para as determinações de Cu e Fe encontra-se descrito na Tabela 6.

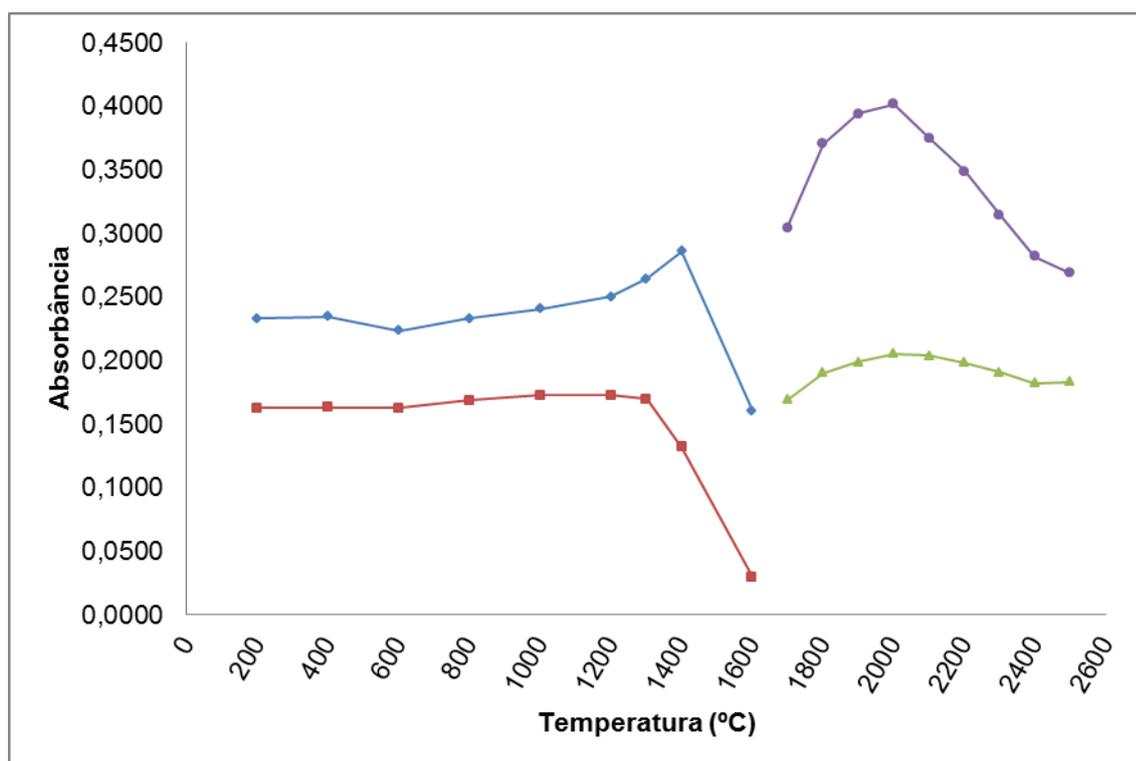


Figura 7. Curvas de pirólise para o Ferro (—●—) e para o Cobre (—■—) e de atomização para o Ferro (—●—) e o Cobre (—▲—) em meio da amostra após digestão gastrointestinal

Tabela 6. Programa de aquecimento para determinação simultânea de Fe e Cu por SIMAAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Ar (mL min ⁻¹)
Secagem I	110	1	30	250
Secagem II	130	15	30	250
Pirólise	1200	10	20	250
Atomização	2000	0	5	0
Limpeza	2500	1	3	250

Além das curvas de calibração em meio aquoso, também foram realizadas calibrações com adição de analito em meio do branco (fluido gastrointestinal) e amostra (extrato do mesocarpo após digestão gastrointestinal), com a finalidade de avaliar possíveis interferências da matriz. As Figuras 8 e 9 mostram as curvas de calibração para Fe e Cu nos diferentes meios. Na curva de calibração do Fe em meio ao branco (Figura 8), pode ser observado um coeficiente linear elevado, devido à existência de contaminação de Fe no fluido gastrointestinal.

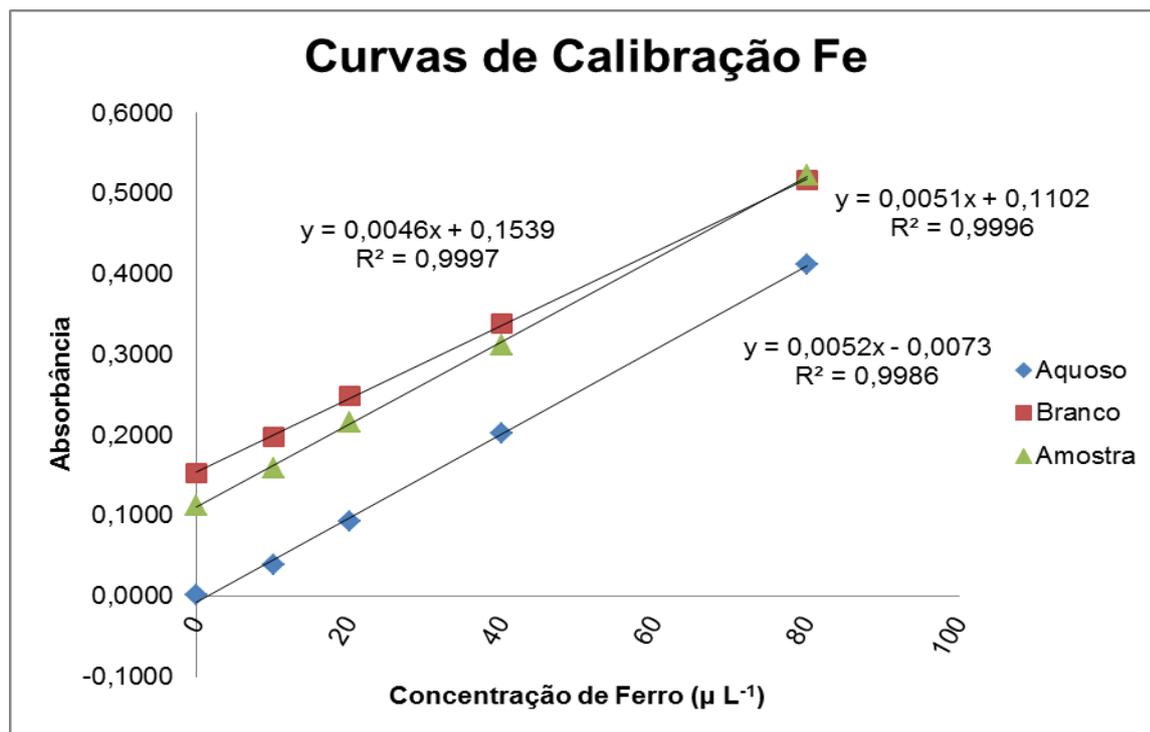


Figura 8. Curvas de calibração para o Ferro em meio aquoso (◆), em meio ao branco (■) e em meio da amostra (▲).

Um dos procedimentos para avaliar a ocorrência de interferências espectrais ou de matriz é pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração em diferentes meios. A razão entre coeficientes angulares de uma curva de calibração aquosa e de uma curva de calibração em meio da amostra deve ser de, aproximadamente, 1, para que possa ser considerado que os efeitos de matriz são inexistentes e que permitam a calibração do instrumento com soluções de referência aquosas (KUMMROW *et al.*, 2008). A razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração aquosa e em meio da amostra para a determinação de Fe foi de 1,0 e para o Cu foi de 1,2. Quando comparados os coeficientes angulares das curvas de calibração aquosa e em meio do branco obtiveram-se os valores das razões iguais a 1,1 para a determinação de Fe e 1,2 para o Cu.

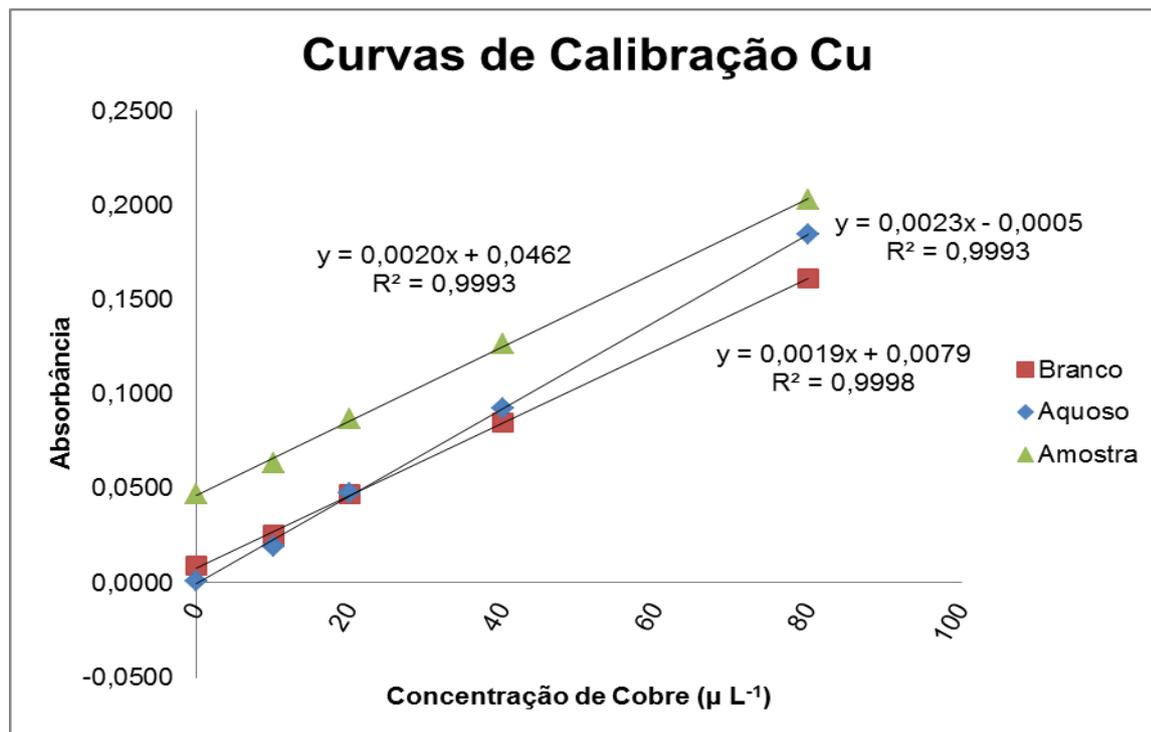


Figura 9. Curvas de calibração para o Cobre em meio aquoso (◆), em meio ao branco (■) e em meio à amostra (▲).

Esses valores encontram-se dentro de um intervalo ($\pm 20\%$) que pode ser considerado como aceitável para que a curva de calibração aquosa seja empregada para as análises sem prejudicar a exatidão do método.

Para as determinações simultâneas de Fe e Cu nos extratos das digestões gastrointestinais por SIMAAS, obtiveram-se LDs de $3 \mu\text{ g L}^{-1}$ e LQs de $10 \mu\text{ g L}^{-1}$ para ambos elementos.

O programa de aquecimento estabelecido para determinação de Cu por GF AAS está descrito na Tabela 7. Este programa foi baseado no programa otimizado para o SIMAAS.

Tabela 7. Programa de aquecimento para determinação Cu por GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)	Tempo (s)	Ar (L min ⁻¹)
Secagem I	110	110	30	30,8	1
Secagem II	130	2	30	40,0	1
Pirólise	1200	110	20	29,7	1
AZ	1200	0	5	5,0	0
Atomização	2000	2000	5	5,0	0
Limpeza	2500	500	3	4	1

A avaliação dos efeitos de matriz na determinação de Cu nos extratos da digestão gastrointestinal por GF AAS foi feita pelo método de adição e recuperação. Para adição de 10 µg L⁻¹ de Cu à amostra a recuperação foi de 86%, indicando a ausência de interferências causadas pela matriz.

O LD e o LQ obtidos para a determinação da concentração total de Cu nas amostras de mesocarpo, leite e CRMs por GF AAS foram 0,1 µg g⁻¹ e 0,4 µg g⁻¹, respectivamente. Para a determinação de Cu nos extratos das digestões simuladas obteve-se um LD de 2 µg L⁻¹ e LQ de 6 µg L⁻¹.

4.1.3. Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

Visando minimizar possíveis variações nos sinais de emissão, o que poderia resultar em aumento nos desvios padrões e inexatidão do método, as determinações foram feitas em condições robustas do ICP OES.

A avaliação da robustez do método empregado para as análises foi feita a partir da razão de Mg II/ Mg I, como proposto por Mermet e colaboradores (MERMET; POUSSSEL, 1995). O fator de correção de desvios da óptica do equipamento (ε) para a solução aquosa de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Mg foi de 1,4 e a razão Mg II/ Mg I, já corrigida, foi 12,5. Portanto o método encontra-se com uma robustez notável, ou seja, o método pode tolerar variações das matrizes das amostras, sem alterar significativamente os sinais analíticos e conseqüentemente os resultados.

Para a avaliação dos efeitos de matriz nas análises dos extratos da digestão gastrointestinal por ICP OES, foram adicionados $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe e Zn à amostra. As recuperações obtidas para Fe e Zn, foram de 87% e 101%, respectivamente, indicando a ausência de interferências causadas pela matriz.

Os LDs e LQs para a determinação da concentração total de Ca, Mg, Fe, Cu e Zn e determinação de Fe, Cu e Zn nos extratos da digestão gastrointestinal por ICP OES encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de LDs e LQs para a determinação elementar total e análise da digestão *in vitro* por ICP OES

	Determinação elementar total		Análise da digestão <i>in vitro</i>	
	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ca	0,6	6		
Mg	0,6	6		
Fe	0,2	2	5	49
Zn	0,02	0,2	1	13
Cu	0,4	4	14	139

4.2. Determinação elementar após digestão em forno de micro-ondas

As determinações dos elementos Fe, Cu, Zn, Ca e Mg foram executas na amostras de mesocarpo e leite em pó, com e sem adição dos analitos por ICP OES, após digestão ácida assistida por micro-ondas.

Na Tabela 9 encontram-se os valores das concentrações dos elementos nos CRMs de fígado bovino (SRM[®] 1577) e de folhas de pêssigo (SRM[®] 1547).

Tabela 9. Resultados das determinações de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg nos materiais de referência certificados

	Fígado bovino (SRM [®] 1577)			Folhas de pêssigo (SRM [®] 1547)		
	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
^a Ca	116 ± 4	130 ± 58		15600 ± 200	14335 ± 518	
^a Mg	601 ± 28	458 ± 16		4320 ± 80	3329 ± 34	
^a Fe	184 ± 15	167 ± 6		218 ± 14	181 ± 10	
^a Zn	127 ± 16	96 ± 4		17,9 ± 0,4	14,0 ± 0,9	
^b Cu	160 ± 8	139 ± 20		3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,1	

^a Análise por ICP OES, ^b Análise por GF AAS, Desvio Padrão (n=2 amostras)

Para verificar a concordância dos resultados, foi aplicado o teste *t-Student*. Todos os elementos tiveram resultados concordantes com os valores certificados, a um nível de confiança de 95%, com exceção do Mg, que apresentou concentrações menores que os valores certificados.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados das determinações dos elementos em amostras de mesocarpo e leite em pó. Nesse caso, foram realizados testes de

adição e recuperação para verificar a existência de eventuais interferências de matriz, ou mesmo interferências espectrais, durante as análises das amostras.

Tabela 10. Resultados das determinações de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg nas amostras de leite e mesocarpo

	Leite					Mesocarpo				
	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Adição ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Rec.	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Adição ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Rec.	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Adição ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Rec.	
^a Ca	8758 ± 1439	4914	115%	384 ± 8	249	110%				
^a Mg	614 ± 85	491	119%	487 ± 5	497	97%				
^a Fe	192 ± 28	246	100%	17 ± 1	10	94%				
^a Zn	25 ± 4	25	88%	2,6 ± 0,2	1,0	96%				
^b Cu	0,3 ± 0,1	2,5	80%	7 ± 1	5	73%				

^a Análise por ICP OES, ^b Análise por GF AAS, Desvio Padrão (n=2 amostras)

Com exceção da recuperação de Cu no mesocarpo, tiveram-se boas recuperações, que variaram entre 80% e 119%. Essas recuperações indicam a inexistência de interferências durante as análises, seja no procedimento de abertura (perdas ou contaminações), seja durante as determinações no ICP OES. Mesmo o Mg, que não apresentou resultados concordantes para as análises dos CRMs, devido a possíveis interferências de matriz, teve boas recuperações, 119% para a amostra de leite e 97% para o mesocarpo. As diferenças observadas podem ter ocorrido porque os CRMs, apesar de ter características semelhantes às amostras, não possuem matrizes idênticas. Portanto as interferências que ocorreram durante as análises dos CRMs não foram observadas no teste de adição e recuperação.

As concentrações de Fe e Ca determinadas para as amostras de leite são concordantes, a um nível de confiança de 95%, com as informações contidas no rótulo do fabricante, onde constam $200 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe e $9,4 \text{ mg g}^{-1}$ de Ca. Para os outros elementos, não havia informações de suas concentrações no rótulo. Entretanto, os resultados também foram comparados com os valores apresentados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) ($8900 \mu\text{g g}^{-1}$ de Ca, $770 \mu\text{g g}^{-1}$ de Mg, $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe, $27 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn e $1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cu) (NEPA-UNICAMP, 2011), todos foram concordantes, com exceção do Fe e Cu. A concentração de Fe determinada foi cerca de 40 vezes maior que o valor da TACO, porém, o leite utilizado neste trabalho era enriquecido com pirofosfato de Fe, além disso, como já foi citado, esse valor foi concordante com as informações contidas no rótulo.

Comparando os resultados obtidos para o mesocarpo com os valores determinados anteriormente em um trabalho de Naozuka e colaboradores (Tabela 1) (NAOZUKA *et al.*, 2011), as concentrações de Cu e Mg apresentaram diferenças significativas, porém os demais elementos apresentaram valores concordantes a um nível de confiança de 95%, quando aplicado o teste *t-Student*. Ao comparar os resultados com os valores da tabela TACO (Tabela 1), foram observadas diferenças significativas para as concentrações de Fe, Cu e Ca, em destaque, a concentração do Fe da tabela TACO foi de cerca de 10 vezes maior do que os obtidos nesse trabalho e no trabalho de Naozuka e colaboradores.

As diferenças encontradas entre os valores obtidos e os da literatura podem ter ocorrido, pois amostras vegetais sofrem influências de diversos fatores que podem modificar a sua composição mineral, tais como sua origem, composição química do solo e condições climáticas (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Apesar de ser observado que o mesocarpo de babaçu apresenta teores de nutrientes minerais importantes, ainda não é possível afirmar se esse alimento pode ser considerado como fonte desses nutrientes, ou seja, informações de concentrações totais não são suficientes do ponto de vista nutricional, uma vez que, esses elementos podem não estar disponíveis para a absorção pelo organismo.

4.3. Avaliação da interação de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo de babaçu

Para um melhor entendimento das interações dos elementos com o mesocarpo de babaçu, foram realizados os experimentos sem a utilização de fluídos gastrointestinais.

4.3.1. Teste de adição e recuperação de Fe ao mesocarpo de babaçu

Quando Fe(III) foi adicionado ao mesocarpo de babaçu (100 mg) pode ser observada uma mudança de coloração da solução extratora final, de marrom claro para um marrom muito escuro, indicando possível formação de complexos entre o Fe e ligantes naturais presentes no mesocarpo. Porém, como pode ser observado na Figura 10, para maiores concentrações de Fe(III) ocorreu a descoloração das soluções. O gráfico da Figura 11 mostra a porcentagem de recuperação em função das concentrações de Fe(III) adicionadas. Pode-se observar que para adições acima de 250 mg L⁻¹ a concentração de Fe encontrada na solução foi muito baixa.

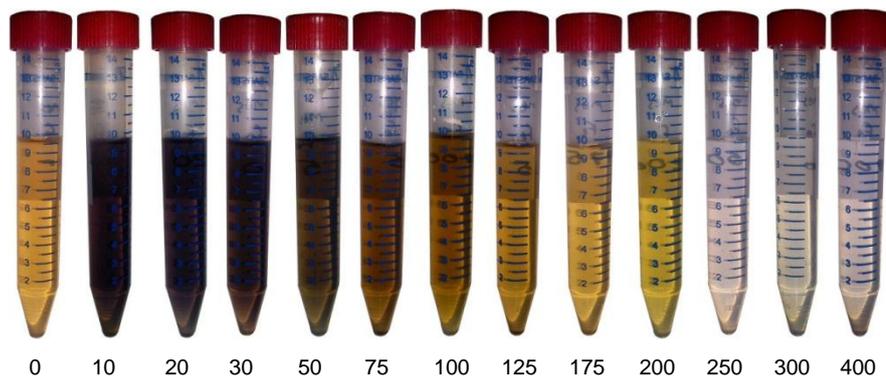


Figura 10. Extratos das adições crescentes de Fe(III) ($10\text{-}400\text{ mg L}^{-1}$) à 100 mg de mesocarpo de babaçu, em $\text{pH}=7$, após separação do sólido remanescente.

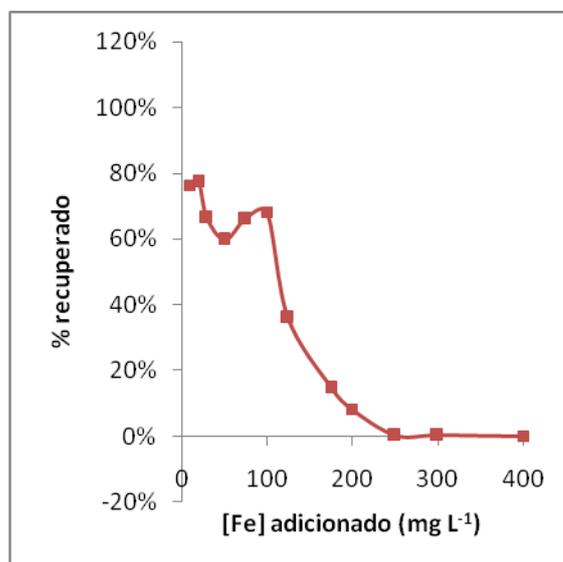


Figura 11. Gráfico de porcentagens de recuperação em função da concentração de Ferro adicionado ao mesocarpo de babaçu.

Os resultados apresentados nas Figuras 10 e 11 permitem inferir que Fe(III) pode estar sendo complexado a ligantes presentes na matriz do mesocarpo de babaçu e a ligantes extraídos para a solução, o que provocou o aparecimento da coloração marrom escura na solução. Para as baixas concentrações de Fe(III) encontradas nas soluções com adições superiores a 250 mg L^{-1} pode-se inferir a

ocorrência, além da formação de complexos insolúveis, de outros processos como a hidrólise e precipitação.

Como foi observado que poderiam existir diferentes mecanismos envolvidos na retenção dos elementos e muitos equilíbrios (complexação, adsorção, hidrólise e precipitação), preferiu-se utilizar outras estratégias para estudar alguns desses mecanismos separadamente. Então experimentos foram realizados para avaliar a complexação e a adsorção dos metais a partir das interações com os extratos e no mesocarpo de babaçu após lavagem com solução alcalina (pH=12).

4.3.2. Extração de complexantes do mesocarpo de babaçu

O extrato de mesocarpo de babaçu obtido em pH 12 apresentou uma coloração mais escura do que em pH 7 (Figura 12), essa diferença deve estar relacionada a maior capacidade dessa solução em extrair ácidos orgânicos fracamente ligados à matriz.

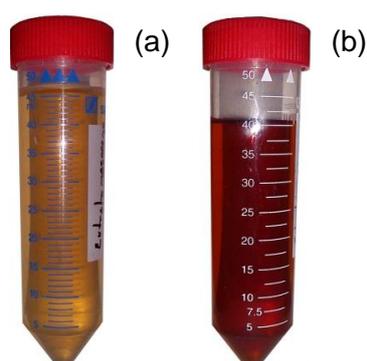


Figura 12. Extratos de mesocarpo de babaçu obtidos em (a) pH 7 e (b) pH12.

Uma hipótese que surgiu foi que um dos principais complexantes presente no mesocarpo de babaçu poderia ser o ácido fítico, pois esse composto é encontrado

em altas concentrações nos vegetais, por ter a função de reservar fósforo e energia. O ácido fítico também possui a capacidade de se ligar a íons metálicos para formar complexos estáveis (QUIRRENBACH *et al.*, 2009).

A análise espectrofotométrica dos extratos apresentou um forte indício de que essa hipótese seja correta. Os espectros do ácido fítico e dos extratos (Figura 13) apresentaram grande similaridade e ambos tiveram absorvância máxima em 272 nm.

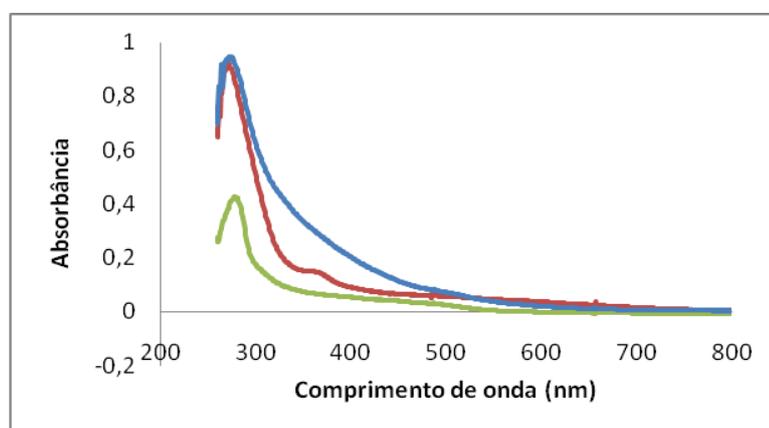


Figura 13. Espectro de absorvância do (—) ácido fítico, (—) extrato em pH 7 e (—) extrato em pH 12

4.3.3. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn nos extratos

A Figura 14 representa os extratos do mesocarpo de babaçu em pH 7 e 12, com as respectivas concentrações de cada um dos elementos a eles adicionadas. É importante ressaltar que os estudos de adição dos elementos com ambos os extratos foi feito em pH=7, ajustados próximos à condição intestinal. Durante a adição dos elementos aos extratos (pHs 7 e 12), além da formação de precipitado castanho escuro observou-se também a descoloração das soluções (Figura 14). Em

soluções aquosas com $\text{pH}=7$, o Fe^{3+} e o Cu^{2+} podem sofrer hidrólise e se precipitam na forma de hidróxidos. As constantes de solubilidade de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ($K_{\text{ps}} = 1,6 \cdot 10^{-39}$) e $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ($K_{\text{ps}} = 4,8 \cdot 10^{-20}$) são baixas e nas condições do experimento (10 a 300 mg L^{-1}) é esperado que ocorra a formação de precipitado devido à hidrólise. O $\text{Zn}(\text{OH})_2$ possui uma constante de solubilidade maior ($K_{\text{ps}} = 3,0 \cdot 10^{-16}$), portanto nesse pH e nas concentrações adicionadas não foi observada ocorrência de hidrólise.

Mesmo com a possibilidade de ocorrer a hidrólise dos íons $\text{Fe}(\text{III})$ e $\text{Cu}(\text{II})$, pode-se afirmar que o precipitado formado é proveniente da complexação e não somente da hidrólise desses íons. Os produtos da hidrólise de Cu e Zn apresentam colorações características diferentes do precipitado observado no experimento, o $\text{Cu}(\text{OH})_2$ é um sólido azul gelatinoso e $\text{Zn}(\text{OH})_2$ um sólido branco, o que não foi observado visualmente na composição do precipitado. Já o $\text{Fe}(\text{OH})_3$ tem coloração castanha, similar a do precipitado formado. A descoloração das soluções e o aumento do volume de precipitado indicam que o composto presente em solução precipitou juntamente com os elementos. Para os extratos em $\text{pH}=7$ a descoloração da solução fica mais evidente do que para os extratos em $\text{pH}=12$.

A Figura 15 apresenta os gráficos de recuperação dos elementos adicionados nos extratos de pH 7 e 12 após centrifugação. Se fosse considerada somente a ocorrência da hidrólise, não eram esperadas as elevadas recuperações de Fe e Cu como observadas em algumas das adições. Porém, os resultados mostram que, os complexos formados entre o fitato e esses elementos, até certa concentração, minimizam o efeito da hidrólise, tornando os elementos mais solúveis e aumentando as recuperações. Esse efeito é mais evidente para o extrato em $\text{pH}=12$, pois contém maior concentração de fitato. Entretanto, para maiores concentrações de Fe e Cu ,

os complexos podem ser insolúveis. Sabe-se que, conforme se aumenta o número de cátions ligados ao fitato, a solubilidade do complexo formado tende a diminuir. Por exemplo, fitato mono-férrico é altamente solúvel, enquanto o fitato tetra-férrico é insolúvel (ROUCHON et al, 2011).

O Zn(II) não deve ter sofrido hidrólise, porém deve ter formado complexo insolúvel, em altas concentrações, o que pode ser evidenciado pela descoloração das soluções (Figura 14) e pelas baixas recuperações (Figura 15).

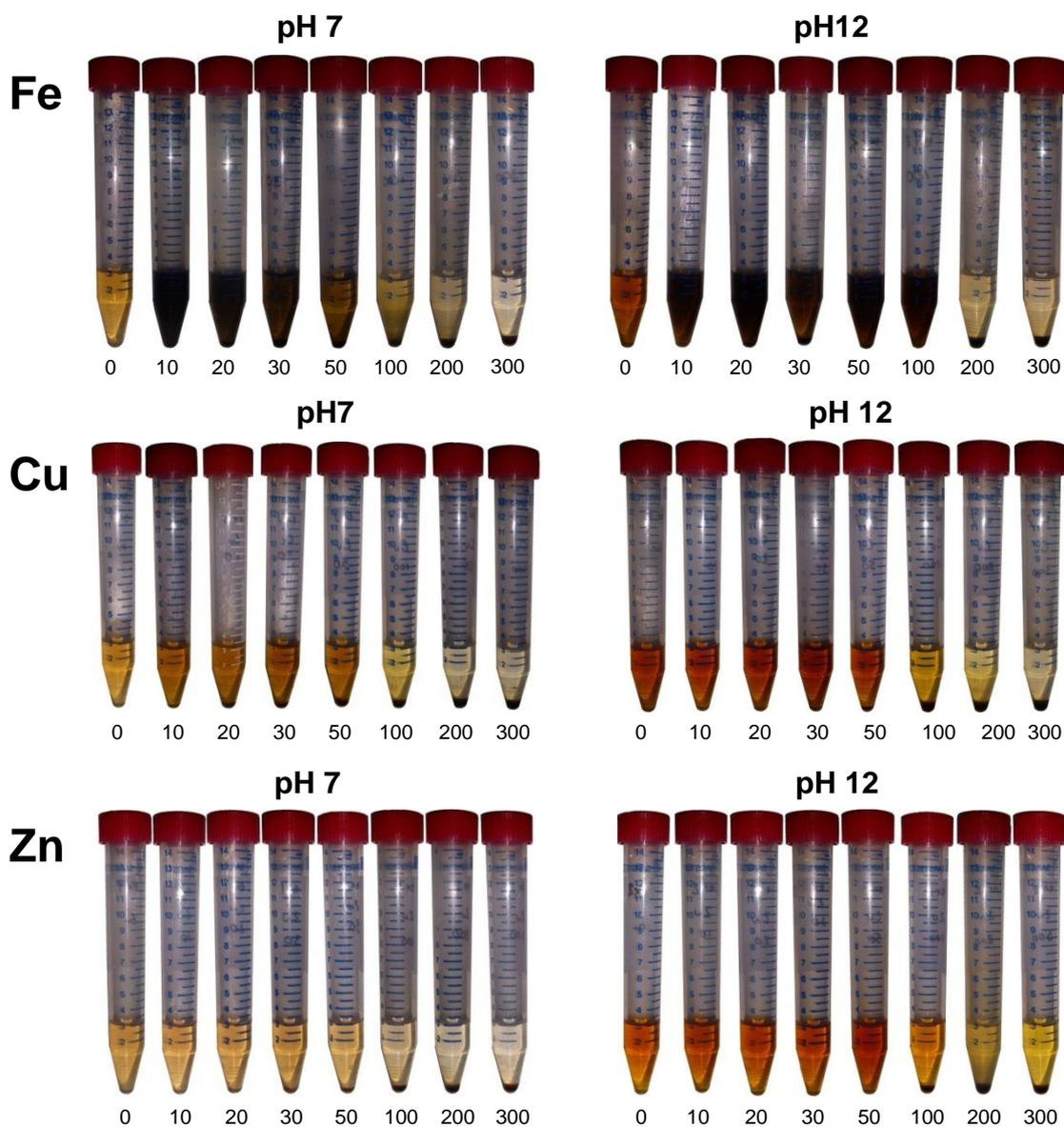


Figura 14. Adição de Fe, Cu e Zn aos extratos em pH 7 e 12 (10-300mg L⁻¹).

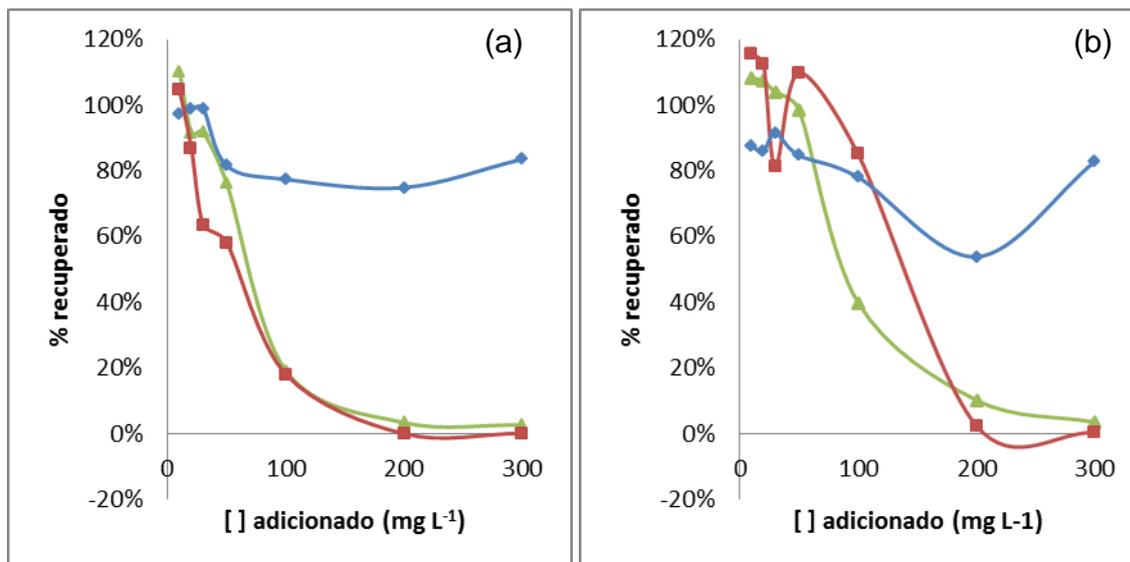


Figura 15. Recuperação do (—■—) Ferro, (—▲—) Cobre e (—◆—) Zinco adicionados aos extratos preparados em (a) pH 7 e (b) pH 12 e ajustados para pH 7.

4.3.4. Teste de adição e recuperação de Fe, Cu e Zn no mesocarpo lavado

Outro mecanismo que pode ocasionar a retenção dos elementos é a adsorção ou complexação pelas fibras insolúveis presentes no mesocarpo. A avaliação desse mecanismo, sem a interferência do efeito dos compostos complexantes fracamente ligados ao mesocarpo, foi feita a partir da lavagem do mesocarpo com NaOH (pH 12) para que praticamente todo composto complexante, fracamente ligado, fosse eliminado. Depois que o mesocarpo foi lavado, não foi mais observada a coloração dos experimentos anteriores. Mesmo após a adição dos elementos os sobrenadantes permaneceram incolores.

As recuperações obtidas nesse estudo encontram-se nos gráficos da Figura 16. Pode-se observar que as recuperações de Fe e Cu analisadas nos sobrenadantes foram inferiores a 20%. Por outro lado, as recuperações de Zn variaram de 20 a 80% para concentrações entre 10 até 100 mg L⁻¹, respectivamente,

mantendo-se praticamente constante até 300 mg L⁻¹. Nas condições em que o estudo foi realizado, não ocorre precipitação de Zn(OH)₂. Porém, em concentrações mais baixas, podem-se observar baixas recuperações, mostrando que houve interações entre o Zn e o mesocarpo. O aumento das recuperações para maiores concentrações adicionadas pode ser um indicativo de saturação dos sítios de ligação.

A retenção de Fe e Cu pelo mesocarpo lavado não pode ser avaliada, pois no pH em que foi preparada a mistura, esses elementos estariam completamente precipitados na forma de hidróxidos, não sendo possível diferenciar qual mecanismo estaria diminuindo suas recuperações. Entretanto, os resultados dos gráficos mostram uma relação direta entre as recuperações e as tendências de hidrólise Fe(III) > Cu(II) > Zn(II).

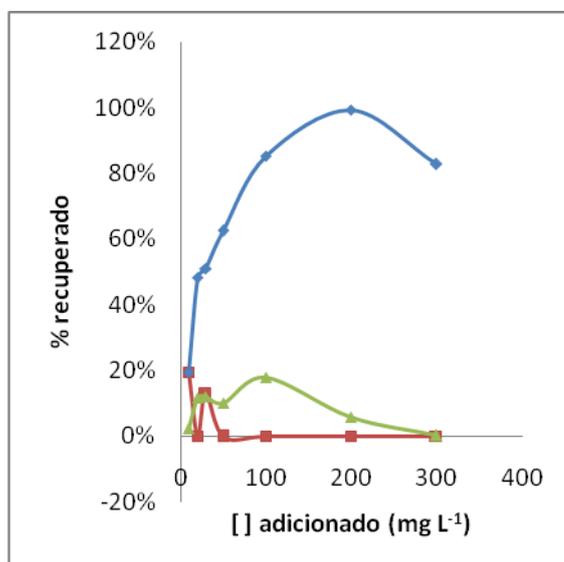


Figura 16. Recuperação do (—■—) Ferro, (—▲—) Cobre e (—●—) Zinco adicionados ao mesocarpo lavado.

4.4. Digestões simuladas *in vitro*

4.4.1. Digestão gastrointestinal do mesocarpo de babaçu

Os resultados das determinações de Fe, Cu e Zn no sobrenadante da digestão simulada de mesocarpo e do branco analítico (fluido gastrointestinal), encontram-se na Tabela 11. Os fluídos utilizados durante a digestão gastrointestinal apresentaram contaminações, principalmente de Fe e Zn, como pode ser observado na linha referente ao branco da Tabela 11. Entretanto, as concentrações de Fe e Zn no branco foram maiores do que aquelas obtidas nas soluções gastrointestinais após a digestão *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por Souza, 2011. Esses resultados indicam que parte do Fe e Zn foi incorporado ao sólido do mesocarpo de babaçu remanescente da digestão gastrointestinal. Desta forma, o Fe e Zn naturalmente presentes no mesocarpo não são extraídos durante a digestão gastrointestinal e, portanto, não estariam disponíveis para absorção pelo organismo. Ao contrário, o mesocarpo de babaçu está atuando como uma espécie sequestrante desses elementos.

Esperava-se que o mesmo comportamento ocorresse para o Cu, que nos experimentos anteriores mostrou tendência à formação de ligações tanto com os compostos fracamente ligados ao mesocarpo como com a matriz do mesocarpo lavado. Entretanto, observou que ocorreu extração de Cu ligado ao mesocarpo. Isso pode ser comprovado fazendo-se a diferença entre a concentração encontrada no branco ($29 \mu\text{g L}^{-1}$) com aquela presente no extrato da digestão gastrointestinal ($149 \mu\text{g L}^{-1}$). Nesse caso, cerca de $120 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu foram extraídos do mesocarpo de babaçu.

Tabela 11. Concentrações de Fe, Cu e Zn solubilizado durante a digestão gastrointestinal simulada do mesocarpo de babaçu.

	Concentração Fe ^a (µg L ⁻¹)		Concentração Cu ^a (µg L ⁻¹)		Concentração Zn ^b (µg L ⁻¹)	
Mesocarpo	176	± 5	149	± 5	682	± 26
Branco	218	± 1	29	± 1	856	± 22

^a Análise por SIMAAS, ^b Análise por F AAS

Os dados experimentais obtidos nessa pesquisa não permitem que se chegue a uma conclusão a respeito desse comportamento inesperado para o Cu.

4.4.2. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Fe, Cu e Zn

Para avaliar a interação de Fe, Cu e Zn com o mesocarpo durante a digestão, foram realizadas digestões simuladas *in vitro* com adição de concentrações conhecidas desses elementos. As concentrações adicionadas foram baseadas nos valores de ingestão diária recomendada pela ANVISA (ANVISA, 2005).

Para avaliar a disponibilidade na etapa da digestão gástrica, o procedimento foi interrompido nesse primeiro estágio de reação. As recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo encontram-se na Tabela 12. Durante a digestão gástrica todos os elementos tiveram boas recuperações, porém os nutrientes minerais não são absorvidos pelo estômago e sim no intestino, durante a digestão intestinal (SILVERTHORN, 2003). Portanto, é após a digestão gastrointestinal que deve ser avaliada a disponibilidade desses elementos.

Entretanto, os dados apresentados na Tabela 12 permitem verificar que em meio ácido os ligantes naturais presentes no mesocarpo estariam protonados o que

impediria ligações com os elementos adicionados. Também deve se considerar que no pH do fluido gástrico os elementos não sofrem hidrólise e, portanto, não são precipitados da solução.

Tabela 12. Recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo de babaçu na digestão simulada *in vitro* com interrupção após etapa da digestão gástrica.

	Elemento	m Adicionada (μg)	m Recuperada (μg)	Recuperação
	Fe	280	260	92%
Digestão Gástrica	Cu	18	20	114%
	Zn	140	150	107%

Na Figura 17 são apresentadas fotos das digestões simuladas de mesocarpo com e sem a adição da solução multielementar de Fe, Cu e Zn. A digestão gastrointestinal do mesocarpo apresenta-se como uma mistura heterogênea, onde pode ser observado um corpo de fundo, que é o resíduo sólido de mesocarpo. A coloração dos sobrenadantes das misturas deve-se a presença de compostos extraídos durante a digestão. A solução da digestão do mesocarpo com adição de solução multielementar apresentou uma coloração diferenciada (Figura 17 a), possivelmente causada pela complexação dos elementos pelo fitato presente no mesocarpo. Essa coloração escura da solução foi observada assim que se ajustou o pH para 7 com NaHCO_3 .

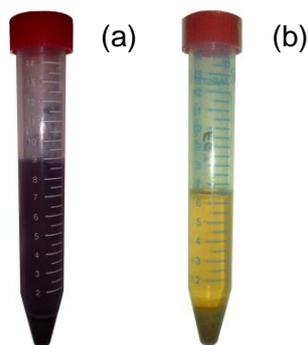


Figura 17. Mesocarpo em digestão gastrointestinal (a) com e (b) sem adição de solução multielementar (Fe, Cu e Zn).

Na Tabela 13 estão apresentadas as recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo após digestão gastrointestinal. Apenas 48% do Fe, 65% do Cu e 75% do Zn podem ser considerados disponíveis uma vez que estão solúveis no extrato da solução gastrointestinal.

Tabela 13. Recuperações dos elementos adicionados ao mesocarpo de babaçu após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

	Elemento	m Adicionada (μg)	m Recuperada (μg)	Recuperação
Digestão Gastrointestinal	Fe	280	134	48%
	Cu	18	12	65%
	Zn	140	105	75%

4.4.3. Digestão gastrointestinal do mesocarpo com adição de Ca e Mg

O leite foi o alimento escolhido para se estudar a disponibilidade de Fe, Cu e Zn na presença de mesocarpo de babaçu. Pois essa é uma das maneiras em que o

mesocarpo tem sido consumido, inclusive essa mistura tem sido usada na merenda escolar em São João do Arraial, Piauí (informações apresentadas no Programa TV Cidade Verde, 2009). Entretanto, antes de se iniciar os estudos com as misturas de leite e mesocarpo, foi avaliado se poderia ocorrer alguma influência da alta concentração de Ca ($8,8 \text{ mg g}^{-1}$) e Mg ($0,6 \text{ mg g}^{-1}$) presentes no leite sobre a disponibilidade de Fe, Cu e Zn.

Nesse sentido foram realizadas digestões com adição de Ca^{2+} ($880 \text{ } \mu\text{g}$) e Mg^{2+} ($67 \text{ } \mu\text{g}$) juntamente com uma solução multielementar de Fe ($280 \text{ } \mu\text{g}$), Cu ($18 \text{ } \mu\text{g}$) e Zn ($140 \text{ } \mu\text{g}$).

Na Tabela 14 estão descritos os resultados das massas recuperadas de Fe, Cu e Zn adicionados ao mesocarpo de babaçu, na presença e ausência de Ca e Mg, durante digestão gastrointestinal simulada.

Tabela 14. Massas de Fe, Cu e Zn recuperadas da digestão gastrointestinal de mesocarpo de babaçu com adição de Ca e Mg.

	$m_{\text{Recuperada}}$ sem adição*			$m_{\text{Recuperada}}$ com adição de Ca			$m_{\text{Recuperada}}$ com adição de Mg		
	(μg)			(μg)			(μg)		
Fe	134	\pm	3	115	\pm	2	138	\pm	7
Cu	11,7	\pm	0,2	11,6	\pm	0,3	11,5	\pm	0,4
Zn	105	\pm	5	78	\pm	6	103	\pm	3

*Digestão gastrointestinal com adição de Fe, Cu e Zn

Ao avaliar a influência de Ca e Mg na disponibilidade desses elementos, notou-se que a adição de Ca pode diminuir a solubilidade de Fe e Zn durante a digestão gastrointestinal. As recuperações obtidas para o Fe nas amostras com adição de Ca foram 14% menores do que na sua ausência e para o Zn esse efeito

foi mais evidente, a presença de Ca diminuiu 26% a sua recuperação. A disponibilidade de Cu não foi alterada na presença de Ca. As massas recuperadas de Fe, Cu e Zn nas amostras com adição de Mg também não apresentaram diferenças significativas quando comparadas às recuperações obtidas na ausência de Mg.

Na Figura 18 estão apresentadas fotos de digestões gastrointestinais do mesocarpo de babaçu com adição da solução multielementar de Fe, Cu e Zn na presença e ausência de Ca e Mg.

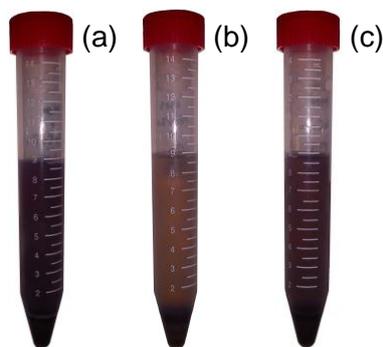


Figura 18. Mesocarpo em digestão gastrointestinal com adição de (a) solução multielementar (Fe, Cu e Zn), (b) solução multielementar com Ca e (c) solução multielementar com Mg.

Na foto da digestão com a adição de Ca (Figura 18b) pode ser observado que ocorreu pequena descoloração da solução em relação à digestão do mesocarpo com adição de apenas Fe, Cu e Zn (Figura 18a). Além disso, pode ser visualizado um volume maior de sólido remanescente da digestão quando o Ca foi adicionado. Como verificado anteriormente, essa coloração da solução deve-se a presença de complexos de fitato com os elementos. Portanto, a descoloração provocada pela adição de Ca e a formação de precipitado indicam que o Ca estaria diminuindo a

solubilidade dos complexos de fitato. Essa observação é coerente com os resultados apresentados na Tabela 14, uma vez que a diminuição da recuperação de Fe e Zn poderia estar associada à precipitação dos complexos de fitato.

Na literatura são encontradas informações a respeito da influência do Ca na disponibilidade de Fe e Zn em presença de fitato. O Ca forma complexos com o fitato e esse complexo Ca-fitato pode se ligar ao Fe e ao Zn, formando complexos ainda mais insolúveis do que os complexos de apenas Fe-fitato ou Zn-fitato (SILVA; SILVA, 1999).

No caso da adição do Mg à digestão, não foi observada influência na disponibilidade de Fe, Cu e Zn, nem alterações na coloração das soluções (Figura 18c).

4.4.4. Digestão gastrointestinal de leite, mistura de leite com mesocarpo e mistura de leite com lignina

Em princípio, os estudos para avaliar as interações dos elementos com o mesocarpo de babaçu foram todos realizados com soluções padrões, portanto podem não representar o que ocorre na realidade, pois diferentes espécies desses elementos estão presentes nos alimentos, podendo não apresentar o mesmo comportamento observado com os padrões e interagir com o mesocarpo de forma diferente. Entretanto, esses estudos realizados com os padrões possibilitaram uma melhor compreensão do sistema.

Para simular uma situação mais próxima do real, ensaios foram realizados para avaliar a disponibilidade de Fe, Cu e Zn na digestão gastrointestinal de leite em pó, em mistura de leite e mesocarpo de babaçu e em mistura de leite e lignina, com o propósito de verificar a influência dessa substância na digestão. Os gráficos

referentes aos estudos de disponibilidade de Fe, Cu e Zn nos ensaios com leite podem ser observados nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente. Em cada caso, as primeiras colunas representadas nos gráficos das figuras referem-se às concentrações totais dos elementos, calculadas a partir das massas adicionadas de leite e mesocarpo, suas respectivas concentrações totais determinadas no item 4.2 e volume das digestões. As segundas colunas representam as frações solúveis, obtidas durante a digestão gastrointestinal, após centrifugação, e as últimas colunas representam as concentrações dialisadas (diferença entre as concentrações solúveis e as concentrações remanescentes no interior da membrana de diálise).

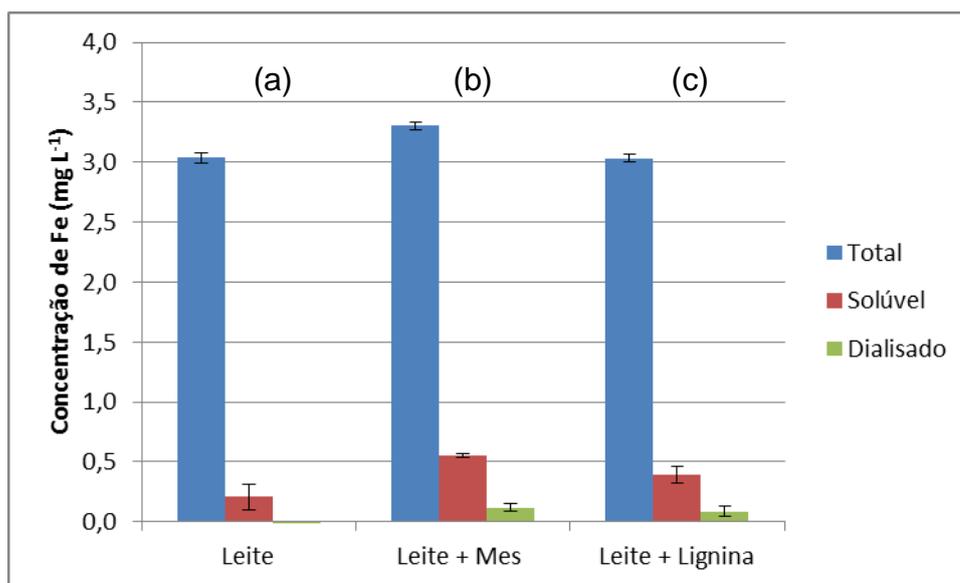


Figura 19. Disponibilidade de Fe em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).

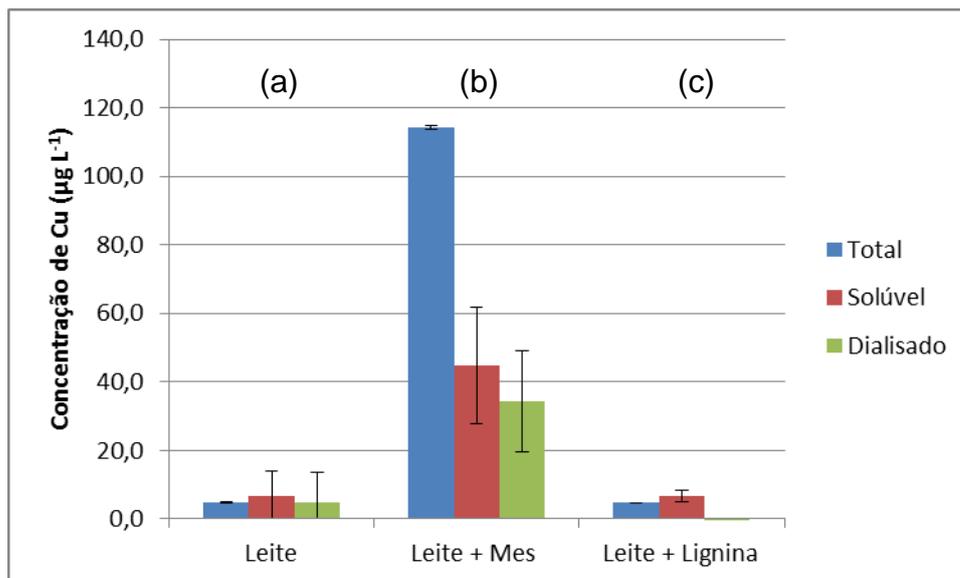


Figura 20. Disponibilidade de Cu em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).

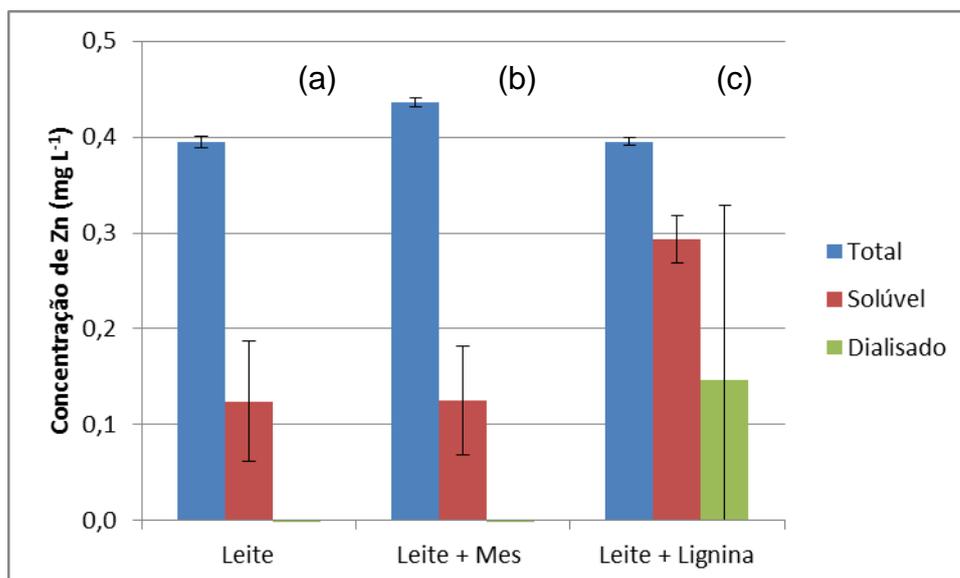


Figura 21. Disponibilidade de Zn em leite (a) e misturas de leite e mesocarpo (b) e misturas de leite e lignina (c).

A digestão gastrointestinal de leite revelou que o Fe e Zn (Figuras 19a e 21a) presentes no leite não são prontamente solubilizados na solução de digestão. Esse resultado é particularmente interessante para o Fe uma vez que o leite em pó

utilizado na digestão continha $192 \mu\text{g g}^{-1}$ (valor total determinado), sendo que parte desse ferro é oriundo do enriquecimento com pirofosfato férrico (informado no rótulo do produto). A Tabela TACO informa que a concentração natural de Fe no leite integral em pó é de $27 \mu\text{g g}^{-1}$. Desta forma, os resultados apresentados na Figura 19 indicam que nem o Fe natural nem o adicionado estão totalmente disponíveis (apenas 7% do total estão solúveis). Após a diálise, foi observado que praticamente todo ferro ficou no interior da membrana, indicando baixa disponibilidade do mesmo para ser absorvido pelo organismo.

O mesmo comportamento foi observado para o Zn. Porém, a proporção de Zn extraído durante a digestão gastrointestinal foi maior (25%) em comparação com o Fe. A concentração de Cu no leite é baixa e pelos resultados apresentados na Figura 20a pode-se observar que todo ele foi extraído para a solução gastrointestinal e encontra-se disponível, conforme mostrado pelos resultados após a diálise.

A mistura de mesocarpo com o leite aumentou a concentração de Fe solúvel (Figura 19b) em comparação com a digestão do leite puro. O mesocarpo contém Fe, porém quando avaliado isoladamente, não foi observada solubilização do mesmo na solução gastrointestinal, mas com a adição do leite ocorreu maior solubilização. É também importante de se considerar que a concentração total de Fe na mistura leite e mesocarpo foi maior do que aquela observada no leite puro (barras azuis Figura 19).

O ferro tem baixa biodisponibilidade, pois ele pode se hidrolisar e precipitar no pH intestinal, porém nos alimentos existem outros nutrientes, como amino ácidos e peptídeo, que podem se ligar ao ferro tornando-o solúvel e, conseqüentemente, biodisponível (MILLER et al., 1981). Na Equação 4, é mostrada uma representação da reação que poderia estar ocorrendo. O Fe primeiramente encontra-se associado

a compostos ligantes do mesocarpo (Mes) formando FeMes. Na presença do leite, proteínas como a caseína ou outros compostos ligantes, representados na reação por L⁻, podem se ligar ao Fe formando um complexo solúvel, melhorando, assim, a sua disponibilidade (SILVA; SILVA, 1999).



Outra explicação sugerida para o aumento da fração de ferro solúvel é que compostos presentes no mesocarpo (por exemplo, o fitato) também podem formar compostos solúveis com os elementos, dependendo das concentrações dos mesmos, como já foi observado no item 4.3.3.

A diálise mostrou que uma pequena fração do Fe solúvel na mistura leite + mesocarpo é dialisada e, portanto, estaria disponível.

O Cu solúvel na mistura de leite com o mesocarpo é proveniente do próprio mesocarpo uma vez que a concentração deste elemento no leite é muito baixa. Deste modo, não foi possível observar se havia alguma alteração da disponibilidade do Cu presente no leite na presença do mesocarpo.

A fração de Zn solúvel na mistura de leite e mesocarpo permaneceu a mesma em comparação com o leite puro (Figura 21), mostrando que o mesocarpo não influenciou a solubilidade do elemento. Algo que deve ser notado é que, mesmo o Zn apresentando solubilidade relativamente boa, em ambos os casos sua fração dialisada foi praticamente nula, indicando baixa disponibilidade.

A lignina é um dos possíveis responsáveis pela retenção dos nutrientes minerais e a mesma encontra-se presente no mesocarpo de babaçu. Para avaliar, individualmente, o efeito causado por esse composto, foi realizada a digestão *in vitro*

do leite em presença de lignina. Nas Figuras 19c, 20c e 21c pode ser observado que a adição de lignina ao leite aumentou a extração dos elementos, elevando suas frações solúveis. Nesse caso, os elementos são complexados pela lignina tornando-os mais solúveis. Entretanto, esses elementos, mesmo solúveis, podem não se encontrar disponíveis para a absorção pelo organismo, pois estão fortemente associados à lignina, um composto de alta massa molecular. As concentrações dos elementos nas frações dialisadas foram muito baixas, exceto para o Zn, mostrando que os elementos solubilizados pela interação com a lignina permaneceram retidos durante a etapa de diálise.

No caso do Zn (Figura 21c), pode ser observado um aumento da fração dialisada, porém, a mesma apresentou um desvio padrão muito alto devido, principalmente, à menor interação deste elemento com a lignina, o que pode ter influenciado na diálise e também à contaminação dos fluídos gastrointestinais (Tabela 11).

Foi realizado um ensaio de digestão gastrointestinal utilizando somente a lignina, para avaliar se possíveis contaminantes presentes na lignina estariam adicionando concentração de Fe, Cu e Zn ao sistema. Porém as concentrações dos elementos no extrato da digestão simulada de lignina encontravam-se abaixo do LD.

5. CONCLUSÕES

A determinação elementar total mostrou que o mesocarpo de babaçu possui na sua composição Fe, Cu e Zn nas concentrações de 17, 7,0 e 2,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Nos estudos de disponibilidade foi observado que o Fe e o Zn não se encontram disponíveis após a digestão gastrointestinal *in vitro*. Portanto o mesocarpo não pode ser considerado como fonte desses nutrientes. O Cu foi extraído durante a digestão simulada, apresentando uma fração solúvel de 55%.

Além disso, foi observado que o mesocarpo pode interagir com os elementos e, a partir de diferentes mecanismos (complexação, adsorção e precipitação), diminuir a sua disponibilidade.

O ácido fítico presente no mesocarpo pode formar complexos solúveis com os Fe, Cu e Zn. Porém, a solubilidade dos complexos formados é dependente da razão elemento/fitato, ou seja, conforme se aumenta o número de cátions ligados ao fitato, a solubilidade do complexo formado tende a diminuir e, conseqüentemente, prejudicar a sua disponibilidade.

Também foi observado que os íons Fe(III) e Cu(II) podem se hidrolisar e precipitar no pH intestinal, e isso impede que sejam absorvidos pelo organismo. Porém nos alimentos existem outros nutrientes, como amino ácidos e peptídeo, que podem se ligar a eles.

A adição de Ca ao mesocarpo durante a digestão simulada diminuiu a solubilidade de Fe e Zn. Uma explicação sugerida para esse acontecimento, é que o Ca forma complexos de baixa solubilidade com fitato presente no mesocarpo e esses complexos podem se ligar ao Fe e ao Zn. Os complexos Fe-Ca-fitato e Zn-Ca-fitato são mais insolúveis do que quando esses elementos são complexados apenas pelo fitato, formando Fe-fitato e Zn-fitato. Portanto, alimentos que contém fitato em

sua composição diminuem a biodisponibilidade de nutrientes minerais, e a presença de Ca pode agravar esse efeito.

Apesar do ferro presente no leite apresentar baixa disponibilidade, quando o mesmo foi misturado ao mesocarpo observou-se um aumento da concentração de Fe solúvel. Compostos presentes no leite, por exemplo, proteínas como a caseína ou outros compostos ligantes diminuíram o efeito negativo que o mesocarpo vinha apresentando ao reter os elementos, tornando-os indisponíveis. O aumento da solubilidade do Fe também pode ter ocorrido devido à presença de compostos complexantes no mesocarpo, como por exemplo, o fitato, que dependendo da sua concentração pode formar complexos solúveis com os elementos.

A lignina, um dos componentes da fibra do mesocarpo de babaçu, pode aumentar a solubilidade dos elementos durante a digestão gastrointestinal, porém os mesmos podem não estar disponíveis, uma vez que os elementos associados à lignina podem ser retidos durante a etapa de diálise.

REFERÊNCIAS

ADLER, E. Lignin chemistry: past, present and futures. **Wood Sci. Technol**, v. 11, p. 169-218, 1977.

AIROLDI, C.; SANTANA, S. A. A.; VIEIRA, A. P.; SILVA FILHO, C.; MELO, J. C. P.; BEZERRA, W. B.; SILVA, H. A. S. **Method for preparing chemically modified babassu coconut mesocarp used for removing metal ions, preferably copper ions, involves adding organic anhydride in container under magnetic stirring.** BR201004478-A2, 17 Abril 2012.

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.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministerio 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.

AZEVEDO, A. P. S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 155-159, 2007.

BARUQUE FILHO, E. A.; BARUQUE, M. G. A.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Ethanol from Babassu Coconut Starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 877-886, 1998.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: Benefícios para a Saúde.** Viçosa: [s.n.], 2008.

COZZOLINO, S. M. F. Deficiências de minerais. **Estudos avançados**, v. 21, p. 119-126, 2007.

COZZOLINO, S. M. F.; MICHELAZZO F. B. Biodisponibilidade: conceitos, definições e aplicabilidade. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 1, p. 3-11.

CRUZ, R. S. et al. Feeding behaviors of feedlot bulls fed concentrate levels and babassu mesocarp meal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1727-1736, 2012.

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

DOSSIÊ: os minerais na alimentação. **Food Ingredients Brasil**, p. 48-65, 2008.

DOST, K.; TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 22-27, 2006.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v. 43, p. 213-217, 1992.

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. FLY, A. D.; FAHEY JUNIOR, G. C.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L. Iron bioavailability from diets containing isolated or intact sources of lignin. **Biological Trace Element Research**, v. 62, p. 83-100, 1998.

FILISSETTI T. M. C. C.; LOBO A. R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 7, p.175-215

GLAHN, R. P.; LEE, O. A.; YEUNG, A.; GOLDMAN, M. I.; MILLER, D. D. Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1555-1561, 1998.

GLOBO Rural. **União de quebradeiras de babaçu garante aumento de renda no MA**, 19 out. 2011. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/10/uniao-de-quebradeiras-de-babacu-garante-aumento-de-renda-no-ma.html>>. Acesso em: 18 nov. 2011.

HENRIQUES G. S.; COZZOLINO, S. M. F. Ferro. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2^a. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 25, p. 508-532.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, 2011.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, p. 945-959, 2010.

KUMMROW, F.; SILVA, F. F.; KUNO, R.; SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, P. V. Biomonitoring method for the simultaneous determination of cadmium and lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry for assessment of environmental exposure. **Talanta**, v. 75, p. 246-252, 2008.

LOMBARD, M.; CHUA, E.; O'TOOLE, P. Regulation of intestinal non-haem iron absorption. **Gut**, v. 40, p. 435-439, 1997.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, v. 1, 2006.

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

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R.; GREGÓRIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista**, v. 38, p. 79-86, 2012.

MELO, L. P.; RANGEL, J. H. G.; BARRETO, N. M. F.; IBAÑEZ-ROJAS, M. O. A.; MARTINS, M. S. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO PÃO ENRIQUECIDO COM MESOCARPO DE BABAÇU. **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa, 2007.

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

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; CAMPEN, D. V. C. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, p. 2248-2256, 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. 1ª. ed. Brasília: [s.n.], 2005.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL. **Protocolo de intenções para atuação conjunta dos governos federal, estadual e municipais frente à síndrome neurológica da beribéri no sudoeste do maranhão**, 2006. Disponível em: <http://www.mds.gov.br/backup/arquivos/protocolo_intencoes_-_beriberi_ma_08_12_06_iii.pdf>. Acesso em: 2012.

MIOTTO, F. R. C. et al. Farelo de mesocarpo de babaçu (*Orbygnia* sp.) na terminação de bovinos: composição física da carcaça e qualidade da carne. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1271-1277, 2012a.

MIOTTO, F. R. C.; RESTLE, J.; NEIVA, J. N. M.; MACIEL, R. P.; FERNANDES, J. J. D. R. Consumo e digestibilidade de dietas contendo níveis de farelo do mesocarpo de babaçu para ovinos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 792-801, 2012b.

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 nut by off-line coupled SEC-UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 58-63, 2010.

NEPA-UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 4ª. ed. Campinas: [s.n.], 2011.

PASCOAL, L. A. F.; BEZERRA, A. P. A.; GONÇALVES, J. S. FARELO DE BABAÇU: VALOR NUTRITIVO E UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 3, p. 339-345, 2006.

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, 1988.

PEDROSA L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Cobre. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 26, p. 533-548.

PERALES, S.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J.; FARRÉ, R. Availability of iron from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialysability) and uptake and transport by Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1296-1303, 2007.

PINHEIRO, C. U. B.; FRAZÃO, J. M. F. Integral processing of babassu palm (*Orbignya phalerata* arecaceae) fruits: village level production in Maranhão, Brazil. **Economic Botany**, v. 49, p. 31-39, 1995.

QUIRRENBACH, H. R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N. D.; CARVALHO FILHO, M. A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 24-32, 2009.

RIBEIRO M. A.; COZZOLINO, S. M. F. Metodologias para a estimativa da biodisponibilidade de nutrientes. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 3, p. 38-63.

ROUCHON, V.; PELLIZZI, E.; DURANTON, M.; VANMEERT, F.; JANSSENS, K. Combining XANES, ICP-AES, and SEM/EDS for the study of phytate chelating treatments used on iron gall ink damaged manuscripts, v. 26, p. 2434-2441, 2011.

SANTANA, S. A. A.; VIEIRA, A. P.; SILVA FILHO, E. C.; MELO, J. C. P.; AIROLDI, C. Immobilization of ethylenesulfide on babassu coconut epicarp and mesocarp for divalent cation sorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 714-719, 2010.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. ASPECTOS NUTRICIONAIS DE FITATOS E TANINOS. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 5-19, 1999.

SILVA, N. R. et al. Desempenho em confinamento de bovinos de corte, castrados ou não, alimentados com teores crescentes de farelo do mesocarpo de babaçu. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1882-1887, 2012.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma abordagem integrada**. São Paulo: Manole, 2003.

SOUZA, M. G. **Avaliação da influência da farinha de mesocarpo de babaçu na biodisponibilidade de ferro em ratos anêmicos**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. São Paulo, p. 24. 2011.

SOUZA, M. G.; VIEIRA, E. C.; OLIVEIRA, V. P. 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.

SOUZA, M. H. S. L.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1-5, 2011.

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.

TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1655-1663, 2007.

THOMPSON, B.; SHARP, P.; ELLIOTT, R.; AL-MUTAIRI, S.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Development of a Modified Caco-2 Cell Model System for Studying Iron Availability in Eggs. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, p. 3833-3839, 2010.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Interactions of Fe(II), Ca(II) and Fe(III) with high dietary fibre materials A physicochemical approach. **Food Chemistry**, v. 54, p. 23-31, 1995.

TV Cidade Verde. **Chocolate de babaçu "babalate" vira merenda escolar no Piauí**, 19 out. 2009. Disponível em: <<http://www.cidadeverde.com/chocolate-de-babacu-babalate-vira-merenda-escolar-no-piaui-46531>>. Acesso em: Março 2013.

US Pharmacopeia XXIV & National Formulary. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, v. 19, 2000.

VIEIRA, A. P. et al. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 1272-1278, 2009.

VIEIRA, A. P. et al. Epicarp and Mesocarp of Babassu (*Orbignya speciosa*): Characterization and Application in Copper Phtalocyanine Dye Removal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 21-29, 2011.

VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; MELO, J. C. P.; SILVA FILHO, E. C.; AIROLDI, C. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, p. 99-105, 2010.

WALRAVENS, P. A. Nutritional importance of Copper an Zinc in neonates and infants. **Clinical Chemistry**, v. 26, p. 185-189, 1980.

WHO. World Health Organization. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva: [s.n.], 1996.

WWW.PROTEINSTRUCTURES.COM. **Protein Structure and Structural Bioinformatics**. Disponível em:

<<http://www.proteinstructures.com/Structure/Structure/protein-domains.html>>.

Acesso em: 2013

YUYAMA L. K.; YONEKURA L.; AGUIAR J. P. L.; RODRIGUES M. L. C. F.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 27, p. 549-574.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Minami Fioroto

Local e data de nascimento: São Caetano do Sul, 30 de Agosto de 1989.

EDUCAÇÃO

- Escola Técnica Estadual Jorge Street, São Caetano do Sul - SP, 2006.
- Faculdades Oswaldo Cruz (FOC), São Paulo - SP, 2010. Graduação (Bacharel em Ciências com Habilitação em Química)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Minicurso: "Micro-ondas para o preparo de amostras.", carga horária de 8 horas, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, Brasil, 2011.

OCUPAÇÃO

- Bolsista de Mestrado, CNPq, processo: 132630/2011-7, vigência: de 01/03/2011 à 31/02/2013.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

- FIOROTO, A. M.; OLIVEIRA, P. V. *Evaluation of Fe(III), Cu(II) and Zn(II) interaction with mesocarp of babassu using extraction procedures and F AAS for bioavailability studies.* In: 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2012, Foz do Iguaçu, PR.

- FIOROTO, A. M.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. *Estudo de método para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Zn e Cu em presença de mesocarpo de babaçu*. In: 16° Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão, SP.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- IX Workshop sobre Preparo de Amostras. 2012. (Outra).
- II Congresso Institucional da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP. 2012. (Congresso).
- 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. 2012. (Congresso).
- 16° Encontro Nacional de Química Analítica. 2011. (Congresso).

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Monitor da disciplina QFL 2242 (Química Analítica Instrumental), sob supervisão da Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura e do Prof. Dr. Paulo Celso Isolani. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) – IQ/USP. 2° semestre de 2012.
- Monitor da disciplina QFL 2241 (Princípios de Química Analítica), sob supervisão do Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira e da Prof. Dr. Mauro Bertotti. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) – IQ/USP. 1° semestre de 2012.