

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ANGERSON NOGUEIRA DO NASCIMENTO

**Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas
de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju
(*Anacardium occidentale*)**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/10/2011

Versão Corrigida

ANGERSON NOGUEIRA DO NASCIMENTO

**Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas
de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju
(*Anacardium occidentale*)**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química
Analítica)

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Pedro Vitoriano de Oliveira

São Paulo

2011

Angerson Nogueira do Nascimento

Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju (*Anacardium occidentale*)

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química
Analítica)

Aprovado em: 30 de novembro de 2011

**Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em
castanha de caju (*Anacardium occidentale*)**

ANGERSON NOGUEIRA DO NASCIMENTO

**Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade
de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Ciências – Programa: Química.**

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Fabio Rodrigo Piovezani Rocha

CENA – USP

Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

IQ – USP

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

DQ - UFSCar

Prof^a Dr^a Solange Cadore

IQ - UNICAMP

São Paulo

30 de novembro de 2011

Aos meus pais
pela dedicação e apoio
durante toda a minha jornada estudantil

**Aos meus irmãos (ãs)
pelo carinho e amizade**

AGRADECIMENTO(S)

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira, pela orientação e respeito.

À Prof^a. Dr^a Elisabeth de Oliveira, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Fábio R. P. Rocha pela avaliação crítica deste trabalho, colaboração e participação durante o exame de Qualificação e Defesa de Tese.

Ao Prof. Sandro R. Marana pelas contribuições fornecidas na Qualificação e Defesa de Tese.

Ao Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega pela cuidadosa leitura do presente trabalho e ricas contribuições na Defesa de Tese.

A Prof^a_Solange Cadore pela avaliação crítica do presente trabalho e valiosas contribuições na Defesa de Tese.

Às Prof^{as} Cassiana Seimi Nomura e Juliana Naozuka pelo apoio e amizade durante o meu processo de formação acadêmica.

Aos técnicos de laboratório Daniel, Priscila e, em especial, a Luciana Cunha por terem auxiliado no desenvolvimento deste projeto científico através da manutenção do Laboratório de Espectroscopia de Emissão e Absorção Atômica.

A Prof^a Wanessa Roberto Melchert pela colaboração científica e amizade.

A todos os funcionários das Seções de Graduação/Pós Graduação pela assistência acadêmica e eficácia no trabalho.

Aos amigos de laboratório (Alexandre Fioroto, Danielle Polidorio, Daniel, Gislayne Kelmer, Karina Nagaoka, Luiza, Maciel Luz, Maria, Rodrigo Chelegão, Valeska Meireles, Vivian Carioni) pela troca de informações científicas, amizade e alegria em nosso ambiente de trabalho.

À “pequena família Nogueira” (Anderson, Anna Paula, Angélica, André, Andrenilce, Andréia, Tiago, Aline, Felipe, Taís, Michele, Elize, Luana, Murilo, Mateus) pelo apoio.

Ao meu grande amigo Gilvan Serafim da Silva pelo companheirismo, momentos de alegria e risos.

Aos eternos amigos de graduação “Química 2000/ DQ – UFSCar” (Renata França, Juliana Gabriel, Juliana Rosa, Paula Grossi, Betânia Santim, Janaína César, Junia Motta, Ricardo Pepino, Viviane Kumagai, Marielle Pedroso, Rita de Cássia, Michelle Odnicki, Vanessa).

Aos amigos da FFLCH – USP (Gilmar Pozo, Rosângela Veríssimo, Meire de Paula, Ana Letícia, Angela, Michel Sorci, Juliana Florentino) pela alegria, festas e companheirismo.

Aos amigos Rodrigo Bombardi, Márcia Andréia, Laura, Júnior, Aline, Angela, Massayoshi, Karol, Rodrigo Munõz, Thiago Regis, Laís

Giacon, Maiara Salles, Alex Silva, Gustavo, Márcio, Ana Ruas, Pollyana, Sidnei Gonçalves, Helena, Tiago, Denise e Cleusa Cavalcanti.

A todos os funcionários do IQ-USP que contribuíram (direta ou indiretamente) para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Ninguém educa ninguém,
ninguém educa a si mesmo
os homens se educam entre si
mediatizados pelo mundo

Paulo Freire

RESUMO

Nascimento, A.N. **Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju (*Anacardium Occidentale*)**. 2011. 148 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química (Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho apresenta os estudos decorrentes da identificação de espécies moleculares associadas aos elementos Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de castanha de caju (*Anacardium Occidentale*), os quais foram realizados por: (1) digestão total da amostra, (2) digestão simulada *in vitro*, (3) extração de metais e proteínas empregando água, NaOH e Tampão Tris-HCl, (4) precipitação de proteínas com HCl ou acetona, (5) avaliação da associação entre espécies elementares e moleculares presentes nos diferentes meios extratores utilizando o acoplamento entre SEC-UV-SIMAAS e SEC-UV-ICP OES e (6) especiação de Fe em amostra de água de diálise empregando método espectrofotométrico.

As determinações elementares nas amostras de castanha de caju demonstraram que os teores de Ca foram de $(0,031 \pm 0,001)\%$; Cu $(19,1 \pm 0,1)$ mg kg^{-1} ; Fe $(53,5 \pm 0,2)$ mg kg^{-1} ; Mg $(0,22 \pm 0,01)$ % e Zn (40 ± 3) mg kg^{-1} , respectivamente.

O emprego de soluções gástrica e intestinal simuladas revelou que 10% de Ca, 29% de Zn, 44% de Mg, 80% de Fe e 90% de Cu são extraídos durante a digestão. Após o processo de diálise, verificou-se que 100% do Zn e 90% do Ca, Fe e Mg passaram através da membrana de ester de celulose (tamanho de poro = 12 kDa). Porém, o cobre apresentou uma porcentagem de diálise de 70%.

O processo de extração de proteínas indicou que a solução alcalina possui elevada capacidade de solubilização dos analitos, quando comparada com os demais extratos. A análise molecular das soluções extratoras demonstrou que em meio alcalino e tamponado há uma maior solubilização de compostos de alto peso molecular e o meio aquoso solubiliza espécies de baixo peso molecular. A precipitação realizada a partir dos extratos proteicos utilizando HCl propiciou uma alteração no perfil de distribuição molecular dos compostos presentes nos extratos aquoso e tamponado. Porém, o uso da precipitação em meio de acetona revela um perfil de separação diferente, pois em meio orgânico ocorre a seleção de compostos de baixo peso molecular (< 6,5 kDa).

As análises por SEC-UV-ICP OES em soluções gastrointestinais revelou que os elementos estão distribuídos entre proteínas de alto e baixo peso molecular. Mas o processo de diálise demonstrou que algumas interações elementares e moleculares foram desfeitas após esta etapa de precipitação com HCl ou acetona. Porém, estes dados podem fornecer o primeiro indício da presença de metaloproteínas em amostras de castanha de caju.

O monitoramento das espécies de ferro em amostras de água de diálise demonstra que apenas o íon trivalente (Fe^{3+}) foi identificado. Sendo que, ao realizar a quantificação desta espécie, verifica-se que o teor de ferro livre presente na solução foi de 15%. Portanto, esta solução continha, aproximadamente, 85% de espécies químicas de ferro presentes no extrato gastrointestinal, as quais estão associadas a outros compostos presentes na amostra.

Palavras-chave: Biodisponibilidade, Bioacessibilidade, ICP OES, Castanha de Caju, Metaloproteína, Digestão Simulada

ABSTRACT

Nascimento, A.N. **Speciation and bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg and Zn metalloprotein in cashew nut (*Anacardium Occidentale*)**. 2011. 148 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work studies were done for the identification of molecular species associated to Ca, Cu, Fe, Mg and Zn in cashew nuts (*Anacardium Occidentale*) using the following procedures: (1) sample acid digestion for total element determination; (2) *in vitro* digestion; (3) metals and proteins extraction using water, NaOH and Tris-HCl; (4) protein precipitation with HCl or acetone; (5) evaluation of association between elemental and molecular species in different extractors using SEC-UV-SIMAAS and SEC-UV-ICP OES and (6) iron speciation analysis in dialysis water using a spectrophotometric method.

The elemental analysis showed that in cashew nuts there is a great quantity of Ca (0.031 ± 0.001 %) and Mg (0.22 ± 0.01 %), but minor quantity of Cu (19.1 ± 0.1) mg kg⁻¹, Fe (53.5 ± 0.2) mg kg⁻¹ and Zn (40 ± 3) mg kg⁻¹.

The bioavailability studies reveal that Ca (10%), Zn (29%), Mg (44%), Fe (80%) and Cu (90%) were extracted during the *in vitro* digestion. After dialysis, 100% of Zn and 90% of Ca, Fe and Mg passed through the membrane, however, only 70% of Cu was dialysed in this step.

The protein extraction procedures indicate that alkaline media has a great capacity for solubilization of analytes, if compared with other extracts. The molecular analysis of extracts showed that in alkaline and buffered media there is a presence of

high molecular weight compounds and water extracted low molecular weight compounds. The HCl precipitation in water and buffered extractors change the molecular distribution profile and acetone precipitation selected low molecular weight compounds (< 6.5 kDa) for all extractors.

The SEC-UV-ICP OES analysis in gastric intestinal solutions showed that the elements were distributed between high and low molecular weight compounds, but the dialysis procedure revealed the elemental and molecular correlations disappear to some metals.

The monitoring of iron species by spectrophotometric method demonstrated that only 15% of trivalent iron was identified in the water dialysis. Therefore, this solution contain approximately 85% of iron species present in the gastrointestinal extract which are associated with others compounds in the sample.

Keywords: Bioavailability, Bioaccessibility, ICP OES, Cashew Nut, Metaloprotein, Simulated Digestion

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CID - *Charge Injection Device*

CONAB – Conselho Nacional de Abastecimento

DRI – Dietary Reference Intakes

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI-MS - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*

ETV-ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e vaporização eletrotérmica, *Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

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

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

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

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *High Performance Liquid Chromatography*

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

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

P.M. – Peso Molecular

PI – Ponto Isoelétrico

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

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

Sindicaju - Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará

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

STPF - Stabilized Temperature Platform Furnace

T_a – Temperatura de Atomização

TACO – Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos

T_p – Temperatura de Pirólise

USP – Farmacopéia Americana, *United States Pharmacopeia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático de um processo de separação por SEC.....	50
Figura 2: Esquema do processo de extração e análise de metaloproteínas presentes em castanha de caju.....	58
Figura 3: Esquema representativo do sistema empregado durante a digestão gastrointestinal (<i>in vitro</i>) e diálise das amostras de castanha de caju.....	62
Figura 4: Esquema representativo do sistema empregado durante a digestão gastrointestinal (<i>in vitro</i>), diálise das amostras de castanha de caju e análise por SEC-UV-ICP OES e SEC-UV-SIMAAS.....	66
Figura 5: Esquema representativo do sistema empregado para especificação de Fe em água de diálise por espectrofotometria (P1 a P3 (Microbombas solenóides); V (Válvula Solenóide); LCW (Cela de fluxo com guia de ondas (100 cm)); W (Descarte); F (Fonte de radiação); D (Detector)).....	69
Figura 6: Extração de proteínas empregando diferentes meios extratores (água, tampão Tris-HCl, NaOH).....	75
Figura 7: Determinação elementar cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco em soluções extratoras (aquosa, tamponada, alcalina) utilizadas no processo de solubilização de proteínas (eixo y refere-se ao teor máximo que poderia ser obtido para cada elemento).....	77
Figura 8: Perfis cromatográficos de soluções extratores empregadas no processo de solubilização de proteínas da castanha de caju.....	80
Figura 9: Perfis cromatográficos de soluções extratores após precipitação com HCl.....	82

Figura 10: Perfis cromatográficos de soluções extratores com precipitação em meio de acetona obtidas a partir do processo de solubilização de proteínas da castanha de caju.....	85
Figura 11: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju.....	88
Figura 12: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju.....	90
Figura 13: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju...	92
Figura 14: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl.....	95
Figura 15: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl.....	97
Figura 16: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl.....	98
Figura 17: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona.....	101
Figura 18: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona.....	103

Figura 19: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona.....	105
Figura 20: Monitoramento de soluções de água de diálise por ICP OES.....	108
Figura 21: Perfil de distribuição molecular obtido a partir da separação cromatográfica de castanha de caju submetida ao processo de digestão gastrointestinal (sem e com diálise).....	112
Figura 22: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; análise elementar de Ca).....	116
Figura 23: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; análise elementar de Cu).....	117
Figura 24: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; análise elementar de Fe).....	118
Figura 25: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; análise elementar de Mg).....	119
Figura 26: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de	

digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elementar de Zn**).....120

Figura 27: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise analisados por SEC – UV - ICP OES e SEC – UV – SIMAAS (separação molecular; **análise elementar de Fe**).....122

Figura 28: Avaliação da presença de espécies de ferro livres (Fe(II) e Fe (III)) presentes em solução de diálise provenientes de extratos gastrointestinais de castanha de caju (membrana de diálise de 12 kDa).....126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para operação do ICP OES.....	48
Tabela 2: Condições instrumentais utilizadas para determinação de Fe por SIMAAS 6000.....	53
Tabela 3: Programa de aquecimento para digestão ácida das amostras de castanha de caju em forno de micro-ondas.....	56
Tabela 4: Programa de aquecimento utilizado nas determinações de Fe por SIMAAS a partir de diferentes frações coletadas por separação cromatográfica (SEC-UV).....	65
Tabela 5: Parâmetros instrumentais para especiação de Fe por espectrofotometria.....	68
Tabela 6. Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de castanha de caju e no material de referência certificado (SRM 1572).....	71
Tabela 7: Estimativa do teor de proteínas presentes nas amostras de castanha de caju.....	73
Tabela 8: Avaliação da biodisponibilidade dos elementos em castanha de caju.....	109

SUMÁRIO

1. Introdução.....	24
1.1. Importância dos elementos para o nosso organismo.....	25
1.2. Castanhas como fonte elementar.....	27
1.3. Técnicas instrumentais empregadas na determinação elementar em amostras de castanhas.....	30
1.4. Fracionamento e análise de especiação em castanhas.....	35
1.5. Biodisponibilidade de nutrientes/minerais em amostras de castanhas.....	41
2. Objetivos.....	45
3. Parte Experimental.....	46
3.1. Instrumentação.....	46
3.2. Reagentes e amostras.....	53
3.3. Extração e determinação de proteínas.....	56
3.4. Preparo das soluções de fluido gástrico e intestinal.....	60
3.5. Digestão gastro-intestinal.....	61
3.6. Análise do extratos gastrointestinais simulados de castanha de caju por SEC-UV-ICP OES e SEC-UV-SIMAAS.....	64
3.7. Análise de especiação de Fe empregando análise em fluxo.....	67
4. Resultados e discussões.....	70
4.1. Determinação da concentração total dos elementos de interesse.....	70
4.2. Determinação da concentração total de proteínas em castanha de caju e nas soluções extratoras.....	72

4.3. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nos extrato de água, tampão Tris-HCl e NaOH.....	75
4.4. Separação cromatográfica dos extratos proteicos.....	78
4.4.1. Perfis cromatográficos antes e após precipitação.....	79
4.4.2. Perfis cromatográficos e elementares (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn).....	86
4.4.3. Perfis cromatográficos e elementares (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn) após a precipitação.....	93
4.5. Ensaio para simulação de digestão <i>in vitro</i>	106
4.5.1. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em extratos de soluções de digestão <i>in vitro</i>	106
4.5.2. Separações cromatográficas dos extratos de digestão simulada pré e pós-diálise.....	110
4.5.3. Perfis cromatográficos elementares de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES dos extratos de digestão simulada pré e pós-diálise.....	113
4.6. Especificação de Fe(II)/Fe(III) após diálise da digestão gastrointestinal.....	123
5. Conclusões.....	127
6. Referências Bibliográficas.....	130

1. Introdução

Os alimentos são fontes importantes de substâncias necessárias para o desempenho de diversas funções no corpo humano. Dentre essas substâncias se destacam os macro e micronutrientes, os quais são componentes químicos que proporcionam energia ou contribuem para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e da vida (Banco de alimentos e colheita urbana: Noções básicas sobre alimentação e nutrição, 2003).

Os nutrientes podem ser divididos em diferentes grupos, como por exemplo, as gorduras, carboidratos, vitaminas, sais minerais e proteínas (Banco de alimentos e colheita urbana: Noções básicas sobre alimentação e nutrição, 2003). As gorduras desempenham diversas funções no organismo tais como: fornecer energia, manter a temperatura do corpo constante, proteger os órgãos vitais e facilitar a absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (Pinheiro e Penna, 2004). Os carboidratos também fornecem energia para o organismo, além disso, estão envolvidos nos processos de contração muscular e em outras formas de trabalho biológico (Pinheiro, Porto *et al.*, 2005).

As vitaminas regulam o metabolismo e a sua ausência bloqueia uma ou mais reações específicas na célula podendo, eventualmente, causar um distúrbio no balanço metabólico do organismo (Ammerman, Baker *et al.*, 1995).

As gorduras, carboidratos e proteínas são compostos utilizados nas reações reguladas pelas vitaminas, sendo que, as proteínas desempenham nos organismos vivos e alimentos funções estruturais e contráteis, atuam como catalisadores de reações bioquímicas (enzimas), regulam o metabolismo (hormônios), transportam nutrientes e metabólitos, possuindo, também, função nutricional. Ingeridas com os

alimentos, as proteínas sofrem ação das enzimas proteolíticas gerando aminoácidos essenciais que, uma vez absorvidos, entram na síntese de proteínas próprias do organismo que as ingeriu. O valor nutritivo de uma proteína dependerá de sua digestibilidade, composição, presença de aminoácidos essenciais e forma biodisponível (Sgarbieri, 1996).

Os elementos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn, I entre outros), assim como as vitaminas, não podem ser sintetizados pelo organismo e devem ser fornecidos com a alimentação. Estes compostos e/ou elementos atuam no organismo desempenhando funções regulatórias do metabolismo enzimático, facilitam a transferência de compostos pelas membranas celulares e composição de tecidos orgânicos, são importantes na prática esportiva, uma vez que, durante o exercício físico ocorre perda de eletrólitos, tais como, sódio, cloreto, potássio, entre outros. A carência de nutrientes essenciais pode levar ao aparecimento de câibras musculares, perda de apetite, anemia, fraqueza, entre outros males que afetam à saúde (Ammerman, Baker *et al.*, 1995; Pinheiro, Porto *et al.*, 2005).

1.1. Importância dos elementos para o nosso organismo

Para se obter todos os nutrientes necessários para suprir nossas necessidades nutricionais é preciso ter uma dieta balanceada e variada. As frutas são importantes fontes de nutrientes e nosso país possui uma imensa diversidade de espécies nativas e exóticas (açaí, amora, abacate, banana, caju, cupuaçu, figo, graviola, goiaba, laranja, maçã, manga, pêra, pessego, entre outras), as quais se adaptaram e originaram frutas de excelente sabor e qualidade, sendo exportadas para diversos países (Lorenzi, Sartori *et al.*, 2006). As frutas são importantes fontes

de elementos essenciais à saúde humana, tais como Ca, Cu, I, Fe, Mg, Mn, Mo, K, Se, Na, Zn, entre outros. O papel de cada elemento na manutenção e funcionamento do organismo varia de acordo com as necessidades do corpo humano (Wienk, Marx *et al.*, 1999; Hurrell, 2003).

Os elementos de interesse nesta pesquisa (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn) são considerados essenciais com funções específicas no organismo humano. O cálcio, por exemplo, é importante na formação dos dentes, ossos, transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, estruturação de membranas celulares, absorção da vitamina B₁₂, entre outras funções. A carência deste elemento pode ocasionar o enfraquecimento dos ossos, como é o caso da osteoporose, onde há uma redução na massa óssea total (Buzinaro, Almeida *et al.*, 2006).

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

O cobre é componente de várias enzimas como a citocromo C-oxidase, superóxido desmutase, monoamino-oxidase, entre outras, sendo essencial na mobilização do ferro para síntese de hemoglobina. Sua deficiência provoca anemia, leucopenia, neutropenia, hiperuricemia e retardo no crescimento. Mas, um elevado consumo de cobre pode provocar diarreia, náuseas, vômitos, cirrose, anemia e bronquite (Andrade, Alves *et al.*, 2005).

O zinco está envolvido no processo de crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico. A deficiência deste elemento em animais

e humanos causa o retardamento do crescimento, anormalidades na formação óssea, dermatites, entre outros problemas (Parisi e Vallee, 1969; Siloto, 2005; Konoha, Sadakane *et al.*, 2006).

O ferro possui duas formas principais, as quais são conhecidas como ferro heme e ferro não-heme. O ferro inorgânico (forma não-heme) pode ser encontrado nos alimentos de origem vegetal como Fe(II) ou Fe(III). O ferro orgânico (ferro heme) tem uma maior concentração em alimentos de origem animal e participa da constituição da hemoglobina, a qual é uma metaloproteína que transporta oxigênio dos pulmões até os tecidos. A forma heme possui maior absorção no organismo do que o ferro inorgânico, sendo que a deficiência de ferro no organismo é uma das causas mais importantes no surgimento da anemia. As conseqüências da anemia para a saúde são alterações no desenvolvimento da criança ou adolescente, problemas de pele, mucosas, sistema digestivo e aumento da mortalidade em crianças devido a um estágio mais avançado da doença (Benito e Miller, 1998; Garcia, Mota *et al.*, 1998; Queiroz e Torres, 2000; Brigide, 2002; Martinez-Navarrete, Camacho *et al.*, 2002).

1.2. Castanhas como fonte elementar

As carências nutricionais citadas anteriormente serão supridas caso haja alimentos à disposição que forneçam uma quantidade adequada de cada elemento. Estudos têm demonstrado que frutas como o caju, por exemplo, constituem uma importante fonte de elementos essenciais para o organismo (Oliveira, 1995; Lima, Colugnati *et al.*, 2006). Além das frutas, tem havido um elevado interesse em relação aos diferentes tipos de castanhas encontradas comercialmente. Estas tem sido

consumidas especialmente por vegetarianos e pessoas com problemas cardíacos, devido à possibilidade de prevenção de câncer, empregadas como ingrediente na fabricação de bolos, biscoitos, tortas, como fonte alternativa de proteínas, gorduras insaturadas, vitaminas, fibras, ácido fólico, elementos essenciais (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Se e Zn) e para complementação da dieta (Venkatachalam e Sathe, 2006; Lima e Bruno, 2007; Ritter e Savage, 2007).

Apesar das castanhas apresentarem similaridades em termos de gorduras e proteínas, a concentração elementar para cada tipo de castanha é bastante diferenciada.

A castanha-do-Pará, por exemplo, apresenta um alto teor de Se (0,03 a 512 $\mu\text{g g}^{-1}$), o qual é considerado um elemento essencial que proporciona a defesa contra o estresse oxidativo, regulação de hormônios da tireóide, sendo, também, associado à redução de risco de alguns tipos de câncer (Chang, Gutenmann *et al.*, 1995; Freitas, Gonçalves *et al.*, 2008). A concentração deste elemento na castanha-do-Pará é bastante significativa, porém, pode-se encontrar Se em amêndoas, avelãs e pistache (Moodley, Kindness *et al.*, 2007; Freitas e Naves, 2010). Outro elemento comumente encontrado em castanha-do-Pará é o Ba (considerado elemento não essencial) e sua concentração pode variar de 860 a 2084 mg kg^{-1} segundo estudos realizados por Gonçalves e colaboradores (Goncalves, Fernandes *et al.*, 2009).

As nozes são fontes importantes de proteínas, lipídeos, vitaminas B₆, entre outros nutrientes. Em cada 100 g pode-se encontrar cerca de 27 mg de Fe, 168,3 mg de Mg, 316,7 mg de K e 316 mg de P. A avelã possui em sua composição K (0,9% m/m), P (0,5% m/m), Mg (0,2% m/m), S (0,2% m/m), Ca (0,14% m/m), Fe (42 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mn (58 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Cu (18 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Sze-Tao e Sathe, 2000).

A castanha de caju, foco deste estudo, é constituída de três partes distintas: casca, película e amêndoa. A casca possui um tecido esponjoso cujas cavidades são preenchidas por um líquido viscoso, cáustico e de cor escura. A amêndoa é a parte comestível do fruto e possui em média 30% do peso da castanha (Paiva, Neto *et al.*, 2006). A composição química da castanha varia de acordo com a área de plantio e dos níveis de adubação do solo, porém, estudos realizados pela EMBRAPA revelam que o nível de macro e micronutrientes por quilo de fruto (castanha e pedúnculo) são bastante elevados (Oliveira, 1995). Estudos apresentados na literatura revelam que as mesmas são fontes importantes de lipídeos (46% m/m), proteínas (25% m/m), carboidratos (25% m/m) e aminoácidos essenciais para o organismo (Lima, Colugnati *et al.*, 2006; Venkatachalam e Sathe, 2006; Lima, 2009). Em relação à composição elementar, verifica-se que a castanha apresenta 0,6% (m/m) de K e P, 0,2% (m/m) de Mg e S, 0,045% (m/m) de Ca, $49 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, $66 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe e $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cu.

Devido ao agradável sabor e a esta variada composição química, a comercialização da castanha de caju no Nordeste brasileiro tem tido grande importância socioeconômica e está possibilitando o crescimento das exportações de acordo com dados do Sindicaju (Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará), Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e CONAB (Conselho Nacional de Abastecimento) (Oliveira, 1995; Garruti, Casimiro *et al.*, 2003; Proposta de preços mínimos - Safra 2006/2007, 2006). As castanhas provenientes da região Nordeste brasileira tem como principal destino os Estados Unidos, o qual é nosso principal mercado consumidor (Pollack e Perez, 2008).

1.3. Técnicas instrumentais empregadas na determinação elementar em amostras de castanhas

A determinação da composição elementar em castanhas requer o emprego de técnicas analíticas instrumentais como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) ou forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), entre outros detectores elementares.

A espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS) apresenta alta sensibilidade, praticidade de operação do equipamento e ampla aplicação na determinação de traços e ultra-traços de elementos em diversos tipos de amostras. Devido ao programa de aquecimento que se estabelece e ao uso de modificadores químicos, é possível realizar pré-tratamentos da amostra no interior do tubo de grafite, tais como digestão, vaporização de concomitantes e estabilização térmica de analitos (Nascimento, 2006). Em geral, a adoção das condições STPF (Stablized Temperature Platform Furnace) é requisito fundamental para o sucesso da análise, uma vez que propicia um aumento da sensibilidade e redução dos índices de interferências (Slavin, Manning *et al.*, 1981).

A técnica de GF AAS não é muito utilizada na determinação elementar em castanhas devido ao caráter monoelementar da técnica e aos longos programas de aquecimento que devem ser estabelecidos para que se possa realizar a quantificação dos analitos. Porém, os limites de detecção são excelentes quando comparados com os de algumas técnicas de emissão.

Neste contexto, a GF AAS foi empregada para avaliar a composição de elementos essenciais (Cu, Cr, Fe e Zn) e tóxicos (Al, Ni, Pb e Cd) em amostras de castanha de caju, amêndoas, amendoim, pistache, nozes, avelãs, entre outras. Os resultados obtidos demonstraram que as faixas de concentração dos analitos nestas castanhas foram de 4 a 25,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cu), 0,25 a 1,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cr), 7,3 a 75,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fe), 25,6 a 69 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Zn), 1,2 a 20,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Al), 0,1 a 0,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ni) e de 0,14 a 0,39 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Pb). Apenas para o Cd as concentrações permaneceram abaixo do limite de detecção (L.O.D.) do método (Cabrera, Lloris *et al.*, 2003).

Em outro estudo, amostras de avelã (com e sem a casca) foram analisadas com o objetivo de determinar a concentração de Se em diferentes espécies (Kara Findik, Tombul, Delisava) provenientes de várias regiões geográficas da Turquia (Kocaali, Karasu, Akyazi, Hendek e Ferizli). As determinações realizadas em avelãs da espécie Tombul (sem casca), provenientes da região de Ferizli, apresentavam um teor maior de selênio (0,024 mg g^{-1}) quando comparadas com a concentração obtida para as demais espécies (Kara Findik e Delisava). Porém, a menor concentração de selênio foi obtida na espécie Delisava (com casca), onde o teor deste elemento foi de 4 $\mu\text{g g}^{-1}$. Neste estudo, verificou-se que, em geral, as variedades de castanhas analisadas apresentavam um teor de selênio maior em amostras descascadas (Dundar e Altundag, 2004).

A análise da composição elementar em castanhas pode, também, ser realizada por ICP OES, a qual possui a capacidade de determinar vários elementos simultaneamente e apresenta um custo de operação/manutenção bastante reduzido quando comparado com a técnica de ICP-MS.

Em geral, na maioria dos métodos estabelecidos para o emprego de ICP OES é necessário converter as amostras sólidas ou pastosas em soluções através da

digestão ácida. A combinação entre forno de micro-ondas com frasco fechado e ácidos diluídos tem contribuído para uma redução da utilização de ácidos na digestão das amostras, gerando uma melhora nos limites de detecção, redução de custo da análise e de resíduos. Baseados nestas condições e possibilidades instrumentais fornecidas por esta técnica espectrométrica, foi realizada a determinação elementar de Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn, B, Si, Cl, P e S em castanhas-do-Pará, babaçu, sapucaia, coco, caju e cupuaçu por ICP OES com vista axial (Naozuka, Vieira *et al.*, 2011). Neste estudo, Ca, K, Mg, P e S foram considerados como macro-elementos nas castanhas analisadas. Porém, a polpa de cupuaçu revelou uma baixa quantidade de Ca e Mg comparadas as demais amostras de interesse. A presença de P e S na de castanha de caju, babaçu e sapucaia foi atribuída a uma provável correlação com o alto teor de proteínas presentes nestas amostras. E o elevado teor de Ba em castanhas-do-pará foi atribuído às características do solo da região Amazônica, o qual é rico em holandita ($Ba_2Mn_8O_{16}$).

Moodley e colaboradores determinaram As, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn em amostras de noz pecã, macadâmias, amêndoas, castanhas-do-Pará e nozes por ICP OES (Moodley, Kindness *et al.*, 2007). Os resultados demonstraram que o teor de As nas diferentes amostras foi próximo de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$. As castanhas-do-Pará apresentaram elevadas quantidades de Ca ($7432,8 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($60 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($9678,5 \mu\text{g g}^{-1}$) e Se ($36,1 \mu\text{g g}^{-1}$) quando comparadas às demais amostras. Porém, as nozes pecãs tiveram maiores concentrações de Fe ($106 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn ($193 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($134 \mu\text{g g}^{-1}$) em relação às amêndoas, macadâmias, castanha-do-Pará e nozes. O teor de Cr para todas as amostras analisadas permaneceu entre $0,9$ e $2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Welna, Klimpel *et al.*, 2008).

Elementos majoritários (Ca, Mg e P) e traços (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) também foram determinados em castanha-do-Pará por ICP OES. Neste estudo, verifica-se que P, Mg e Ca apresentaram concentrações de 7164, 3321 e 1630 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Elementos como Sr, Ba, Fe, Zn, Cu, Mn e Ni estavam em uma faixa de concentração compreendida entre 9 a 115 $\mu\text{g g}^{-1}$. As concentrações de Al e Cr foram de 5,33 e 7,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Wakeling, Mason *et al.*, 2001).

Com o objetivo de verificar se havia diferenças entre as composições químicas de nozes do tipo pecãs foram determinados vários compostos e elementos em amostras provenientes de duas regiões da Austrália. Os resultados obtidos em relação à composição mineral demonstraram que não havia uma grande variação entre as concentrações obtidas a partir da análise destas nozes. A cada 100 g destas nozes foram determinadas 54 μg de Ca, 123 μg de Mg, 472 μg de K, 122 μg de S, 316 μg de P, 1,2 μg de B, 0,4 μg de Cu, 3,7 μg de Fe, 7,8 μg de Mn, 3,8 μg de Na, 6,6 μg de Zn e 2,1 μg de Al (Montes-Bayon, Denicola *et al.*, 2003).

As determinações elementares também são feitas/conduzidas usando ICP-MS. Esta técnica apresenta excelente capacidade de determinação multielementar com elevada sensibilidade quando comparada com os demais equipamentos disponíveis no mercado (Montaser, 1998; Gervasio, Lavorante *et al.*, 2003; Ray, Andrade *et al.*, 2004; Ammann, 2007). Para que sejam realizadas as determinações elementares, o ICP-MS possui uma fonte de plasma e os íons formados são introduzidos no analisador de massas e separados de acordo com sua razão massa/carga e detectados (Nardi, Evangelista *et al.*, 2009).

O elevado potencial da técnica em realizar determinações multielementares levou Rodushkin e colaboradores a avaliar a concentração de 70 elementos em diferentes tipos de castanhas (avelãs, nozes, amêndoas, noz pecã, castanha de

caju, pistache, entre outras). Os resultados obtidos demonstraram que as castanhas apresentam uma variedade ampla de macro e micro constituintes em concentrações diferentes e os elementos potencialmente tóxicos, tais como, As, Cd, Hg, Pb e Tl estavam em concentrações abaixo do limite de detecção (Rodushkin, Engstrom *et al.*, 2008).

Nardi e colaboradores estabeleceram uma metodologia para determinar 16 elementos tóxicos e essenciais em diferentes amostras de alimentos por ICP – MS, sendo que, dentre os alimentos estudados havia o interesse em realizar a determinação elementar em castanha-do-Pará (Nardi, Evangelista *et al.*, 2009). Os estudos demonstraram que Co, Mg e Sr apresentam concentrações entre 480 a 122 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cu, Zn e Se estavam em níveis intermediários (compreendidos entre 20,1 e 41,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Al, As, Cd, Cr, Mn, Mo e Ni permaneceram em uma faixa de concentração compreendida entre 0,038 a 5,3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os demais elementos (Hg, Pb e V) encontravam-se abaixo dos limites de detecção estabelecidos para esta técnica.

Em outro estudo, a determinação de Cu, Mn, Ni e Zn foi realizada em amostras de pinhão (*Pinus pinea*), coletadas em diferentes regiões da Espanha e analisadas por ICP-MS. As determinações revelaram que amostras provenientes da região da Catalunha possuíam baixos teores de Cu (8 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mn (26 $\mu\text{g g}^{-1}$), Ni (2 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (25 $\mu\text{g g}^{-1}$). Porém, os pinhões da região de Faro apresentaram concentrações elevadas de todos os analitos: Cu (41 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mn (559 $\mu\text{g g}^{-1}$), Ni (15 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (113 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Gomez-Ariza, Arias-Borrego *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que nos estudos a técnica de ICP-MS tem sido empregada como fonte de determinação multielementar há um grande apelo em relação aos excelentes limites de detecção. Porém, existem algumas desvantagens

como, por exemplo, as interferências isobáricas, as quais podem comprometer severamente as determinações de alguns elementos, bem como os custos elevados na manutenção e compra de acessórios para o equipamento (Da Silva, Frescura *et al.*, 2000).

1.4. Fracionamento e análise de especiação em castanhas

Apesar da concentração total de um determinado elemento ser importante para se conhecer a composição mineral em castanhas, deve-se ter em mente que esta não reflete a quantidade do nutriente disponível para absorção no organismo (Watzke, 1998). Portanto, em alguns casos, sobretudo para estudos nutricionais é preciso conhecer quais as espécies químicas presentes nestes alimentos.

Como os mecanismos envolvidos nestes processos dependem da interação entre diferentes compostos, a especiação possui um caráter fundamental para entender as variações que ocorrem nestes sistemas. As etapas essenciais para se realizar estudos como estes são: separação; identificação e caracterização das diferentes formas em que os elementos estão associados (Shah e Caruso, 2005).

Em geral, as informações geradas com o fracionamento ou análise de especiação química são obtidas a partir de duas ou mais técnicas. Uma deve apresentar alta capacidade de separação das espécies de interesse e a outra alta sensibilidade, de forma que os analitos sejam detectados, mesmo quando em baixas concentrações (Prange e Schaumlöffel, 2002; Sanz-Medel, Montes-Bayon *et al.*, 2003; Gomez-Ariza, Garcia-Barrera *et al.*, 2004; Gomez-Ariza, Garcia-Barrera *et al.*, 2005; Shah e Caruso, 2005; Mounicou e Lobinski, 2008). Entre as técnicas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência se destaca por ter uma alta

capacidade de resolução e separação das espécies químicas. Com respeito à detecção, as técnicas espectroanalíticas são as mais empregadas devido à maior sensibilidade e robustez dos equipamentos disponíveis no mercado (Da Silva, Frescura *et al.*, 2000; Gervasio, Lavorante *et al.*, 2003; Montes-Bayon, Denicola *et al.*, 2003).

A etapa de preparo da amostra pode ser mais problemática do que aquelas utilizadas nas determinações elementares totais. Isto porque, além do tempo requerido e do árduo trabalho para isolar e quantificar um analito, o resultado final pode vir acompanhado de erros significativos devido a perdas durante as diferentes etapas adotadas, contaminações e as outras incertezas inerentes aos métodos escolhidos (Krug, 2008). Deve-se considerar, também, a instabilidade do analito e ter um compromisso entre o procedimento de preparo da amostra e as condições necessárias para se manter a integridade do composto. Então, as etapas de preparo da amostra, tais como, extração dos analitos e pré-concentração, são fatores fundamentais para se desenvolver uma metodologia voltada à análise de especiação. Neste contexto existem diferentes métodos visando a extração de proteínas e metaloproteínas que são publicados anualmente (Protein Purification Handbook, 1999; Garcia, De Magalhaes *et al.*, 2006; Ogunwolu, Henshaw *et al.*, 2009; Sathe, Venkatachalam *et al.*, 2009). Porém, quando se deseja avaliar o sistema do ponto de vista qualitativo e quantitativo, necessita-se tomar alguns cuidados para preservar a integridade do analito.

Sendo assim, todos os materiais que serão empregados durante a coleta das espécies químicas devem ser verificados para evitar focos de contaminação ou adsorção. Portanto, é preciso lavar todas as vidrarias, deixá-las imersas em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por 24 h e enxaguá-la com água deionizada para posterior

utilização. Os materiais empregados para realizar o tratamento da amostra não devem apresentar superfícies metálicas, caso queira analisar espécies elementares ou biomoléculas associadas à metais. Procedimentos de higiene e limpeza (tais como uso de luvas) empregados durante a etapa de amostragem devem ser adotados para preservar a integridade do analito. A amostra pode ser estocada em ambientes de baixas temperaturas ou liofilizadas e armazenadas como um material seco. Porém, o procedimento de liofilização poderá ser empregado apenas quando a espécie química de interesse for estável. Deve-se evitar o uso de agentes preservantes, mesmo que seja uma simples acidificação da amostra, pois este ajuste poderá afetar a estabilidade das espécies e facilitar processos de interconversão (Cornelis, Caruso *et al.*, 2003). Sendo assim, a etapa de preparo de amostras para estudos de espécies elementares e/ou biomoléculas associadas a metais é uma tarefa árdua e bastante meticulosa.

Dentre os procedimentos de preparo de amostra que visam a extração e caracterização de proteínas em sistemas alimentares, destacam-se os estudos realizados por Sathe, os quais buscam avaliar a solubilidade de proteínas empregando diferentes extratores, tais como água, tampão acetato pH = 4,5, tampão fosfato pH = 7,5, solução alcalina (NaOH) e etanólica. O procedimento experimental adotado consistia na moagem da amostra e extração da fase lipídica, utilizando-se uma solução de acetona em temperaturas abaixo de 4°C. Em seguida, a mistura era filtrada e a amostra isenta de lipídeos foi submetida a um processo de extração de proteínas com as soluções mencionadas anteriormente. A partir dos resultados experimentais, verificou-se que havia maior solubilidade das proteínas ao realizar a extração em pH menor que 3 e acima de 7, pois ao trabalhar em regiões de pH entre

5 e 6, havia a precipitação das proteínas devido ao ponto isoelétrico das mesmas (Sathe, 1994).

Considerando esta influência do pH no processo de extração de proteínas, Bora e colaboradores submeteram amostras de macadâmia (*Macadamia integrifolia*) à extração em meio de soluções de HCl (pH = 2), tampão fosfato (pH = 7,2) e NaOH (pH = 12). As soluções provenientes das etapas extrativas eram centrifugadas, os sobrenadantes coletados e realizada a precipitação das proteínas em pH = 5. O precipitado obtido era ressuspenso em água e adicionava-se solução de HCl, NaOH ou tampão fosfato até obter pH igual a 2, 12 ou 7,2, respectivamente. Os resultados demonstraram que as soluções alcalina e tamponada apresentavam uma eficiência de extração de 83%. Enquanto que a solução de HCl extraiu apenas 50% dos analitos (Bora e Ribeiro, 2004).

Em outro estudo, o efeito salino na solubilidade de proteínas foi observado a partir de amostras de castanha de caju, as quais foram previamente submetidas à extração da fase lipídica com hexano. A solubilização das proteínas foi realizada em meio alcalino (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e precipitadas com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ até pH = 4,5. Em seguida, diferentes soluções de NaCl, em concentrações crescentes, eram utilizadas para verificar a influência deste composto na solubilidade das proteínas. Verificou-se que a solubilização aumentava a medida que a concentração salina se tornava maior. Porém, a partir de 0,75 mol L⁻¹ de NaCl havia uma máxima solubilização e, logo após, ocorria uma redução na intensidade do sinal analítico. Segundo os autores, ao se trabalhar em regiões de ponto isoelétrico (P.I.) iguais a 4,5, ou seja, em regiões em que a quantidade de cargas negativas e positivas presentes nas proteínas são iguais, o aumento do teor salino propiciava a interação entre íons cloreto e a parte positiva da molécula (grupo amino), bem como, a

interação dos íons sódio com o grupo carboxilato (parte negativa da molécula) aumentando a solubilidade das proteínas. (Bora e Neto, 2004).

Os estudos anteriores avaliaram a extração de compostos apenas do ponto de vista molecular.

Porém, se considerarmos que as proteínas em organismos celulares podem apresentar espécies elementares associadas à sua estrutura, verifica-se que as possibilidades de descobertas e realização de uma avaliação mais abrangente sobre os compostos proteicos presentes nos alimentos são bastantes promissoras (Ammerman, Baker *et al.*, 1995; Wilson, Apiyo *et al.*, 2004).

Vonderheide e colaboradores caracterizaram espécies proteicas contendo selênio em castanhas aplicando a cromatografia líquida e a espectrometria de massas com plasma de indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS). A etapa de preparo da amostra consistia na remoção da fração lipídica empregando uma mistura contendo H_3C-OH e $HCCl_3$. Após a retirada dos lipídeos, a amostra foi separada em diferentes porções para que fosse realizada as extrações das espécies de interesse empregando extratores como água, ácido clorídrico e uma mistura contendo proteinase K + tampão Tris-HCl (pH = 7,5). As soluções contendo água e ácido clorídrico foram introduzidas em um micro-ondas com cavidade para que fosse obtida a extração das espécies químicas e o extrato contendo proteinase K foi incubado em um banho termostático à 37 °C, por 20 h sob agitação constante. A partir destas diferentes soluções extratoras, os autores conseguiram identificar espécies como selenometionina, selenoetionina e selenocistina, as quais foram consideradas majoritárias quando comparadas com os seleno-aminoácidos. Os picos cromatográficos não identificados durante o processo de separação foram coletados e analisados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray

(ESI-MS). Porém, apesar da estrutura peptídica ter sido identificada, os resultados não puderam ser conclusivos devido ao elevado ruído produzido pela composição matricial da castanha no sistema ESI-MS (Vonderheide, Wrobel *et al.*, 2002).

Apesar do acoplamento “*on-line*” entre um cromatógrafo e um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite não ser viável, a detecção das espécies químicas pode ser feita por medidas “*off-line*”. O analito, proveniente da coluna cromatográfica é inicialmente coletado em diferentes frascos e, posteriormente, determinado por GF AAS. Em recentes trabalhos do grupo foi realizada a separação de proteínas e associação com os elementos Se, Cu, Fe, Mn e Zn em castanha-do-pará, semente de cupuaçu e polpa de coco utilizando o sistema SEC-UV GF AAS. Neste estudo foi utilizada solução contendo uma mistura de clorofórmio + metanol para realizar a extração de lipídeos, bem como, água, solução salina (NaCl), alcoólica (etanol) e alcalina (NaOH) para a extração sequencial de proteínas nestas matrizes. A partir desta avaliação pode-se correlacionar a possível interação entre metais e proteínas nestes diferentes meios extratores e verificar se Cu, Fe, Mn e Zn, estavam associados aos seguintes grupos proteicos: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em NaCl), prolaminas (solúveis em etanol) e glutelinas (solúveis em NaOH). Os resultados indicaram que a castanha-do-Pará possui quantidades consideráveis de proteínas quando comparada com a semente de cupuaçu e polpa de coco. Em relação às espécies elementares, notou-se que Fe está presente nas frações lipídicas da castanha-do-Pará e semente de cupuaçu, enquanto o Zn se encontra associado a fração lipídica extraída da polpa de coco (Naozuka, Marana *et al.*, 2007; Naozuka e Oliveira, 2007b).

As determinações elementares nos extratos proteicos de castanha indicaram que Cu, Fe, Mn e Zn podem estar associados, preferencialmente, às albuminas,

globulinas e glutelinas. Sendo que, as maiores concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram encontradas na fração alcalina (glutelinas) (Naozuka e Oliveira, 2007a).

1.5. Bioacessibilidade de nutrientes minerais em amostras de castanhas

Os estudos realizados para verificar correlações entre espécies elementares e moleculares geralmente não consideram que ao ser ingerido um alimento passará pela ação de diferentes enzimas até ocorrer o processo de absorção deste composto pelo organismo humano.

De forma geral, o processo de transformação de um nutriente/mineral no interior do sistema digestivo se inicia na boca, onde ocorre a trituração do alimento e, devido à ação da amilase salivar, tem-se a primeira degradação do amido, o qual é convertido em maltose. Posteriormente, o bolo alimentar segue em direção ao esôfago e, em seguida, ao estômago. O estômago possui uma elevada acidez, devido a produção de ácido clorídrico (HCl), o qual facilita a conversão do pepsinogênio em pepsina, sendo esta empregada na degradação de proteínas, levando à produção de aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos (Silverthorn, Ober *et al.*, 2003). Após uma parte do alimento acidificado (quimo) ser digerido no estômago, este é direcionado para o intestino delgado, onde enzimas e fluidos são adicionados ao quimo através do pâncreas e fígado. A ação de bicarbonato, secretado pelo pâncreas, neutraliza o quimo acidificado prevenindo danos à mucosa intestinal. O epitélio do intestino, juntamente com o pâncreas, secretam fluidos contendo enzimas (amilase, lipase, protease, peptidase) que agem na digestão de amido, proteínas, carboidratos e gorduras. O fígado adiciona bile, que é uma mistura complexa que contém resíduos que serão excretados e agentes que auxiliam na

digestão de gorduras. Posteriormente, tem-se a absorção no intestino delgado dos produtos gerados por esta sequência de quebras enzimáticas, bem como a absorção de vitaminas e sais minerais. A água é absorvida no intestino grosso e, logo após, tem-se a defecação (Silverthorn, Ober *et al.*, 2003).

Após este longo processo de digestão o nutriente/mineral poderá ser absorvido, metabolizado e utilizado na manutenção do organismo. Ou seja, todas estas etapas representam a biodisponibilidade de um analito. Mas, para que seja estimada a biodisponibilidade de um nutriente em laboratório é necessário que se utilize métodos *in vitro* (os quais utilizam soluções enzimáticas previamente preparadas) ou *in vivo* (balanço químico, depleção seguida de repleção do nutriente, medidas do aparecimento do nutriente no plasma sanguíneo ou avaliação da atividade de enzimas após a suplementação do nutriente e o emprego de traçadores com radioisótopos ou isótopos estáveis) (Fairweathertait, 1992; Mellon, Eagles *et al.*, 1993; Kulkarni, Acharya *et al.*, 2007; Cozzolino, 2009; Diaz-Bone e Van De Wiele, 2010).

Os procedimentos *in vitro* são amplamente utilizados desde meados de 1930 devido a simplicidade, baixo custo, possibilitarem a determinação da quantidade solúvel ou dialisável do nutriente e permitirem o controle apurado de variáveis, tornando-se modelo importante no sentido de inferir aspectos sobre os processos *in vivo* (Cozzolino, 2009). Porém, não é possível avaliar a biodisponibilidade deste propriamente dita, uma vez que nem todo material solúvel ou dialisável é absorvido pelo organismo. Portanto, o método não reproduz a maioria dos fatores fisiológicos envolvidos na absorção e utilização do nutriente.

Apesar de haver diferentes métodos analíticos para se realizar estudos de biodisponibilidade *in vitro*, o procedimento estabelecido pela United States

Pharmacopeia (USP) é um dos mais aceitos e empregados. Esse método consiste em empregar soluções contendo componentes que simulam os fluidos gástrico (pepsina + HCl) e intestinal (Pancreatina + Sais Biliares + KH_2PO_4 + NaOH), possibilitando a simulação do trato gastro-intestinal e iniciar as primeiras avaliações sobre a bioacessibilidade de um nutriente (US Pharmacopeia XXIV & National Formulary, 2000).

Na literatura, os procedimentos *in vitro* têm sido empregados, por exemplo, para avaliar o comportamento de espécies de Se associadas à aminoácidos em amostras de castanha-do-Pará. Os resultados demonstraram que selenocisteína e selenometionina foram extraídos em proporções diferentes quando a amostra foi submetida ao processo digestivo. Selenocisteína apresentou uma maior extração no fluido gástrico, enquanto que na etapa intestinal havia extração de selenometionina. Apesar do processo de extração ser diferente em cada etapa, os autores não observaram transformações/conversões destas espécies durante a digestão (Dumont, De Pauw *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Ritter e Savage foi desenvolvido com o intuito de avaliar a presença de oxalato em amostras de castanha. Então, as amostras foram submetidas a ação do fluido gástrico e intestinal por 2 h à 37 °C e realizada a separação e determinação deste analito por cromatografia. Foi constatado que nas castanhas de caju e noz pecã havia uma pequena quantidade de oxalato solúvel extraído para o fluido gástrico. Mas, o teor de oxalato presente na etapa gástrica foi elevado nas castanhas-do-Pará, amêndoas e nozes. A digestão intestinal das amostras demonstrou que a extração deste analito foi reduzida nas nozes, ginkgo e noz-pecã. Porém, as demais castanhas apresentaram uma quantidade maior de oxalato após a digestão intestinal. Esta avaliação demonstra que apesar das

amostras de castanhas possuem um elevado teor elementar, algumas espécies podem ser complexadas e se tornarem não bioacessíveis durante a digestão gastrointestinal devido à presença de compostos insolúveis nestas matrizes. Um exemplo deste tipo de interação seria a formação de oxalatos insolúveis de cálcio durante o processo digestivo (Ritter e Savage, 2007).

Considerando os estudos apresentados anteriormente, verifica-se que a avaliação do teor elementar em amostras de castanhas é a primeira etapa para que se possa conhecer a importância nutricional de um mineral. Sendo, ainda, necessário estabelecer procedimentos de extração de espécies moleculares e elementares nestes alimentos e, também, avaliar a biodisponibilidade das espécies de interesse empregando ensaios *in vitro*. Outro fator importante seria verificar a formação de espécies químicas neste processo digestivo para que os resultados obtidos a partir desta estudo possam auxiliar na compreensão do processo de absorção de um elemento pelo organismo humano.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies moleculares associadas aos elementos Ca, Cu, Fe, Mg e Zn bem como avaliar a bioacessibilidade dos mesmos em castanha de caju (*Anacardium occidentale*). Como objetivos decorrentes foram avaliados diferentes procedimentos de extração de proteínas, determinações de proteínas, determinações totais dos elementos e de espécies associadas às proteínas.

3. Parte Experimental

3.1. Instrumentação

As amostras foram moídas em um processador de alimentos (Walita – PA 012 – Brasil) em um intervalo de tempo de 5 minutos.

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica (Ohaus Adventurer – Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) com precisão de até quatro casas decimais (0,0001 g).

A agitação das misturas durante as extrações foi feita em uma mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil). A separação entre a solução extratora e o resíduo foi realizada com um sistema de filtração a vácuo com membrana de éster de celulose de 0,45 μm de porosidade (Millipore – Brasil).

Uma centrífuga, modelo Q222 TM (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) foi utilizada para separar as proteínas precipitadas da solução sobrenadante e para separar a solução gastro-intestinal obtida a partir da digestão simulada das amostras de castanha de caju. Para os estudos de biodisponibilidade foi utilizado um banho Dubnoff Microprocessado, modelo Q226M2 (Quimis).

A determinação das proteínas foi realizada utilizando duas metodologias: determinação da concentração total por intermédio da análise de nitrogênio e empregando um método espectrofotométrico. As determinações do teor de nitrogênio total nas amostras de castanha de caju (com e sem gordura) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, empregando um analisador elementar CHNS (Perkin Elmer 2400). O teor de

proteínas nas soluções extratoras foi determinada usando um espectrofotômetro UV – Visível, modelo 700 S (Fento, São Paulo, Brasil).

As amostras de castanhas de caju e material de referência certificado (Citrus Leaves, SRM 1572, NIST, USA) foram digeridas em forno de micro-ondas de alta pressão (Anton Paar, Multiwave 3000, Graz, Áustria) com emprego de frasco fechado de PFA, com um sistema de monitoramento da pressão e temperatura no vaso de referência e controle individual da temperatura dos frascos durante o programa de aquecimento.

As amostras digeridas foram analisadas por ICP OES com detecção simultânea e vistas axial e radial, detector CID (Charge Injection Device – quarta geração RACID86) modelo iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Reino Unido). O equipamento é composto por uma ótica Duo a qual possibilita a determinação de elementos em baixas concentrações empregando a vista axial e em altas concentrações a vista radial. As leituras no modo axial e radial são selecionadas automaticamente pelo programa iTEVA. O sistema ótico, composto de um sistema de difração Policromador Littrow com rede de difração Echelle (52,91 linhas/mm), purgado com argônio, que permite um intervalo de trabalho de 166 a 847 nm, com 383 mm de distância focal. Um gerador de rádio frequência (27,12 MHz) de estado sólido acoplado a tocha possibilita a aplicação de potências entre 750 e 1350 W. O sistema de introdução de amostra consistiu de um nebulizador concêntrico (tipo Meinhard), câmara de nebulização ciclônica e tocha com injetor de quartzo (2 mm de canal central). As amostras foram introduzidas na câmara de nebulização por uma bomba peristáltica acoplada ao equipamento e sua rotação controlada pelo software iTEVA. O gás de formação do plasma foi o Argônio 99,998% v/v (Air Liquid – São Paulo, SP, Brasil), o qual foi responsável por gerar um

plasma estável e quimicamente inerte. Os parâmetros instrumentais para operação do equipamento estão apresentados na Tabela 1. Essas condições adotadas foram obtidas a partir da otimização do equipamento utilizando solução aquosa contendo 2 mg L⁻¹ de Mg (Merck) em meio de 0,1% HNO₃ (Merck) para obtenção das condições robustas, otimização da pressão do gás de nebulização para auxiliar no tempo de residência da amostra no interior do plasma, otimização da vazão de gás auxiliar com o objetivo de aumentar a transferência de energia do plasma para os analitos e escolha do melhor comprimento de onda no ICP OES realizando-se varreduras nas amostras digeridas e comparando com as realizadas a partir de soluções analíticas de referência (5 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn).

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para operação do ICP OES

Rotação da bomba	25 rpm
Pressão do gás de nebulização	0,1 Mpa
Vazão de gás auxiliar	1 mL / min
Orientação da tocha	Modo Duo (Axial e Radial)
Potência de Radiofrequência	1250 W
Vazão do gás do plasma	12 L / min
Tempo de integração	Alto comprimento de onda: 5 s
	Baixo comprimento de onda: 15 s
Linhas analíticas (vista axial)	Ca (I) = 422,6 nm
	C (I) = 193,0 nm
	Cu (I) = 327,3 nm
	Fe (II) = 240,4 nm
	Mg (II) = 279,5 nm
	Zn (I) = 213,8 nm

(I) Linhas Atômicas e (II) Linhas Iônicas

A análise de especiação redox de ferro (Fe(II) e Fe(III)) foi realizada através de módulos de análises construídos com microbombas solenóides (Bio-Chem), como dispositivos de propulsão e inserção de soluções. Os dispositivos empregados foram controlados por um microcomputador, sendo que o programa para controle destes dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0. Nos sistemas de análises em fluxo foram utilizados tubos de polietileno (0,8 mm d.i.). Para a medida dos sinais foi empregado um espectrômetro multicanal (Ocean Optics, USB 2000) acoplado à uma lâmpada de tungstênio – halogênio (Ocean Optics, LS – 1) e fibras ópticas foram utilizadas para a condução da radiação. As medidas foram efetuadas com cela de fluxo capilar com 100 cm de caminho óptico, 250 µL de volume interno e empregando um comprimento de onda de 510 nm para leitura das soluções de água de diálise (Melchert, 2009).

As separações cromatográficas foram realizadas usando coluna de exclusão por tamanho (SEC) na qual se emprega a separação de macromoléculas através de uma coluna cromatográfica onde a fase móvel flui pelo interior da coluna sob uma vazão constante, de modo que esta solução passe por dentro e entre os poros da matriz do gel, os quais possuem tamanhos controlados (Wu, 1995; Skoog, Holler *et al.*, 2002). Sendo assim, ao injetar uma amostra contendo moléculas de pesos moleculares diferentes, verifica-se que os compostos de peso molecular menor ou igual ao tamanho do poro da matriz do gel permanecem temporariamente nos poros e passam para os seguintes de forma sucessiva. As moléculas maiores, as quais possuem um tamanho elevado para ser acomodada e permanecer no interior dos espaços intersticiais, serão excluídas e passam rapidamente por toda a coluna sem que residam no interior dos poros (Figura 1). Portanto, o processo de separação pode ser dividido em três partes: (1) eluição de compostos de alto peso molecular,

(2) separação de compostos de peso molecular intermediário e (3) eluição de moléculas de baixo peso molecular. Ou seja, o processo de eluição dos compostos ocorre em ordem decrescente de peso molecular (Guntinas, Bordin *et al.*, 2002; Millea e Krull, 2003; Kannamkumarath, Wrobel *et al.*, 2005).

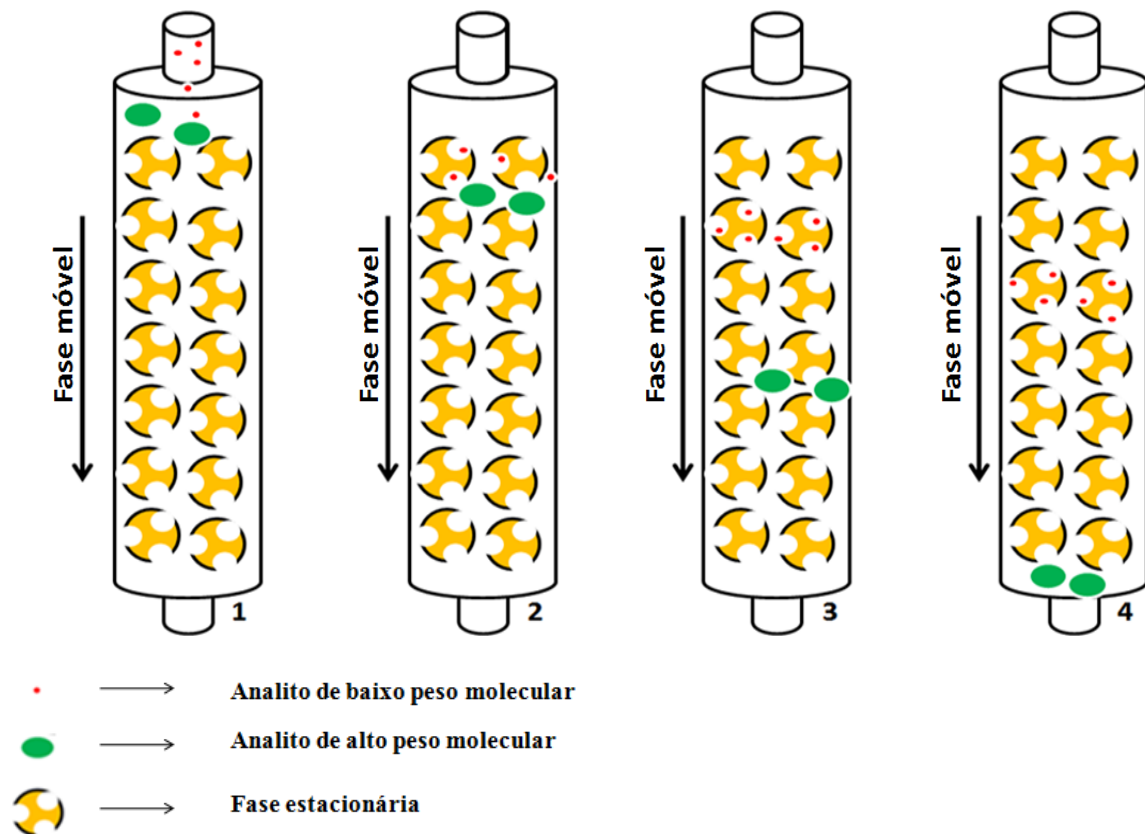


Figura 1: Desenho esquemático de um processo de separação por SEC: (1) Entrada da amostra no topo da coluna; (2) Etapa inicial do processo de separação; (3) Separação das macromoléculas em função de seus respectivos tamanhos; e (4) Término do processo de separação

Em cromatografia de exclusão por tamanho usa-se o gel ou similar para fornecer os poros nos quais se dá a separação, mecanismo o qual permite a distribuição do analito entre a fase móvel dentro e fora dos poros. Porém, para

avaliar o peso molecular de cada macromolécula é necessário considerar os seguintes parâmetros:

- a) volume ocupado pela fase móvel intragel, ou seja, no interior dos poros (V_i);
- b) volume da fase móvel fluindo fora dos poros do gel (V_o);
- c) o volume total da fase móvel expresso como a soma do volume dentro e fora dos poros ($V_T = V_i + V_o$).

As macromoléculas de pesos moleculares maiores, com tamanhos superiores aos dos poros são eluídas em V_o , as menores em V_i e as proteínas de tamanho intermediário serão eluídas em um volume compreendido entre V_o e V_i .

A extensão na qual um analito pode penetrar os poros do gel é dada pelo coeficiente de distribuição (K_D), o que está relacionado com o volume de fase móvel que carrega as moléculas através da coluna (V_R ou V_e), sendo assim:

$$K_D = \frac{V_R - V_o}{V_i}$$

Equação 1

Quando toda a fase do gel necessita ser considerada, devido a dificuldade de se medir V_i , o coeficiente de distribuição é K_{AV} , sendo a expressão dada por:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_T - V_o}$$

Equação 2

Ao considerar uma série de compostos com moléculas de formas e densidades similares, verifica-se que há uma relação entre os valores de K_{AV} e o logaritmo de suas massas molares ($\log P.M.$). Sendo assim, pode-se construir uma

curva de calibração para estimar o peso molecular de uma proteína. A possibilidade de estimar o peso molecular de compostos não é a única aplicação da SEC, pois a mesma pode ser utilizada para realizar a purificação de macromoléculas e estudo das interações e/ou auto-associações com outras moléculas presentes em um determinado meio (Irvine, 1997). Outra aplicação da cromatografia de exclusão por tamanho está relacionada à separação de complexos contendo biomoléculas associadas a espécies elementares e a possibilidade de estabilização destes compostos devido a aplicação de fases móveis não desnaturantes (como, por exemplo, o tampão Tris – HCl) que trabalham em pH fisiológico e evitam mudanças estruturais nas biomoléculas de interesse (Prange e Schaumlöffel, 2002).

O equipamento utilizado para realizar as separações por SEC consistia de um cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com sistema de degaseificação (DGU – 20 A3), bomba de pistão (LC – 6 AD), detector UV – Vis (SPD – 20 A) e sistema de coleta de frações (FRC – 10 A) contendo 110 posições. A injeção da amostra foi realizada com uma microsseringa (Hamilton Company, Nevada, EUA) com capacidade para 250 µL, sendo esta inserida diretamente em uma alça de amostragem de 100 µL localizada na parte lateral do equipamento. A aquisição de dados foi feita com um micro-computador (LG, São Paulo, Brasil). Uma coluna de exclusão por tamanho (Superdex 75, Amersham Biosciences) foi empregada na separação das metaloproteínas.

As frações obtidas a partir do processo de separação cromatográfica foram analisadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea (SIMAA-6000 – Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) para determinação de Fe. Este instrumento é equipado com sistema de correção de fundo baseada no efeito Zeeman, sistema óptico de separação da

radiação constituído de um prisma e uma rede Echelle, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada, aquecimento transversal e detectores de estado sólido, constituído de um arranjo contendo 60 fotodiodos. As soluções foram dispensadas no tubo de grafite por meio do amostrador automático, modelo AS – 72, do mesmo fabricante. As condições instrumentais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições instrumentais utilizadas para determinação de Fe por SIMAAS 6000

Elemento	λ (nm)	Lâmpada	I (mA)	Resolução Espectral (nm)	Condições de Operação
Fe	248,3	HCL	25	0,8	Monoelementar

HCL: Hollow Cathode Lamp (Lâmpada de cátodo oco)

Argônio 99,998% v/v (Air Liquid – São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como gás de purga e de proteção do tubo de grafite em ambos os espectrômetros.

Foram realizadas, também, as determinações de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nas frações coletadas, a partir do eluído proveniente da separação cromatográfica, no ICP OES modelo iCAP 6500 Duo ICP.

3.2. Reagentes e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza (18 M Ω cm) obtida pelo sistema de ultrapurificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição realizada em destiladores de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

Soluções analíticas de referência foram preparadas em meio de 0,1% v/v de HNO_3 por meio de sucessivas diluições da solução Tritisol (Merck) de 1000 mg L^{-1} de cálcio (CaCl_2), cobre (CuCl_2), ferro (FeCl_3), magnésio (MgCl_2) e zinco (ZnCl_2). Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno (Sarstedt, São Paulo, Brasil).

A extração da fase lipídica das amostras de castanhas de caju foi realizada com o uso de uma mistura contendo clorofórmio e metanol (Merck).

A etapa de extração das proteínas foi realizada com soluções de NaOH (Merck), Tampão Tris-HCl, preparado a partir de tris-(hidroximetil)-aminometano (Merck) e ácido clorídrico (Merck) e água deionizada.

As amostras de castanha foram adquiridas no Mercado Municipal Paulistano, localizado na Rua da Cantareira, nº 306, Parque Dom Pedro II, São Paulo, Brasil.

As proteínas foram determinadas após calibração do espectrofotômetro com soluções analíticas de referência, preparadas por meio de diluições sucessivas de uma solução padrão de Albumina de Soro Bovino e reagente de Bradford, o qual contém o corante Comassie Blue Brillhant Blue G-250 (Bio Agency, São Paulo, Brasil) em meio de metanol e ácido fosfórico (85% v/v), ambos Merck.

O processo de digestão gastro-intestinal foi realizado utilizando os seguintes reagentes: NaCl (Merck), pepsina (Sigma Aldrich, Saint Louis, E.U.A), HCl (Merck), NaHCO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), K_2HPO_4 (Synth, Diadema, Brasil), NaOH (Merck), pancreatina (Sigma Aldrich, Saint Louis, E.U.A.) e sais biliares (Sigma Aldrich, Saint Louis, E.U.A.).

A fase móvel foi preparada a partir de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tris-(hidroximetil)-aminometano (Merck) em meio de HCl (Merck) em $\text{pH} = 7,5$.

Para calibração da coluna cromatográfica foi realizada a dissolução dos padrões de proteínas em água deionizada, para isto empregaram as seguintes proteínas: Ovoalbumina (43 kDa), Ribonuclease (13,7 kDa), Aprotinina (6,5 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Blue Dextran (2000 kDa) (GE Healthcare, Reino Unido).

A digestão total das amostras foi realizada empregando 200 mg de castanha de caju + 2 mL de HNO₃ (Merck) + 1 mL de H₂O₂ (Merck) + 3 mL de água deionizada. A solução final (pós digestão) foi diluída com água deionizada até completar um volume de 10 mL. O procedimento acima também foi empregado na digestão do material de referência certificado (Citrus Leaves, SRM 1572, NIST, USA) para verificação da exatidão da metodologia estabelecida por ICP OES. O programa de aquecimento do forno de micro-ondas está descrito na Tabela 3.

Para a determinação da concentração de carbono residual nas soluções digeridas, foi preparada solução estoque com uréia (CH₄N₂O, Reagen, Brasil) em meio aquoso. A partir desta solução foram preparadas soluções analíticas de referência de carbono a partir de diluições sucessivas da solução estoque (0,5; 1,0; 5,0; 10 mg L⁻¹ de C).

As amostras digeridas foram analisadas por ICP OES para a determinação das concentrações totais de C (residual), Ca, Cu, Fe, Mg e Zn utilizando os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 1. Essas condições adotadas foram obtidas a partir da otimização do equipamento utilizando solução aquosa contendo 2 mg L⁻¹ de Mg (Merck) em meio de 0,1% v/v HNO₃ (Merck) para obtenção das condições robustas e escolha do melhor comprimento de onda no ICP OES realizando-se varreduras nas amostras digeridas e comparando com as realizadas a partir de solução analítica de referência (5 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn).

Tabela 3: Programa de aquecimento para digestão ácida das amostras de castanha de caju em forno de micro-ondas

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

*Etapa de resfriamento

3.3. Extração e determinação elementar e proteica

A figura 2 apresenta um esquema representativo das diferentes estratégias analíticas adotadas para realizar a determinação molecular e elementar em castanha de caju.

O procedimento de determinação e extração de proteínas apresentado neste esquema representativo demonstra que a amostra de castanha passa pelos seguintes processos:

- a) Trituração em um multiprocessador de alimentos por um intervalo de tempo de 5 min;
- b) Pesagem (cerca de 6 g) em tubos de polipropileno de 50 mL;
- c) Determinação de nitrogênio total presente em amostra isenta de gordura empregando um analisador elementar CHNS com objetivo de avaliar o teor total de proteínas na castanha de caju;
- d) Extração da fase lipídica com 30 mL de solução contendo metanol/clorofórmio na proporção de 1:2;

- e) Determinação de nitrogênio total após as amostras serem submetidas ao processo de extração da fase lipídica para que fosse possível avaliar se a etapa de retirada da fase gordurosa afetaria o teor proteico das amostras de castanha de caju;
- f) Filtração da fase orgânica (gordurosa) em um sistema da Millipore com membrana de éster de celulose de 0,45 μm de porosidade;
- g) Extração das proteínas;

O processo de extração de proteínas foi realizado empregando as seguintes soluções: 30 mL de solução 1 mol L⁻¹ de NaOH; 30 mL de água deionizada; 30 mL de solução 0,5 mol L⁻¹ de Tampão Tris-HCl (pH = 7,5).

- f) Agitação da mistura em um agitador automático por 1 h a uma velocidade de rotação de 350 rpm;
- g) Centrifugação da solução e coleta do sobrenadante.

O sobrenadante de cada solução extratora foi analisado por ICP OES empregando as condições instrumentais apresentadas na Tabela 1 para determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn.

Para a determinação de proteínas nos diferentes extratores (água, tampão Tris-HCl e NaOH) foi utilizado o método de Bradford, que não é específico e, por isso, forneceu informação da concentração total de proteínas presentes nestes extratos. O método de Bradford consiste em uma análise espectrofotométrica que utiliza um corante (Comassie Brilliant Blue G-250), o qual se complexa com as proteínas presentes na amostra conferindo propriedade absorvente a elas em comprimento de onda de 595 nm.

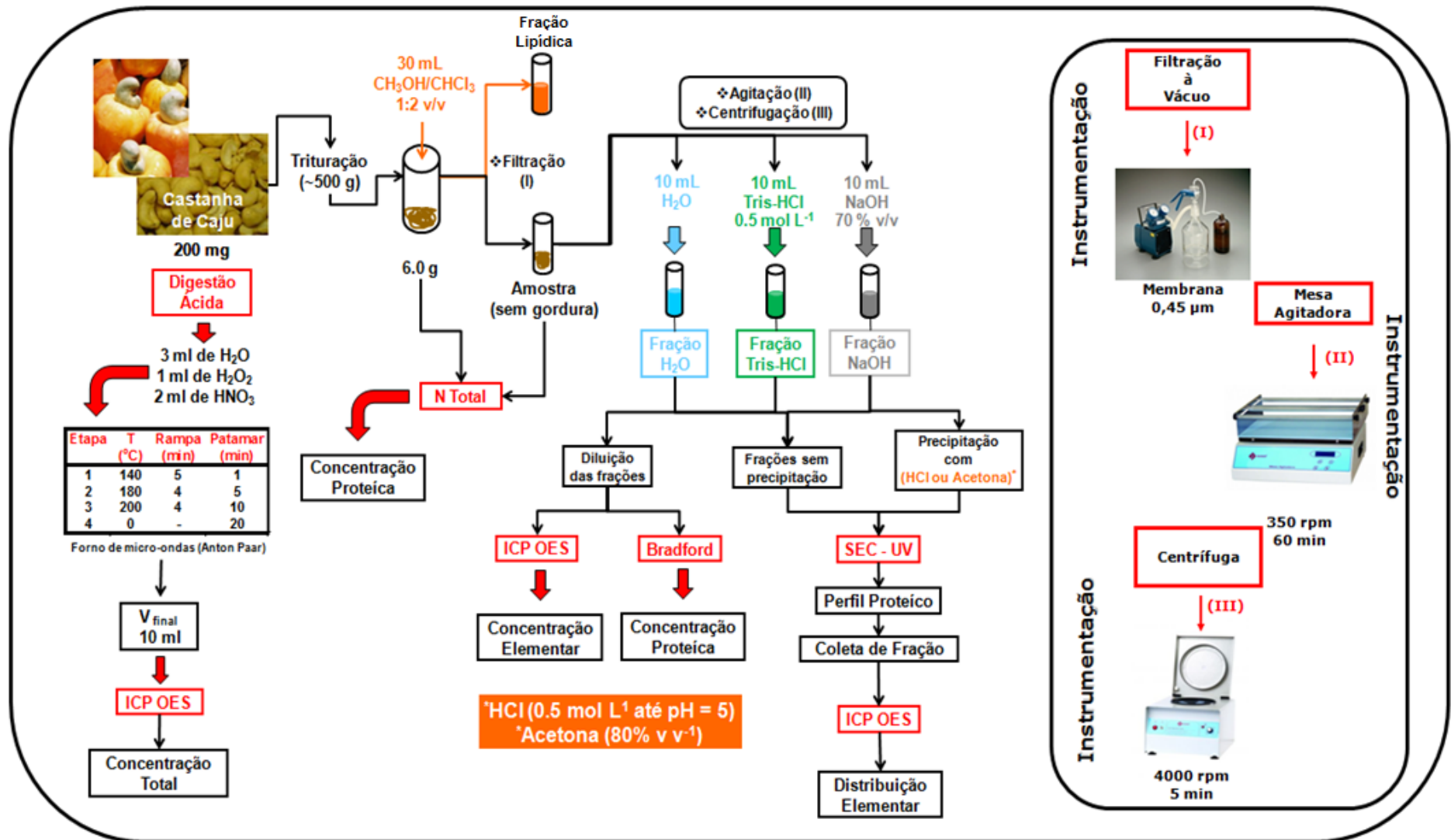


Figura 2: Esquema do processo de extração e análise de metaloproteínas em castanha de caju

A calibração do espectrofotômetro foi realizada com soluções padrão de Albumina ($0 - 18 \mu\text{g mL}^{-1}$), a partir da diluição de uma solução estoque. O procedimento consistiu em misturar $1000 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford com $100 \mu\text{L}$ das soluções extratoras, sendo necessário aguardar 5 min para a medida espectrofotométrica em $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Siloto, 2005).

A determinação da porcentagem de proteínas totais foi realizada a partir dos resultados obtidos da análise do teor de nitrogênio presente nas amostras de castanhas de caju. Os resultados foram comparados com os obtidos com a extração de proteínas realizada com solução de NaOH (1 mol L^{-1}), Tampão Tris-HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,5) e extrato aquoso (água deionizada), posteriormente determinadas usando o método de Bradford. A partir do teor de proteínas totais nas amostras foi possível estimar a porcentagem de proteínas extraídas em cada caso.

A solução sobrenadante também foi analisada por SEC-UV para obtenção do perfil de distribuição molecular de cada extrator, porém, antes da introdução da amostra no sistema cromatográfico, realizava-se a diluição em Tampão Tris-HCl (pH = 7,5). Após o processo de separação e identificação dos compostos moleculares empregando detector espectrofotométrico ($\lambda = 280 \text{ nm}$) foi realizada a coleta de frações ($V = 0,5 \text{ mL}$ em cada tubo), diluição de cada solução com Tampão Tris-HCl (pH = 7,5), agitação da mistura em um sistema vortex e determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES empregando as condições instrumentais apresentadas na Tabela 1. Obtendo-se o perfil de distribuição elementar das soluções extratoras. Os dados obtidos a partir das determinações por SEC-UV e ICP OES foram sobrepostos empregando um programa gráfico (Origin Pro 8), permitindo-se assim, avaliar a presença/correlação entre espécies moleculares e elementares presentes nas soluções extratoras.

Alíquotas das soluções extratoras também foram submetidas a uma etapa de limpeza (“clean up”) utilizando diferentes agentes precipitantes (HCl ou Acetona) para melhorar as condições de resolução/separação cromatográfica das proteínas conforme o procedimento descrito a seguir:

- a) Precipitação com HCl 1 mol L⁻¹ até obter pH = 5,0
- b) Precipitação com acetona na proporção 1:4 v/v (solução extratora: acetona)
- c) Centrifugação das proteínas e coleta do precipitado
- d) Os precipitados foram ressuspensos e analisados por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-UV), utilizando solução contendo Tampão Tris/HCl (pH = 7,5) como fase móvel e diluente. Em seguida, procedeu-se a coleta das frações em frascos de vidro com posterior determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES.

Os dados obtidos a partir deste processo de separação molecular e determinação elementar foram sobrepostos e comparados com os perfis obtidos antes da etapa de “clean up”

3.4. Preparo das soluções de fluido gástrico e intestinal

A digestão gastrointestinal simulada da castanha de caju foi realizada usando soluções de fluido gástrico (1^o estágio) e fluido intestinal (2^o estágio).

O preparo do fluido gástrico foi realizado misturando 0,2 g de NaCl (Merck) + 0,32 g de pepsina (Sigma Aldrich) + 0,7 mL de HCl 12 mol L⁻¹ (Merck). Sendo que, antes da adição de HCl os sais e enzimas foram dissolvidos em água deionizada. Em seguida, o volume da solução foi completado para 100 mL com água. O pH desta solução foi mantido em 1,2 adicionan-se gotas de HCl 0,1 mol L⁻¹.

Uma solução de NaHCO_3 3% (m/v) foi utilizada para aumentar o pH da solução gástrica de 1,2 para 6,8, para que fosse possível atingir a condição necessária para se realizar a digestão intestinal. Para o preparo dessa solução, 3 g de NaHCO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada.

O fluido intestinal consistia de uma mistura de 0,68 g de K_2HPO_4 (Synth, Diadema, Brasil) + 7,7 mL de NaOH 0,2 mol L^{-1} (Merck) + 1,0 g de pancreatina (Sigma Aldrich) + 1,25 g de sais biliares (Sigma Aldrich). O volume foi ajustado com água deionizada para 100 mL e o pH da mesma foi mantido em 6,8.

3.5. Digestão Gastro-Intestinal

As soluções, descritas no item anterior, foram utilizadas para simular a digestão gastro-intestinal, conforme esquema na Figura 3.

O diagrama apresentado na Figura 3 demonstra os processos mecânicos e químicos que a amostra sofreu durante o processo de digestão simulada. Inicialmente a amostra foi triturada e uma massa de 200 mg foi colocada em frasco de polipropileno do tipo Falcon (50 mL) e, em seguida, procedeu-se a adição de 3 mL da solução gástrica. Esta solução foi aquecida em um banho termostático por 2 h à 36 °C, com agitação constante. Para a digestão intestinal, adicionou-se à digestão gástrica 0,4 mL de NaHCO_3 + 3 mL de fluido intestinal. Novamente, a solução foi agitada em um banho termostático por 2 h à 36 °C, com agitação constante. Em seguida, foi realizada a centrifugação destas soluções a uma velocidade de 3000 rpm, coletados os sobrenadantes a detecção Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES de acordo com as condições instrumentais apresentadas na Tabela 1.

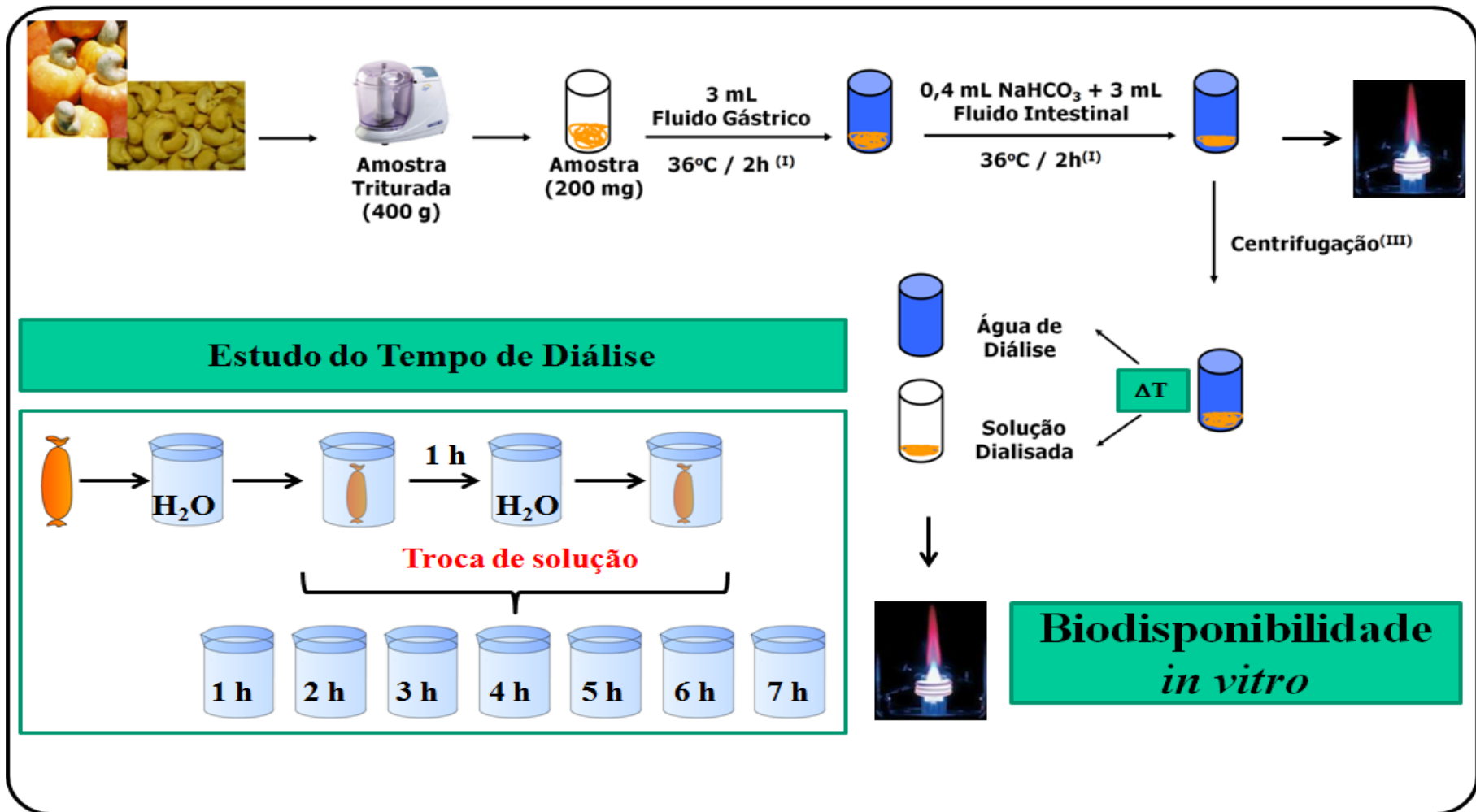


Figura 3: Esquema representativo do sistema empregado durante a digestão gastrointestinal (*in vitro*) e diálise das amostras de castanha de caju

Antes de realizar a etapa final de avaliação da bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn, a qual deve ser feita pela diálise das amostras de castanhas de caju após serem submetidas ao processo de digestão gastrointestinal, foi estudado o tempo ideal de diálise (Figura 3) que consistia na seguinte sequência experimental:

- a) Transferência de 2 mL de amostra digerida *in vitro* para o interior de uma membrana de estér de celulose com porosidade de 12 kDa e vedação de suas partes laterais com fita de polietileno;
- b) Introdução da membrana em um tubo de polietileno contendo 30 mL de água deionizada;
- c) Agitação deste sistema em uma mesa agitadora por um intervalo de tempo de 1 h;
- d) Retirada da membrana de diálise do interior do primeiro tubo de polietileno e transferência da mesma para um segundo tubo contendo 30 mL de água deionizada;
- e) Agitação da membrana + tubo contendo água deionizada por mais 1 h;
- f) Armazenagem das soluções dialisantes (águas de diálise);

Este procedimento foi realizado por 7 h consecutivas e obteve-se 7 pontos de coleta, os quais correspondem aos intervalos de tempo de 1 até 7 horas de diálise (Figura 3). Em seguida, as soluções de água de diálise foram analisadas por ICP OES para a avaliação da intensidade do sinal analítico para Ca, Cu, Fe, Mg e Zn empregando as condições instrumentais apresentadas na Tabela 1. Os dados obtidos a partir deste estudo foram utilizados para estabelecer o tempo de diálise das amostras de castanhas de caju submetidas ao processo de digestão *in vitro*.

Após a otimização do tempo ideal de diálise, foi realizada, novamente, o processo de digestão gastrointestinal das castanhas de caju e determinada a

concentração de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES nas amostras obtidas antes e após o processo de diálise (Figura 3).

3.6. Análise do extratos gastrointestinais simulados de castanha de caju por SEC-UV-ICP OES e SEC-UV-SIMAAS

Para investigar a correlação das espécies elementares e moleculares nos extratos gastrointestinais simulados de castanha de caju foi realizada a análise das soluções antes e posterior a etapa de diálise empregando o sistema SEC-UV-ICP OES para avaliação da distribuição das espécies moleculares associadas ao Ca, Cu, Fe, Mg e Zn e SEC-UV-SIMAAS para avaliação dos compostos moleculares associados ao Fe conforme esquema apresentado na Figura 4.

As condições instrumentais empregadas para análise por ICP OES estão apresentadas na Tabela 1 e para a operação do SIMAAS estão na Tabela 2.

Para otimizar o programa de aquecimento utilizado nas determinações de Fe por SIMAAS foi realizado um estudo do comportamento térmico do Fe através da avaliação de curvas de pirólise e de atomização na ausência e presença da amostra (fração coletada por SEC). O comportamento térmico dos analitos na ausência da amostra foram avaliados com solução analítica de referência contendo $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe. As curvas de pirólise para a determinação de Fe foram obtidas através da fixação da temperatura de atomização em $2500 \text{ }^\circ\text{C}$ e da variação da temperatura de pirólise de 200 à $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ com incrementos sucessivos de $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a obtenção da temperatura ótima de atomização, fixou-se a temperatura de pirólise em $800 \text{ }^\circ\text{C}$ e variou-se a de atomização de $2000 \text{ }^\circ\text{C}$ à $2400 \text{ }^\circ\text{C}$ com incrementos sucessivos de $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir deste estudo foi estabelecido o programa de aquecimento

(otimizado) empregado na determinação de Fe, o qual está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Programa de aquecimento utilizado nas determinações de Fe por SIMAAS a partir de diferentes frações coletadas por separação cromatográfica (SEC-UV)

Elemento	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)	Leitura
Fe	Secagem 1	110	1	30	250	Não
	Secagem 2	130	15	30	250	Não
	Pirólise	1200	10	20	250	Não
	Atomização	2300	0	5	0	Sim
	Limpeza	2500	1	3	250	Não

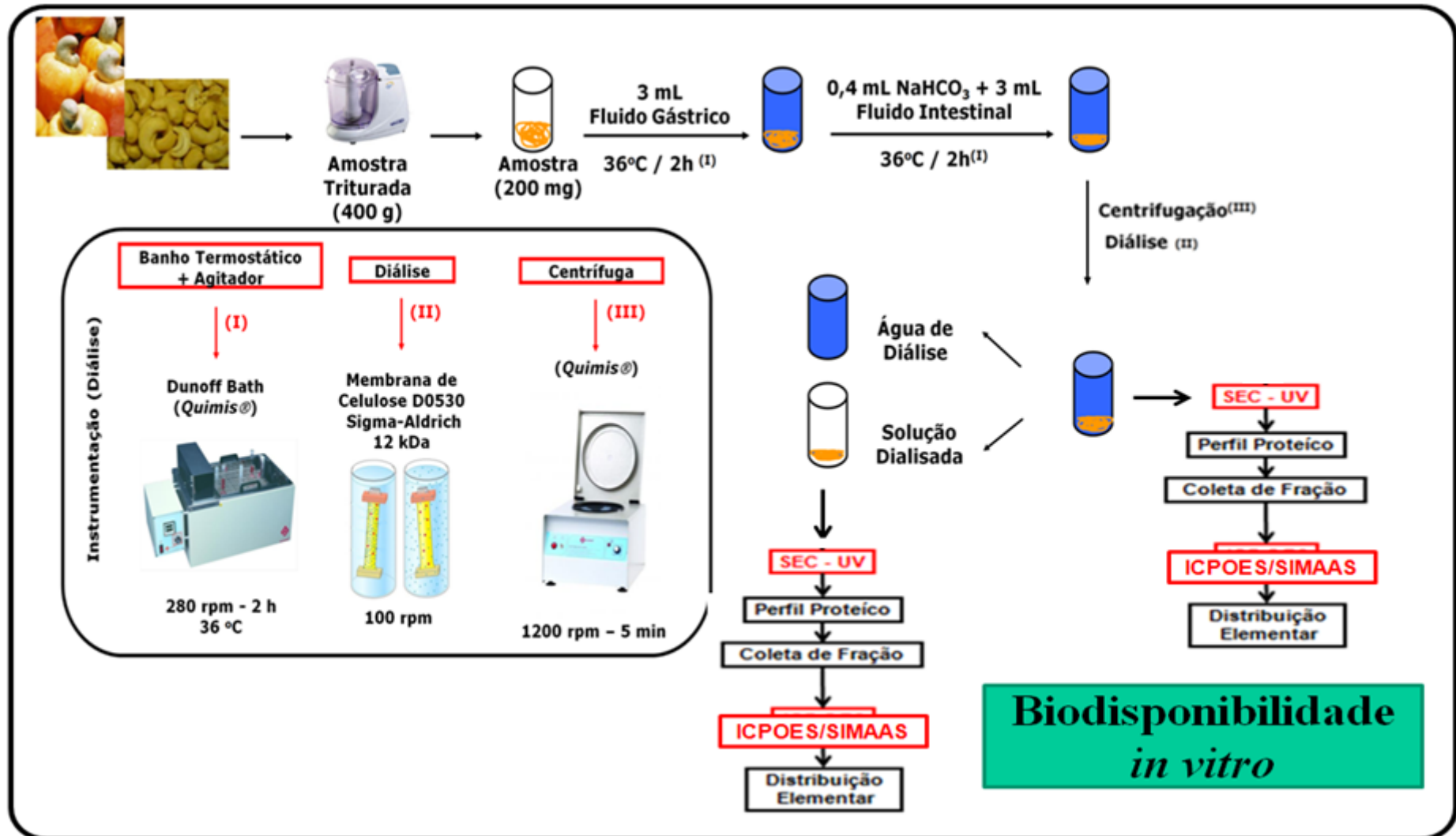


Figura 4: Esquema representativo do sistema empregado durante a digestão gastrointestinal (*in vitro*), diálise das amostras de castanha de caju e análise por SEC-UV-ICP OES e SEC-UV-SIMAAS

3.7. Análise de especiação de Fe empregando análise em fluxo

A partir dos resultados obtidos no processo de digestão gastrointestinal das amostras de castanhas de caju foi proposto um sistema em fluxo para realizar a análise de especiação de Fe na água de diálise. Esta avaliação foi obtida por um sistema de análise em fluxo com microbombas solenóides controlados por um microcomputador, conforme esquema apresentado na Figura 5.

As etapas do procedimento experimental adotadas estão descritas a seguir:

- a) Digestão gastrointestinal simulada da castanha de caju;
- b) Coleta e transferência de 2 mL da solução digerida para o interior da membrana de éster de celulose de porosidade igual a 12 kDa;
- c) Vedação das partes laterais da membrana com fita de polietileno;
- d) Introdução da membrana em um tubo de polietileno contendo 30 mL de água deionizada;
- e) Agitação deste sistema em uma mesa agitadora por um intervalo de tempo de 10 min;
- f) Retirada da membrana de diálise do interior do primeiro tubo de polietileno e transferência da mesma para um segundo tubo contendo 30 mL de água deionizada;
- g) Agitação da membrana + tubo contendo água deionizada por mais 10 min;
- h) Armazenagem das soluções dialisantes (águas de diálise);

O processo de coleta de soluções dialisantes foi realizado em um intervalo de tempo de 40 min, obtendo-se 4 pontos de coleta de amostra. Estas soluções foram analisadas empregando um método espectrofotométrico utilizando os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Pâmetros instrumentais para especificação de Fe por espectrofotometria

Amostra	9 pulsos
Ácido Ascórbico	1 pulso
1,10 Fenatrolina + Tampão Acetato	1 pulso
Ciclos de amostragem	4
Replicatas	3
Delay	0
Comprimento de onda (λ)	510 nm

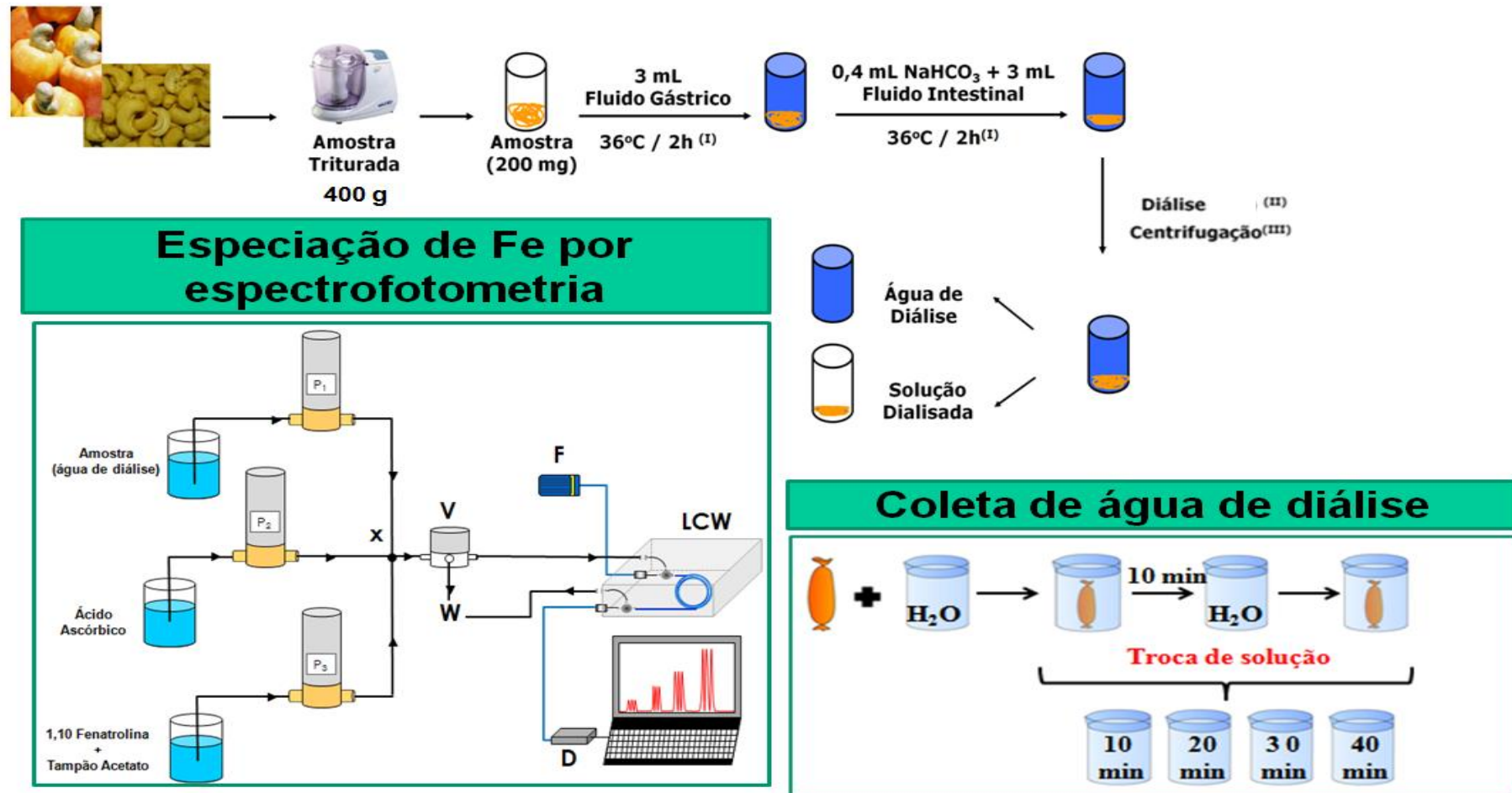


Figura 5: Esquema representativo do sistema empregado para especiação de Fe em água de diálise por espectrofotometria (P1 a P3 (Microbombas solenóides); V (Válvula Solenóide); LCW (Cela de fluxo com guia de ondas (100 cm)); W (Descarte); F (Fonte de radiação); D (Detector))

4. Resultados e discussões

4.1. Determinação da concentração total dos elementos de interesse

As concentrações totais de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn determinadas nas amostras de castanhas de caju (n=3) e no material de referência de Citrus Leaves (SRM 1572) por ICP OES estão apresentadas na Tabela 6. Nessa tabela foram inseridas também as concentrações desses elementos publicados na Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO). A análise do material de referência certificado (Citrus Leaves) revela que os resultados experimentais encontrados são concordantes com os recomendados em um intervalo de confiança de 95%, quando se utiliza o teste t pareado para comparação (Uriano, 1982). Estes resultados confirmam a boa exatidão do método, considerando desde o preparo da amostra até a determinação no ICP OES.

Um fator relevante é que o teor de carbono residual presente na amostra após o processo de digestão foi de 3%, revelando que a mistura contendo ácido diluído apresenta eficiente oxidação da matéria orgânica presente na amostra.

As determinações elementares também demonstram que as amostras de castanha possuem um elevado teor de Ca e Mg (macronutrientes) e concentrações menores de Cu, Fe e Zn (micronutrientes). Ao comparar as análises elementares com os resultados publicados na tabela TACO, verifica-se que as concentrações dos analitos não divergem dos dados apresentados na literatura.

Ao comparar as concentrações totais dos elementos Ca, Mg, Cu, Fe e Zn, presentes nas amostras de castanha de caju com os valores de referência para ingestão de nutrientes, obtidos a partir das “Dietary Reference Intakes (DRI)” e adotados pelos Estados Unidos e Canadá, estima-se que ao consumir cerca de 100

g de castanha haverá o fornecimento de 3% Ca, 67% Fe, 52% Mg e 36% de Zn necessários para a manutenção diária das nossas necessidades nutricionais. No caso do Cu, teoricamente, o valor diário seria superado em 112% ao consumir esta quantidade de castanha. Porém, o teor de nutrientes presentes em um alimento não revela a porcentagem desses que será absorvida por nosso organismo. Portanto, para se estimar a quantidade de um nutriente que será absorvido pelo organismo é necessário que se empreguem ensaios *in vitro* ou *in vivo* para se avaliar a biodisponibilidade destes analitos. Os dados referentes à determinação da concentração total de elementos presentes nas amostras de castanha de caju fornecem o ponto de partida para avaliações mais complexas e elaboradas do ponto de vista nutricional (Padovani, Amaya-Farfan *et al.*, 2006; Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Elements, 2010).

Tabela 6: Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de castanha de caju e no material de referência certificado (SRM 1572)

Amostra	Ca (% m/m)	Cu (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mg (% m/m)	Zn (mg kg ⁻¹)
Castanha de Caju (ICP OES)	0,031±0,001	19,1±0,1	53,5±0,2	0,22±0,01	40±3
Castanha de Caju (TACO)	0,03	19,2	52	0,24	47
SRM 1572 (ICP OES)	2,6±0,3	15,2±0,4	80,1±0,5	0,54±0,01	24±1
SRM 1572 (Teores Certificados)	3,1±0,1	16,5±1,0	90±10	0,58±0,03	29±2

4.2. Determinação da concentração total de proteínas em castanha de caju e nas soluções extratoras

Para a determinação da concentração total de proteínas multiplicou-se o teor de nitrogênio, encontrado pela análise elementar, por um fator que o converte em teor de proteína. Para se obter o fator de multiplicação deve-se considerar a composição de cada elemento, por exemplo, para leite e produtos lácteos este fator é de 6,38, para o trigo e seus derivados de 5,70, para gelatina de 5,50 e para ovos de 6,68 (Food energy - methods of analysis and conversion factors, 2002). Mas, quando o fator de multiplicação é desconhecido, utiliza-se 6,25, pois este considera que a maioria das proteínas é composta por 16% de nitrogênio ($100/16 = 6,25$). Sendo assim, a porcentagem de proteína foi estimada a partir da seguinte expressão:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogênio} \times 6,25$$

Considerando o exposto anteriormente e os resultados obtidos por meio da análise elementar (porcentagem de nitrogênio), foi possível estimar o teor de proteínas presentes na amostra com e sem a extração da fase lipídica (Tabela 6). A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, verifica-se que a extração da fase lipídica, a qual foi realizada com uma mistura de clorofórmio + metanol, não alterou o teor de proteína presente na amostra, o qual foi de 26% (m/m). Pois, em princípio, cogitou-se que esta extração poderia retirar parte das proteínas presentes na amostra.

Porém, os teores de proteínas encontrados na amostra de castanha de caju são maiores do que os reportados na Tabela TACO, o qual apresentou 18,5% (m/m) de proteínas para castanhas torradas e salgadas. Esta diferença pode ser atribuída ao processo de absorção do nitrogênio pelo cajueiro a partir do solo, o qual pode ocorrer em duas épocas com intensidades distintas no início de sua vida ou de forma contínua quando se tem uma planta com idade mais avançada (Oliveira, 1995). Isto acarreta em alterações no teor de nitrogênio nas castanhas de caju e, conseqüentemente, haverá uma mudança na concentração de proteínas quando se avalia este analito por meio do método de determinação de nitrogênio total.

Tabela 7: Estimativa do teor de proteínas presentes nas amostras de castanha de caju.

Extração de Lipídeos	% de Nitrogênio	Teor de Proteínas % (m/m)
Não	4,15	25,9
Sim	4,19	26,2

A eficiência do processo de extração e solubilização de proteínas com diferentes extratores, tais como: água, solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH e solução tampão Tris-HCl (pH=7,5) também foi avaliada e os resultados relativos às concentrações de proteínas, extraídas e determinadas pelo método de Bradford, estão apresentados na Figura 6.

A partir da Figura 6 verifica-se que a solução alcalina apresentou 10% (m/m) de proteínas solubilizadas, o extrato tamponado obteve uma eficiência de extração de 4% (m/m) e o de água foi de apenas 3% (m/m). Nota-se, também, que apesar da

castanha de caju apresentar 26% de proteínas, os procedimentos de extração adotados conseguem solubilizar 40% deste analito. A reduzida porcentagem de extração obtida (40%) pode ser atribuída a fatores como, por exemplo, o tamanho de partículas da amostra, o qual pode influenciar na ação dos reagentes sobre amostra (área superficial). A solubilidade também é outro fator importante, pois esta propriedade depende do número e do arranjo de cargas presentes na molécula de proteína que, por sua vez, dependerá da composição em aminoácidos. Portanto, para alterar a solubilidade de uma proteína pode-se recorrer à influência de vários fatores, tais como, pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura (Sgarbieri, 1996). De uma forma geral, as proteínas são bastantes solúveis em pHs baixos ou elevados devido ao excesso de cargas produz uma repulsão entre as moléculas, contribuindo para aumentar a solubilidade da proteína. Porém, quando se trabalha em pHs iguais ao ponto isoelétrico da proteína, a solubilidade deste composto se reduz devido à quantidade de cargas presentes na molécula serem iguais e as moléculas não se repelirem. Isto propicia a agregação e a consequente precipitação das proteínas presentes no meio (Wilson, Apiyo *et al.*, 2004).

Além disto, quando a concentração de nitrogênio total é convertida em proteína empregando o fator de 6,25, considera-se que todo nitrogênio da amostra está na forma proteica e não se leva em conta de que compostos nitrogenados não proteicos, tais como: nitrato, nitrito, nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos livres, pequenos peptídeos, quitina, entre outros, podem estar presentes. Esta desconsideração acarreta em teores de nitrogênio proteico maior que o esperado e, conseqüentemente, superestima a concentração de proteínas nos alimentos (Guimarães e Lanfer-Marquez, 2005).

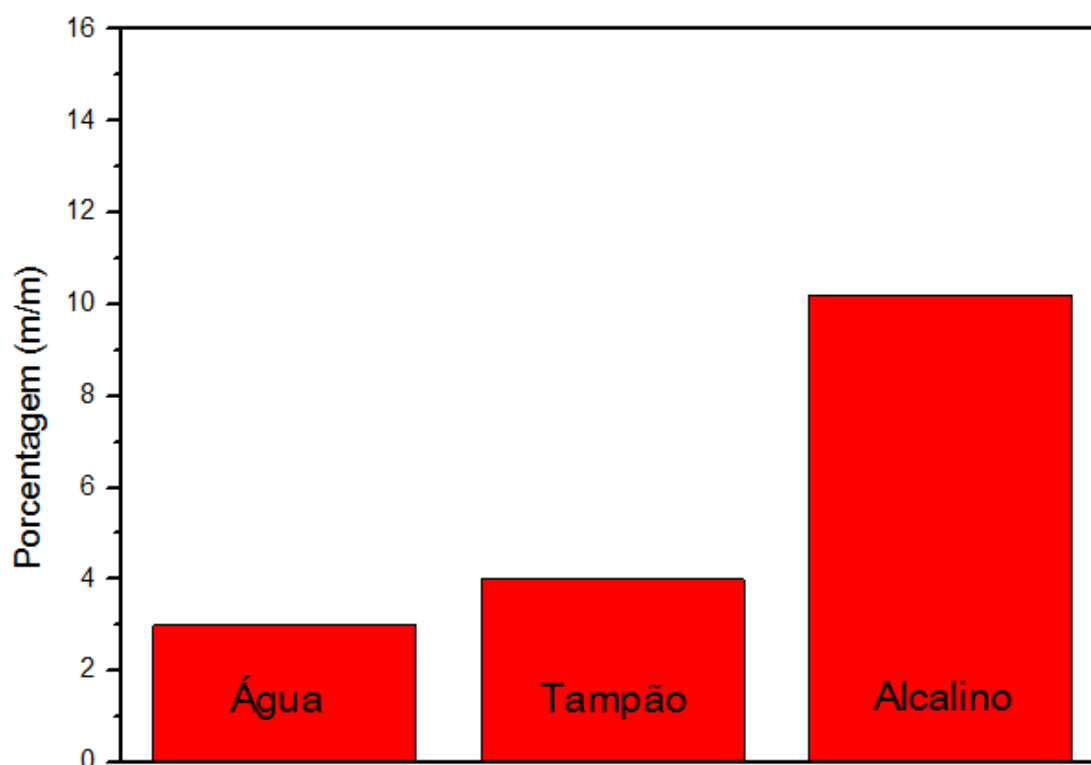


Figura 6: Extração de proteínas empregando diferentes meios extratores (água, tampão Tris-HCl, NaOH)

4.3. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nos extrato de água, tampão Tris-HCl e NaOH

Os estudos apresentados na Figura 6 avaliam a extração de quantidades totais de proteínas. Porém, se considerarmos que as proteínas podem apresentar espécies elementares associadas à sua estrutura, verifica-se que uma avaliação mais abrangente sobre os extratos é necessária para verificar prováveis correlações entre as espécies de interesse. Portanto, os extratos proteicos foram analisados por ICP OES visando a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn (Figura 7).

Os resultados mostraram que 87% do magnésio presente nas amostras de castanha foi extraído com água (Figura 7).

O cobre foi encontrado no extrato tamponado e alcalino e estas soluções apresentaram uma eficiência de extração de 92% e 81%, respectivamente. As determinações de cálcio e ferro revelaram que as extrações destes analitos em meio alcalino e tamponado foram de 50%, já o extrator água apresenta cerca de 28% de ferro. Em relação ao zinco, verifica-se que os extratos com água, tamponados e alcalinos não solubilizam quantidades elevadas deste analito, quando se compara com os demais elementos analisados. Porém, o extrato alcalino apresentou 42% de solubilização das espécies de zinco presentes na amostra.

Ao analisar os resultados obtidos a partir da determinação elementar e molecular (proteínas) presentes nos extratos de água, tamponados e alcalinos, verifica-se que diferentes espécies de interesse estão presentes nas soluções extratoras e isto pode significar que exista a possibilidade destes compostos (moleculares e elementares) estarem associados. Portanto, verifica-se que o uso de técnicas hifenadas, tais como o acoplamento entre SEC-UV-ICP OES pode fornecer respostas para este tipo de questionamento.

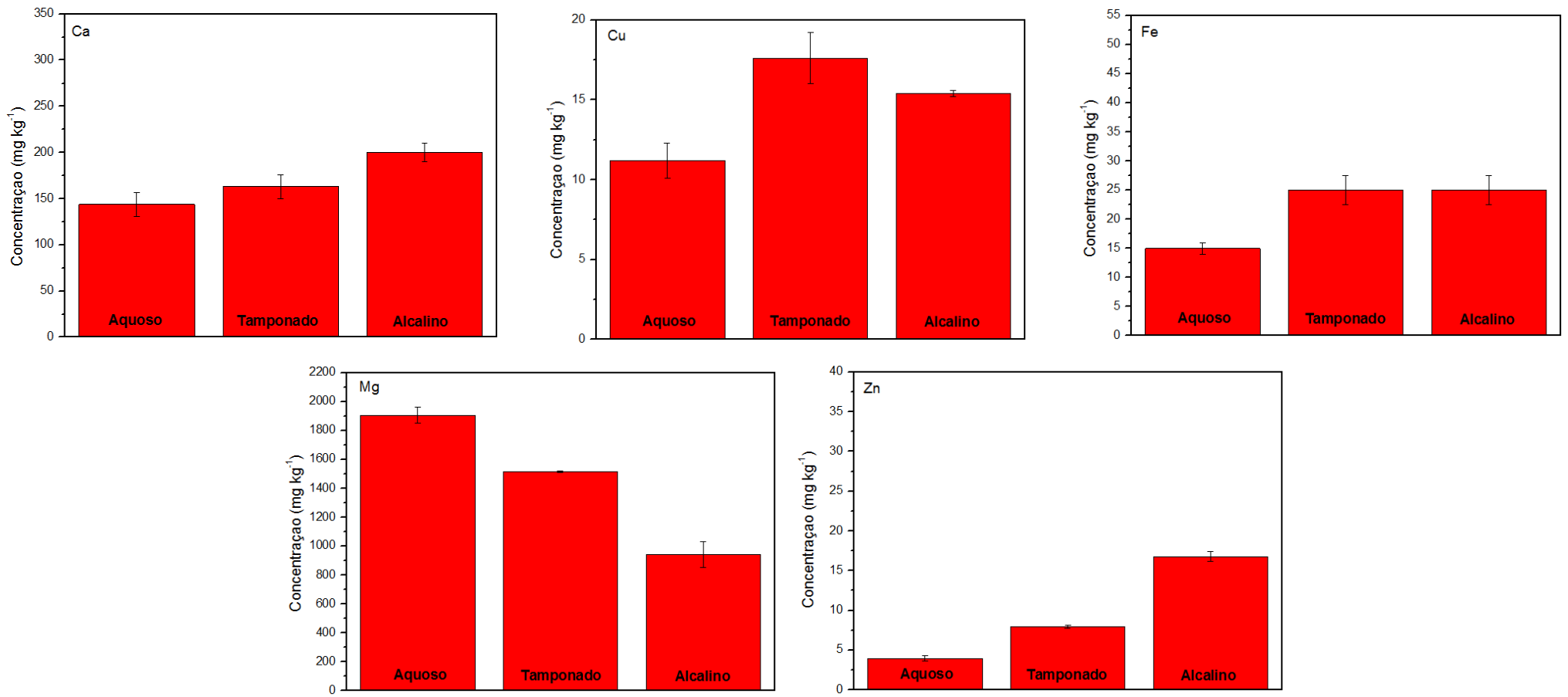


Figura 7: Determinação elementar cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco em soluções extratoras (aquosa, tamponada, alcalina) utilizadas no processo de solubilização de proteínas (eixo y refere-se ao teor máximo que poderia ser obtido para cada elemento)

4.4. Separação cromatográfica dos extratos proteicos

Os estudos realizados por SEC necessitam de uma etapa de calibração para que se possa calcular o peso molecular dos compostos eluídos durante o processo de separação cromatográfica. A calibração de um sistema SEC pode ser realizada através de padrões de proteínas de peso molecular conhecido, tais como: ovoalbumina (43 KDa), ribonuclease (13,7 KDa), aprotinina (6,5 KDa), conalbumina (75 KDa) e blue dextran (2000 KDa). Os resultados obtidos a partir do volume de eluição de cada composto são empregados nos cálculos do coeficiente de partição (K_{AV}) e, a partir destes valores, torna-se possível estabelecer uma correlação entre K_{AV} e o logaritmo dos pesos moleculares (P.M.) dos padrões de proteínas utilizados durante a etapa de calibração da coluna. Esta relação fornece uma faixa linear de trabalho, a qual possibilita a obtenção de uma equação da curva de calibração e, conseqüentemente, permite o cálculo do peso molecular dos compostos eluídos a partir do processo de separação por SEC.

Neste trabalho foi realizada a calibração da coluna empregando soluções analíticas de referência preparadas a partir dos compostos moleculares mencionados anteriormente e obteve-se a seguinte equação: $K_{AV} = 0,46564 - 0,22631x (\log P.M.)$ ($r^2 = 0,9937$). A partir desta equação foram calculados os pesos moleculares dos compostos eluídos em diferentes procedimentos de extração adotados a seguir.

4.4.1. Perfis cromatográficos antes e após precipitação

O uso de agentes precipitantes antes do processo de separação cromatográfica pode funcionar como uma etapa de limpeza (“clean up”) das soluções extratoras, reduzindo a quantidade de compostos interferentes após o processo de precipitação/ressuspensão do analito, melhorando-se a resolução dos compostos eluídos por cromatografia. Portanto, foi realizada a adição de HCl ou acetona às soluções extratoras (água, tampão e alcalina) para verificar a influência destes agentes precipitantes no processo de separação e purificação de proteínas. A comparação entre soluções extratoras submetidas ou não ao processo de precipitação foi realizada através da avaliação do perfil de distribuição molecular obtido por SEC-UV (Figura 8 e 9).

A análise destas soluções por SEC-UV antes do processo de precipitação (Figura 8) demonstrou que os perfis cromatográficos dos extratos apresentam compostos de alto e baixo peso molecular distribuídos entre a faixa de calibração da coluna, a qual foi de 75 a 6,5 kDa. Também foram identificados compostos em regiões acima do limite de exclusão (> 75 kDa) e abaixo da faixa de permeação total do gel (< 6,5 kDa).

O extrato água possui um perfil cromatográfico distribuído entre regiões maiores que 75 kDa e na faixa de 11,6 kDa e 6,5 kDa, mas, também foram identificados compostos em volumes de eluição compreendidos entre 15 e 30 mL, os quais correspondem a regiões abaixo de 6,5 kDa.

A separação cromatográfica obtida a partir da solução tamponada demonstrou que esta apresenta uma solubilização semelhante à ocorrida em meio de água.

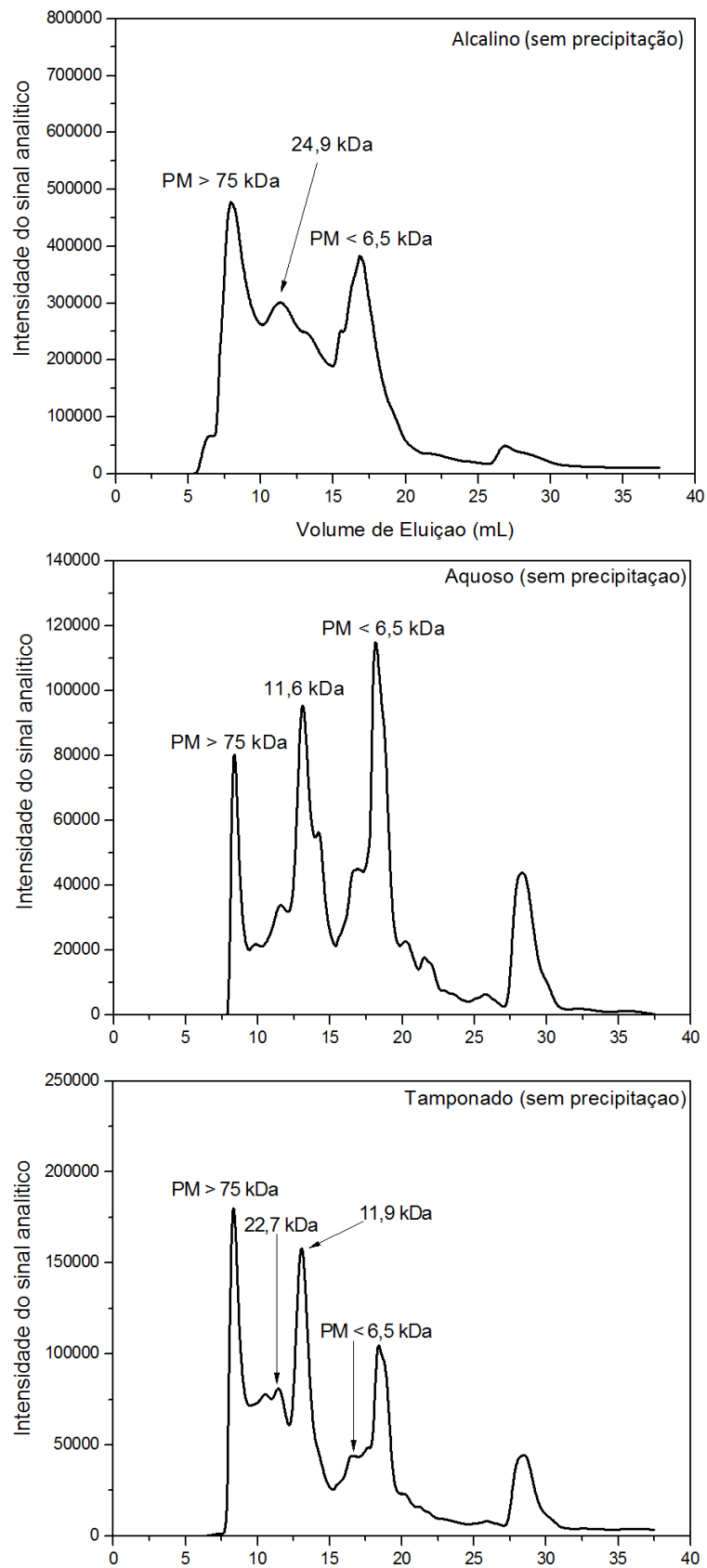


Figura 8: Perfis cromatográficos de soluções extratores empregadas no processo de solubilização de proteínas da castanha de caju

O perfil de distribuição molecular obtido a partir do extrato alcalino demonstra que quantidades significativas de compostos com peso molecular acima de 75 kDa são solubilizadas em maior quantidade quando comparadas com os demais picos presentes neste cromatograma. Fato semelhante foi notado no extrato tamponado, sendo que, em meio de água, tem-se uma solubilização maior de compostos de peso molecular abaixo de 6,5 kDa.

Os perfis de distribuição encontrados a partir do processo de extração e separação de proteínas foram avaliados, novamente, devido à introdução de uma etapa de precipitação com HCl empregando diferentes soluções extratoras (água, tampão Tris-HCl e NaOH) e realizando a ressuspensão das proteínas em tampão Tris-HCl (Figura 9). Os resultados indicam a presença de compostos de alto e de baixo peso molecular em regiões maiores que 75 kDa e menores que 8,6 kDa. Ao comparar estes resultados com o perfil cromatográfico obtido a partir da Figura 8, verifica-se que neste último tem-se a presença de compostos compreendidos entre 25 e 6,5 kDa. Após a precipitação com HCl (Figura 9) este pico é suprimido em relação aos demais.

O extrato em meio de água apresentou similaridades no que diz respeito a presença de compostos de alto e baixo peso molecular após o processo de precipitação (Figura 9). Porém, os compostos identificados em volume de eluição maiores que 25 mL, os quais apareciam no cromatograma da Figura 8, não foram observados após a adição de HCl (Figura 9).

A adição de HCl ao extrato tamponado (Figura 9) provocou uma alteração no perfil de distribuição dos compostos que estavam presentes antes da etapa de precipitação (Figura 8). Estas mudanças refletiram, principalmente, na intensidade do sinal analítico de compostos com peso molecular menor que 6,5 kDa.

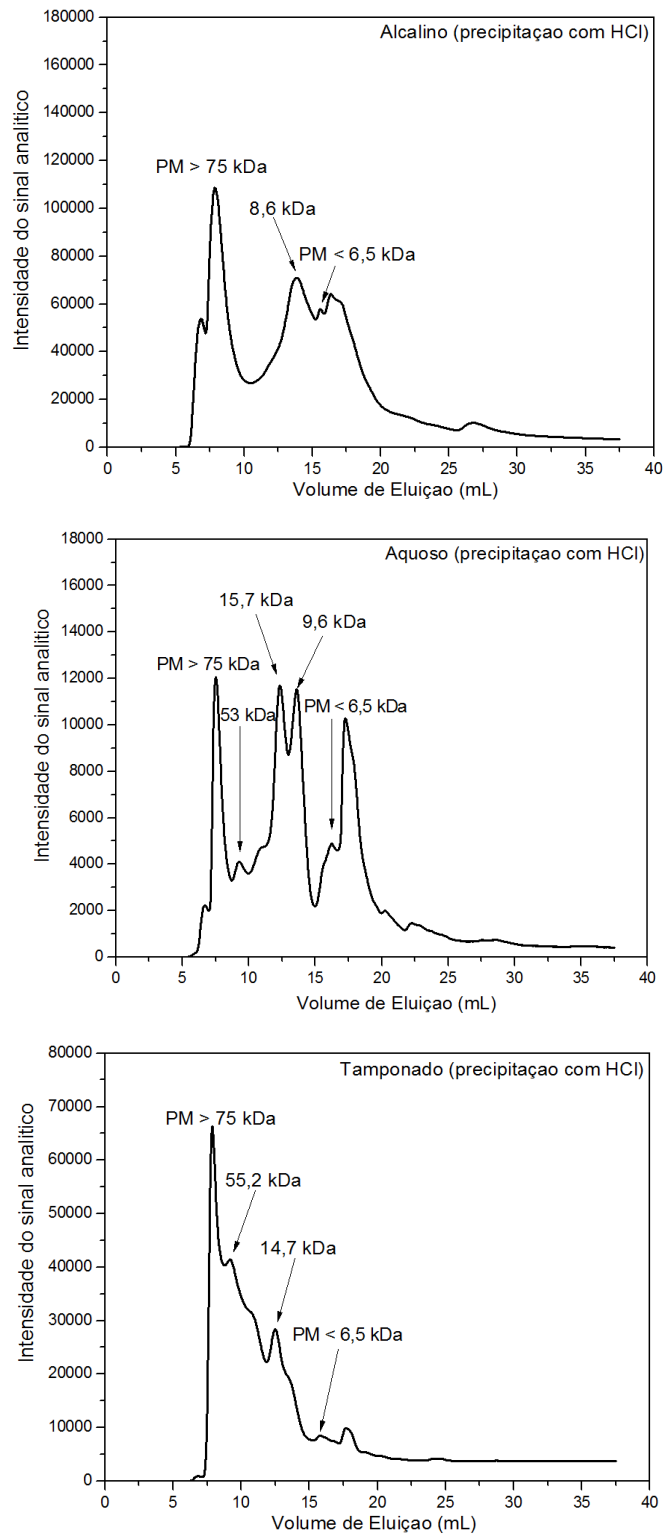


Figura 9: Perfis cromatográficos de soluções extratores após precipitação com HCl

Os resultados apresentados para o processo de precipitação com HCl podem ser explicados, em parte, através dos estudos realizados por Wuilloud e colaboradores, os quais avaliaram o emprego de soluções de HCl e NaOH no processo de extração de proteínas em diferentes amostras de castanhas (Wuilloud, Kannamkumarath *et al.*, 2004). Neste estudo a análise dos extratos proteicos revelou que compostos de baixo peso molecular apresentavam grande afinidade pela solução de HCl e a solução alcalina solubilizava compostos de alto e baixo peso molecular. Sendo assim, pode-se supor que ao introduzir uma etapa de precipitação com HCl, os compostos de baixo peso molecular podem se tornar solúveis neste meio. E, conseqüentemente, este fator acarretaria em uma diminuição no teor destes compostos presentes em cada solução extratora, conforme resultados apresentados nas Figuras 8 e 9.

A adição de acetona, como agente precipitante, também foi empregada devido ao fato de alguns compostos orgânicos serem miscíveis em extratos aquosos contendo proteínas, os quais propiciam a diminuição na atividade da água presente neste meio, reduzindo o poder de solvatação sobre as proteínas, à medida que a concentração do composto orgânico aumenta. A adição de acetona acarreta em uma redução na constante dielétrica do solvente e, conseqüentemente, tem-se a diminuição da solubilidade das proteínas devido à redução da força de atração entre as moléculas, ocasionando a precipitação das mesmas (Scopes, 1994; Sgarbieri, 1996).

Considerando estas informações, foram realizadas avaliações empregando acetona como agente precipitante de proteínas nos extratos de água, tampão Tris-HCl e de NaOH (Figura 10).

A análise do perfil de distribuição molecular dos extratos após a precipitação com acetona demonstrou que compostos de baixo peso molecular menores que 6,5 kDa apresentam intensidade elevada em relação aos compostos de peso molecular elevados (> 75 kDa) (Figura 10). Ou seja, a precipitação dos extratos empregando acetona demonstra uma tendência de seleção de compostos diferente da encontrada para as soluções precipitadas com HCl. Pois, este último resultou em uma seleção de compostos de peso molecular maior que a faixa de calibração da coluna (> 75 kDa).

Portanto, os estudos realizados demonstram a possibilidade de selecionar diferentes compostos moleculares presentes em extratos proteicos utilizando HCl e acetona como agentes precipitantes.

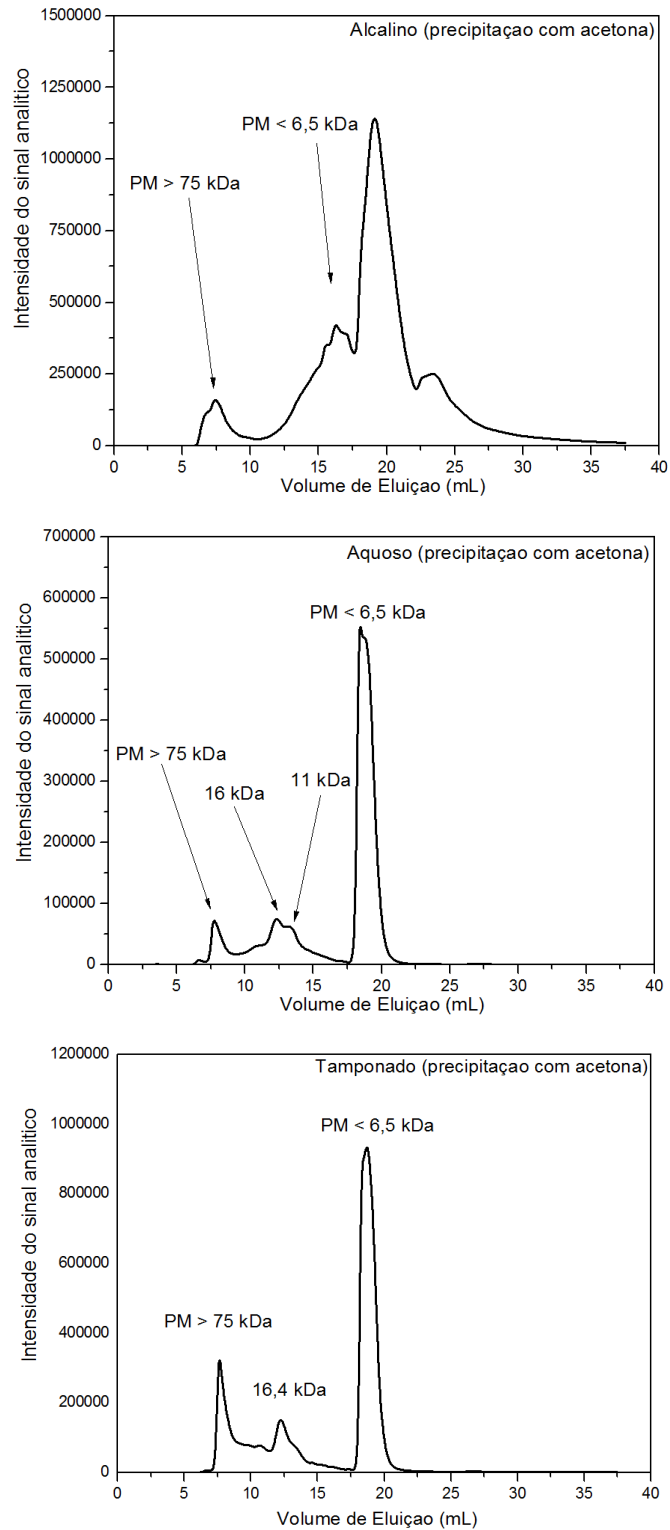


Figura 10: Perfis cromatográficos de soluções extratores com precipitação em meio de acetona obtidas a partir do processo de solubilização de proteínas da castanha de caju

4.4.2. Perfis cromatográficos e elementares (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn)

As informações sobre a análise de especiação podem ser obtidas, em certos casos, quando duas técnicas instrumentais são acopladas. Caso haja o interesse em avaliar uma biomolécula associada a um metal, por exemplo, seleciona-se uma técnica que apresente alta capacidade de separação e outra de determinação elementar dos compostos de interesse, permitindo a determinação simultânea de espécies específicas numa amostra (Gervasio, Lavorante *et al.*, 2003).

O acoplamento entre uma técnica de separação e determinação elementar pode ser realizado de modo “*on line*” ou “*off line*”. O acoplamento “*on line*” possibilita a análise simultânea do processo de separação de um analito e sua determinação elementar, devido à interface (conexão) entre os equipamentos ser feita de modo direto. Estes fatores combinados possibilitam resultados reprodutivos com menor risco de contaminação ou perdas do analito em um curto período de tempo. Porém, caso as condições de separação utilizadas durante a análise de especiação apresentarem problemas como a compatibilidade de fluxo e a composição da fase móvel com aquelas exigidas pelo detector elementar, torna-se necessário utilizar o acoplamento “*off line*”. Este tipo de acoplamento pode ser realizado através de técnicas de atomização discreta e altamente sensíveis como a GF AAS e ETV-ICP-MS (Moreira e Moreira, 2004).

O acoplamento “*off line*” também é indicado quando há incompatibilidade de leitura entre os programas de operação instalados nos equipamentos que tornam possível a análise de especiação. Sendo assim, é possível realizar, por exemplo, a coleta de frações através de um amostrador automático localizado após o detector

do cromatógrafo e analisar estas soluções, de forma discreta, por técnicas de determinação elementar.

Neste trabalho foi desenvolvido um acoplamento entre a cromatografia de exclusão por tamanho e a espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado com o intuito de avaliar a correlação entre espécies moleculares (proteínas) e elementares (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn) presentes nos extratos de castanha de caju.

Durante a separação cromatográfica foram obtidos os perfis registrados a partir da absorção das espécies moleculares eluídas da coluna cromatográfica e medidas em $\lambda = 285$ nm. O analito proveniente do processo de separação e detectado por espectrofotometria foi coletado em diferentes tubos de ensaio e cada solução foi individualmente analisada por ICP OES. Os resultados obtidos a partir destas duas técnicas instrumentais de análise (cromatografia e espectroscopia de emissão) foram digitados em uma planilha localizada em um sistema gráfico (Origin Pro 8.0), o qual apresenta recursos que possibilitam a sobreposição e análise das diferentes informações instrumentais (obtidas separadamente) em um mesmo gráfico (Figura 11).

Os gráficos apresentados na Figura 11 foram obtidos por meio da análise de diferentes extratos proteicos da castanha de caju empregando o acoplamento “*off line*” SEC-UV-ICP OES. A análise do extrato alcalino (sem precipitação) demonstrou que apesar do cálcio e magnésio estarem presentes nesta solução, não há correlação entre estes elementos e as espécies moleculares extraídas no meio em questão (Figura 11). Porém, existe uma correlação entre as espécies elementares de cobre, ferro e zinco com os compostos moleculares separados por cromatografia.

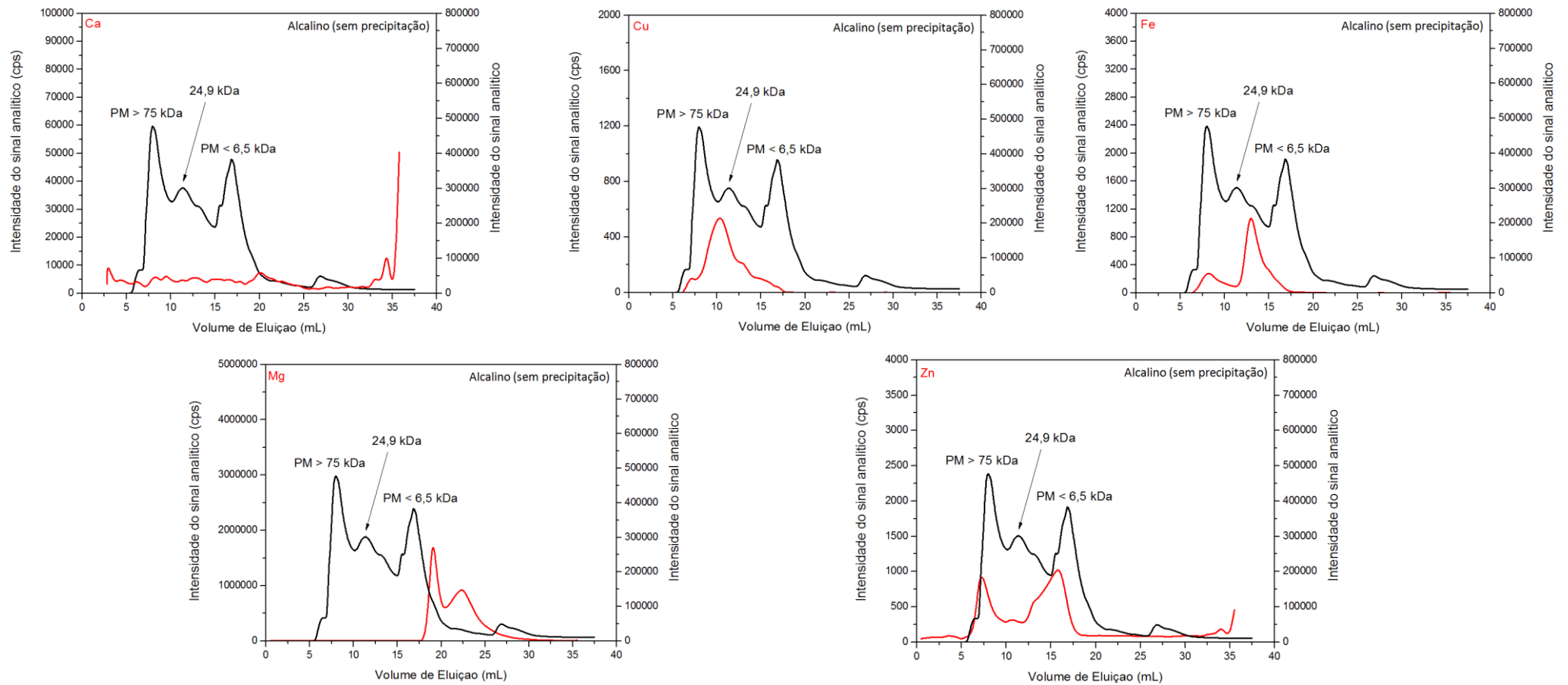


Figura 11: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

Cobre e ferro foram identificados em regiões de médio e baixo peso molecular (~ 25 kDa e < 24 kDa, respectivamente). Mas, há uma correlação entre espécies elementares de ferro que podem estar associadas a compostos moleculares de alto peso molecular (> 75 kDa) presentes no extrato alcalino. As espécies de magnésio apareceram em regiões abaixo de 6,5 kDa, porém, não havia uma correlação entre este elemento e espécies moleculares, o que pode ser um indício de que o magnésio esteja na forma livre e não associado a proteínas.

A determinação de zinco no extrato alcalino demonstra que esta espécie pode estar associada a compostos de alto (> 40 kDa) e de baixo peso molecular (> 14 kDa).

A análise elementar do extrato em água (Figura 12) sugere um perfil de distribuição diferente daquele obtido em meio alcalino para as espécies de cálcio, cobre, magnésio e zinco, pois estes elementos foram encontrados em diferentes regiões de distribuição de peso molecular.

O comportamento do cálcio no extrato em água revelou uma provável correlação deste elemento com espécies de alto à baixo peso molecular. Foram identificadas espécies de cálcio não associadas aos compostos moleculares de interesse, ou seja, em regiões de distribuição acima de 75 kDa e abaixo de 6,5 kDa. Estes resultados demonstram que no extrato aquoso o elemento pode ser encontrado na forma livre ou associado a compostos proteicos de peso molecular variado.

As espécies de cobre extraídas em meio aquoso foram identificadas em regiões de baixo peso molecular (< 15 kDa), o que representa um certo deslocamento do perfil elementar do cobre em relação ao obtido em meio alcalino (Figura 11). Neste último, o perfil elementar demonstrou que cobre poderia estar

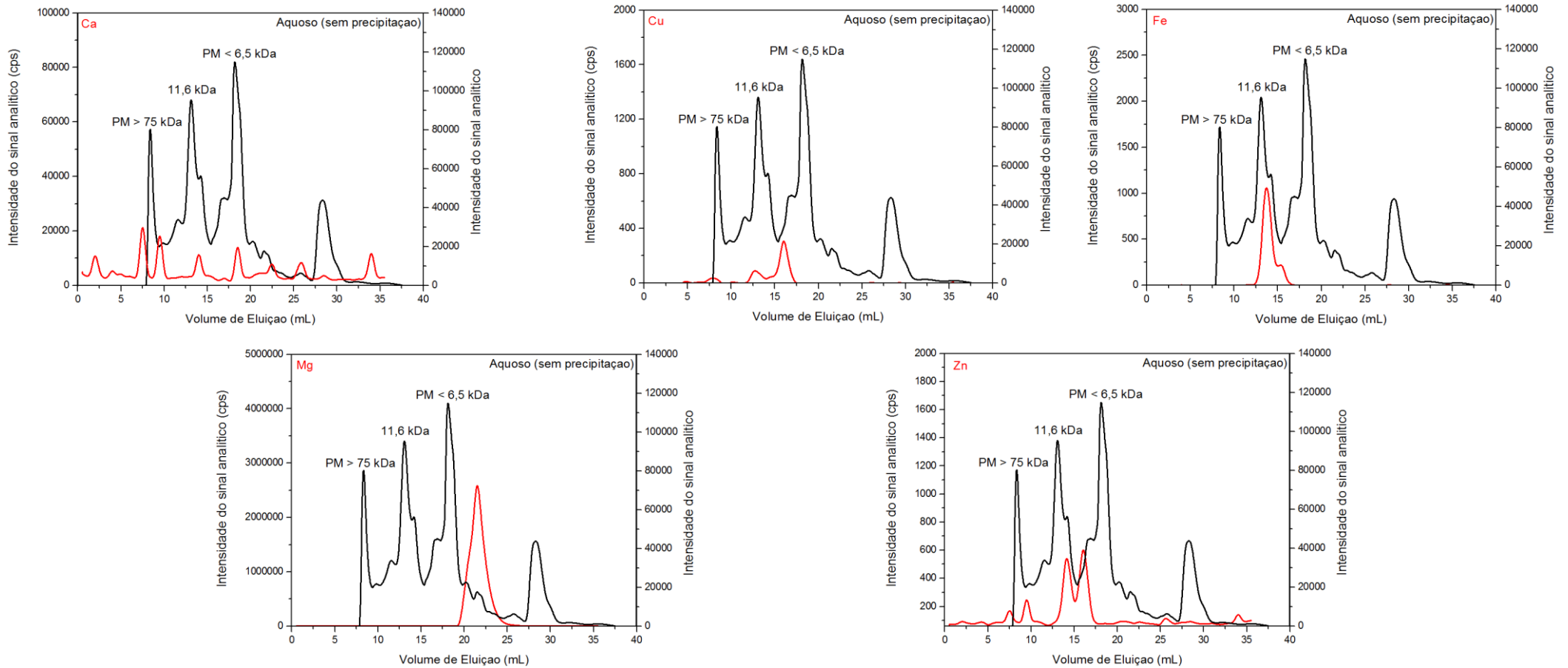


Figura 12: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

associado a uma faixa de distribuição onde estão compostos de médio peso molecular.

O monitoramento do perfil de distribuição elementar do ferro em solução aquosa revela a provável correlação entre este elemento e espécies de baixo peso molecular (~ 12 kDa). Em regiões acima ou abaixo de 12 kDa não foi possível identificar espécies de ferro no meio em questão. A distribuição elementar encontrada se assemelha à obtida em meio alcalino (Figura 11), porém, a solução contendo hidróxido de sódio possibilitou a correlação entre ferro e espécies de peso molecular maiores que 75 kDa, o que não foi observado em meio aquoso (Figura 12).

Assim como ocorreu em meio alcalino (Figura 11), não houve uma correlação entre espécies de magnésio e compostos moleculares solubilizados em solução aquosa. Demonstra-se, assim, que esta espécie elementar pode estar na forma livre durante o processo de separação cromatográfica. Porém, o zinco apresentou correlação com compostos moleculares compreendidos na faixa de 15 a 6,5 kDa.

A análise do extrato tamponado também demonstra que o cálcio não apresenta correlação com os compostos moleculares solubilizados neste meio, sendo determinado isoladamente em volumes de eluição compreendidos entre 25 e 32 mL (Figura 13).

O cobre e ferro presentes no extrato tamponado podem estar associados a compostos moleculares compreendidos em regiões entre 22 e 6,5 kDa. Nota-se, também, que os perfis elementares apresentados para este extrator (Figura 13) revelam uma distribuição destes analitos semelhante à apresentada no extrato em água (Figura 12). Verifica-se que o processo de extração nestes diferentes meios

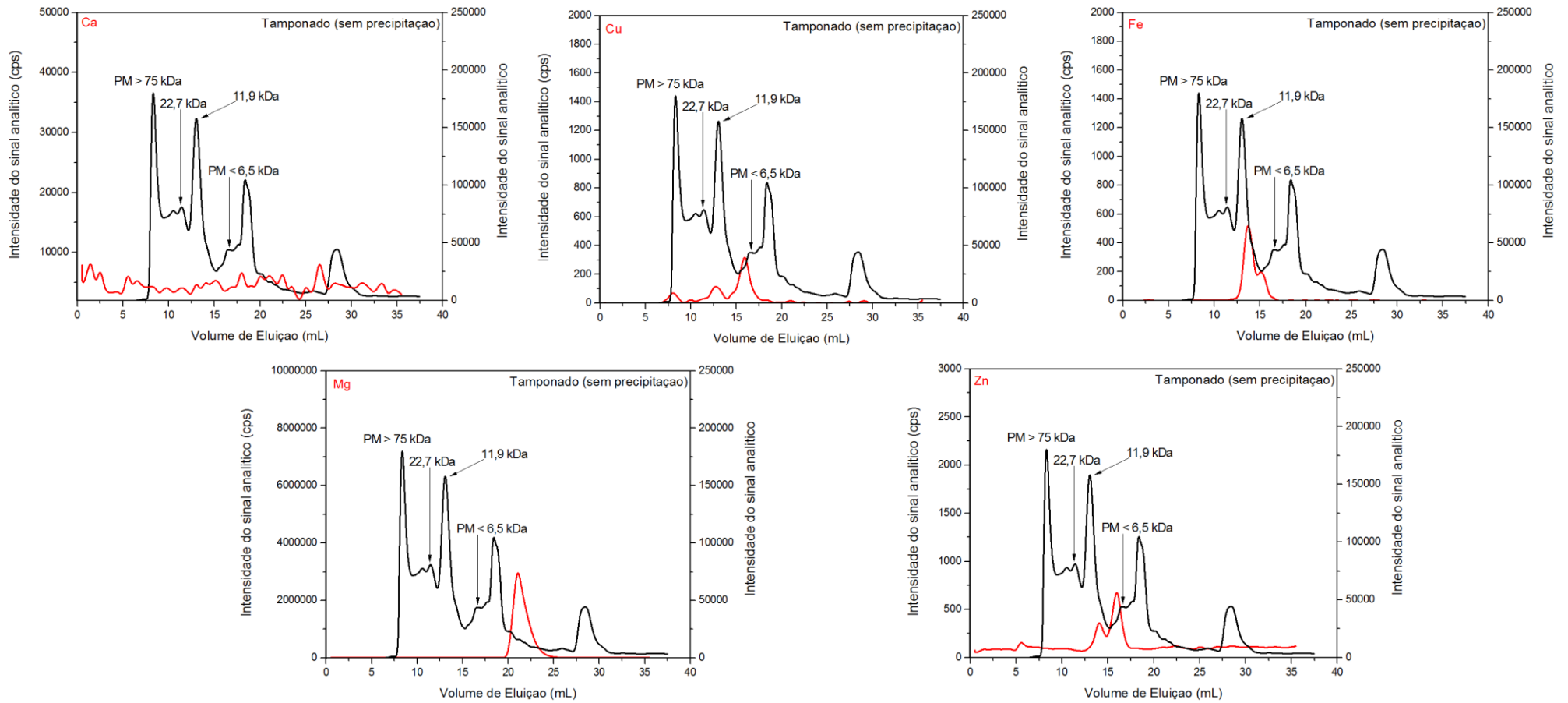


Figura 13: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

possibilita a manutenção da interação entre as espécies moleculares e elementares de cobre e ferro.

Apesar de o zinco ter sido identificado no extrato tamponado em faixas de distribuição molecular compreendidas entre 12 e 6,5 kDa, não foi possível estabelecer uma correlação entre este elemento e as espécies moleculares eluídas a partir do sistema cromatográfico.

O magnésio foi determinado entre volumes de eluição compreendidos entre 20 e 25 mL e não apresentou correlação com as espécies moleculares de interesse.

4.4.3. Perfis cromatográficos e elementares (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn) após a precipitação

Os estudos relativos ao processo de precipitação com HCl foram avaliados por meio do sistema SEC-UV-ICP OES e os resultados estão apresentados na Figura 14. A partir destes dados verifica-se que a correlação entre espécies elementares e moleculares se deu em regiões abaixo de 40 kDa ($V_e \sim 10$ mL).

As espécies de cálcio solubilizadas neste meio apresentaram um perfil de distribuição complexo e irregular, dificultando a sobreposição dos dados e interpretação dos mesmos.

O cobre foi identificado em regiões abaixo de 15 kDa, sendo associado a compostos moleculares de dimensões reduzidas, assim como ocorreu nos extratos aquoso e tamponado sem precipitação (Figuras 12 e 13).

O ferro apresentou um perfil de distribuição correlacionado com compostos moleculares entre 15 e 8,6 kDa, sendo que, a análise do extrato alcalino antes e

após o processo de precipitação com HCl (Figuras 11 e 14) ressaltam a hipótese de que há uma forte interação entre os analitos presentes nestes meios.

O perfil elementar do magnésio demonstra uma distribuição em regiões de baixo peso molecular, não havendo correlação com outras espécies de interesse. Sendo assim, o monitoramento deste elemento possibilita o levantamento da hipótese de que, após o processo de precipitação, este elemento pode estar associado a compostos que não absorvem no comprimento de onda de interesse. E, por isto, a correlação entre esta espécie e compostos moleculares não pode ser avaliada.

O zinco apresentou reduzida intensidade do sinal analítico durante a análise das frações cromatográficas provenientes do extrato alcalino com precipitação com HCl, o perfil de distribuição elementar foi encontrado em regiões maiores que 40 kDa ($V_e > 10$ mL) e menores que 15 kDa ($V_e < 12,5$ mL). Não foram determinadas quantidades de zinco em frações de compostos de peso molecular menores que 6,5 kDa.

Embora a precipitação em meio ácido tenha alterado o perfil de distribuição proteico, este estudo demonstrou que o perfil elementar do cobre, ferro, magnésio e zinco são semelhantes aos obtidos no extrato alcalino sem precipitação (Figura 11), ou seja, a precipitação com HCl não afeta o perfil de distribuição elementar observado antes e pós precipitação.

O perfil de distribuição elementar do ferro foi análogo ao observado para o extrato aquoso (Figura 12), tamponado (Figura 13) e alcalino (Figura 14). Nestes extratos há uma correlação entre espécies de baixo peso molecular (entre 20 e 6,5 kDa) e o perfil elementar do ferro.

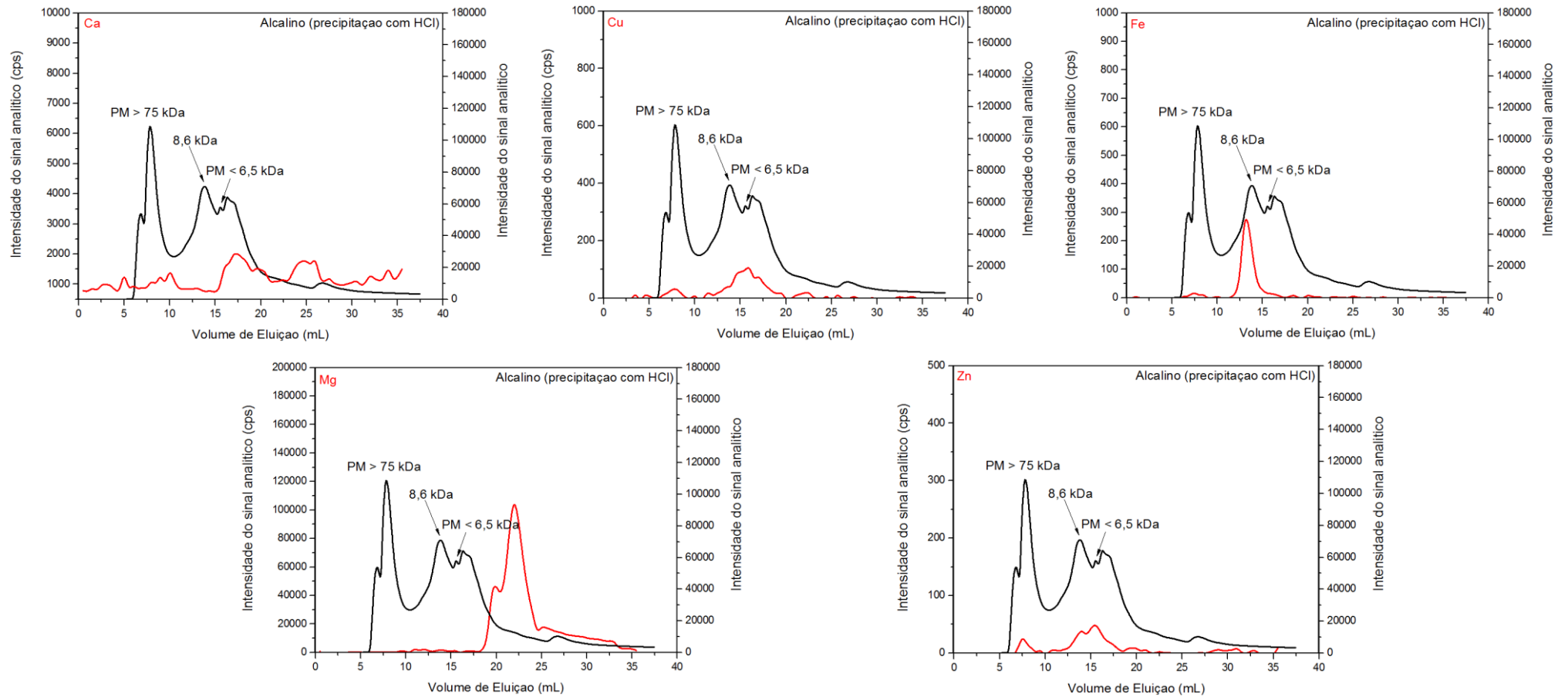


Figura 14: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

A precipitação ácida realizada em meio ao extrato aquoso apresentou uma sobreposição entre 16 e 9 kDa (Figura 15).

A determinação de magnésio demonstrou que não houve correlação deste com as espécies moleculares eluídas a partir do processo de separação cromatográfica (Figura 15). Este resultado apresenta características semelhantes aos obtidos através da análise do perfil de distribuição do magnésio apresentado na Figura 14 e para o extrato tamponado com precipitação em meio ácido (Figura 16). Neste último, as correlações entre espécies moleculares e elementares (Cu e Mg) foram completamente desfeitas quando comparadas às obtidas em meio ao extrato sem precipitação (Figura 12).

O perfil do cálcio apresentou uma distribuição irregular em meio tamponado com e sem precipitação ácida (Figura 12 e 16), demonstrando que não havia uma interação efetiva entre as espécies analisadas.

O monitoramento do zinco no extrato tamponado (Figura 16) não foi possível devido ao fato de que a intensidade do sinal analítico obtido por ICP OES ser baixo e não possibilitava a obtenção de dados que permitissem uma avaliação confiável das frações cromatográficas. Conclui-se que as interações observadas entre esta espécie elementar e compostos moleculares presentes no extrato tamponado sem precipitação (Figura 12) podem ter sido desfeitas durante a etapa de precipitação com ácido clorídrico.

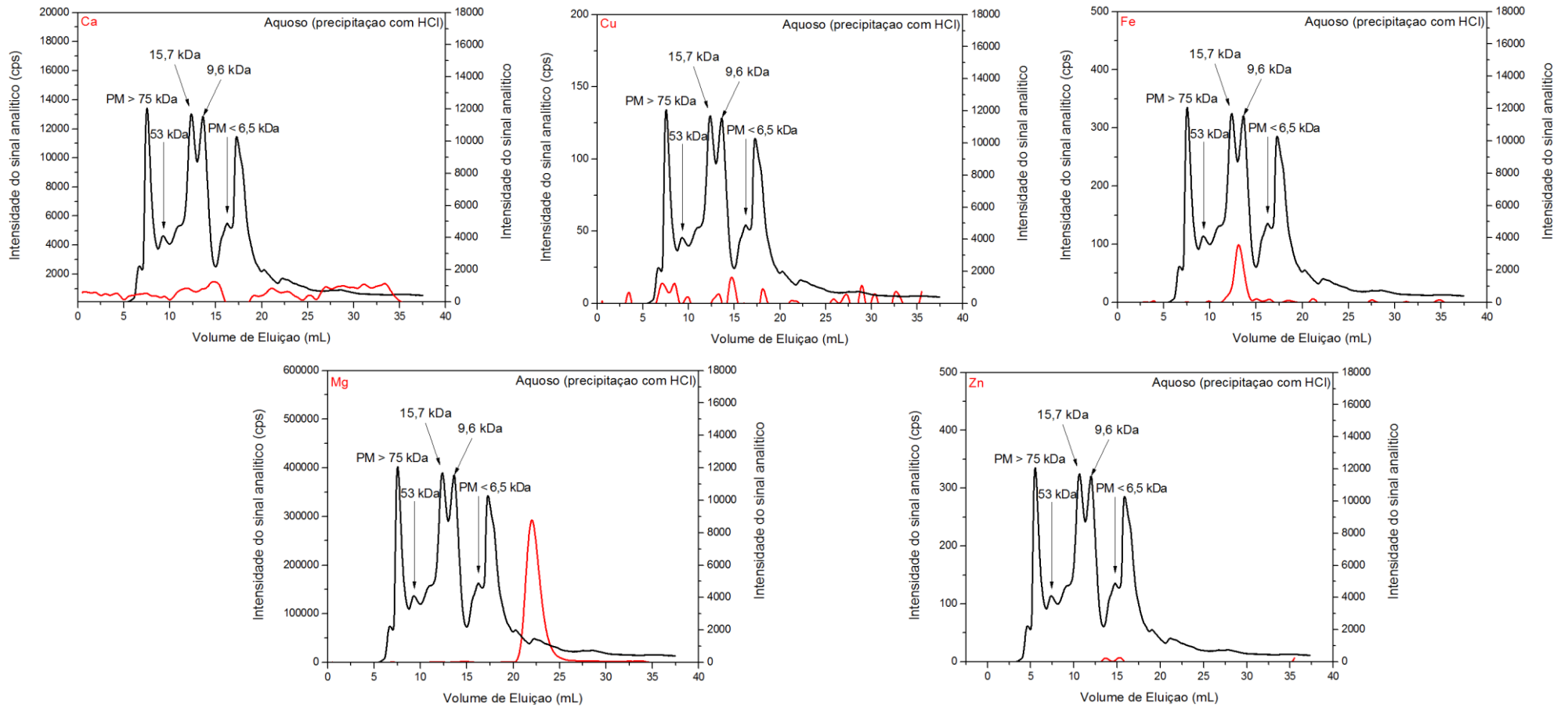


Figura 15: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

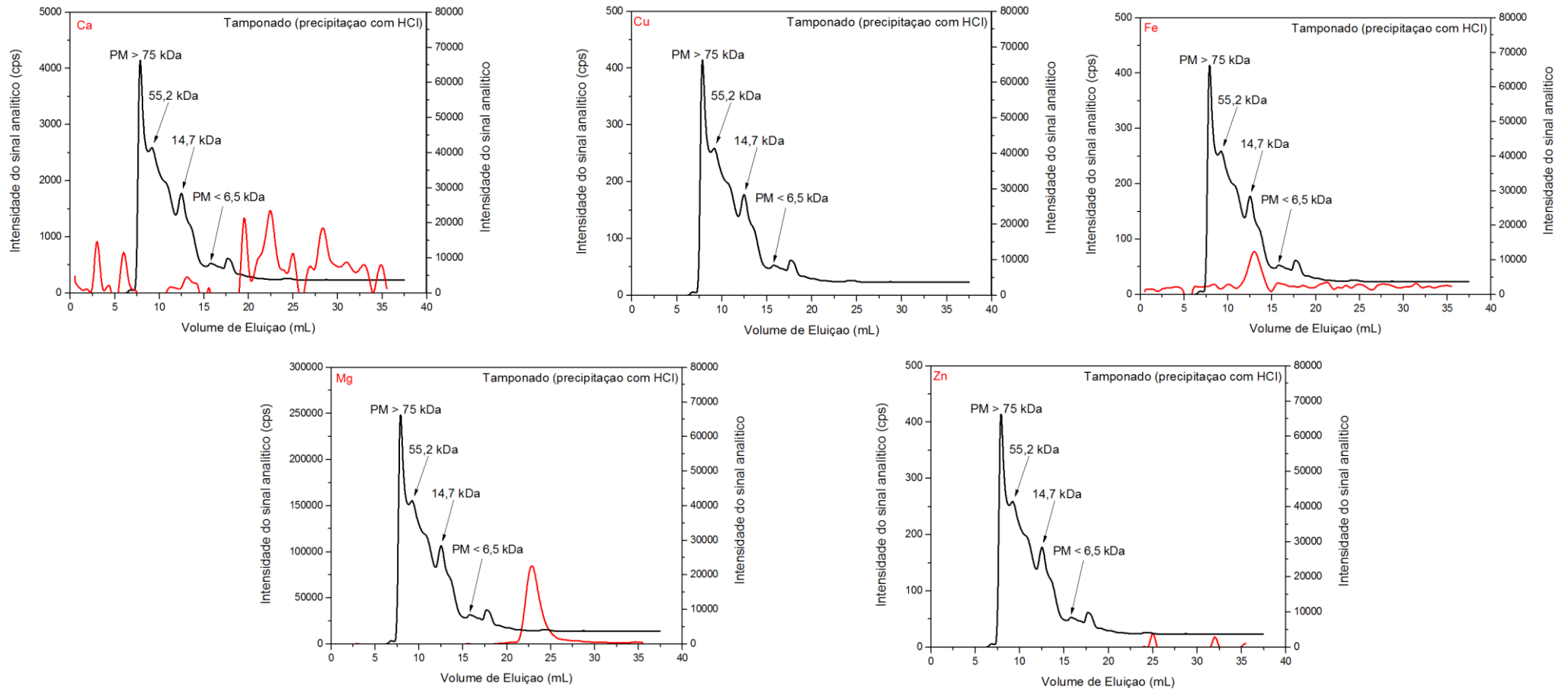


Figura 16: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju + precipitação com HCl (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

Os resultados obtidos a partir da sobreposição entre os perfis elementares e moleculares presentes no extrato alcalino após o processo de precipitação com acetona (Figura 17) demonstram que o perfil de distribuição obtido por SEC-UV apresenta compostos de alto e baixo peso molecular. Porém, a intensidade do sinal analítico para os compostos abaixo de 6,5 kDa foi maior que a obtida para compostos acima de 75 kDa.

Em relação ao perfil elementar, nota-se que não há correlação entre espécies moleculares e elementares de cálcio durante todo o processo de separação (Figura 17). Observa-se uma distribuição irregular deste elemento em todas as frações analisadas, o que revela um comportamento comparável ao obtido para o mesmo extrato sem a etapa de precipitação (Figura 11).

A distribuição do cobre no extrato alcalino indica que este está associado a compostos de baixo peso molecular, pois foi possível estabelecer a correlação entre este elemento e os compostos eluídos a partir de 14 kDa. Este perfil elementar apresenta um deslocamento em relação ao obtido na Figura 11, o qual foi analisado anteriormente à etapa de precipitação. Neste último, as espécies de cobre monitoradas estavam associadas a compostos de peso molecular elevado.

A determinação de ferro demonstra uma correlação entre este elemento e compostos moleculares maiores que 75 kDa (Figura 17). Nota-se, também, que há sobreposição dos perfis elementares e moleculares em volumes de eluição compreendidos entre 17,5 e 22,5 mL. Ou seja, o ferro presente neste extrato pode estar associado a compostos de peso molecular abaixo de 6,5 kDa.

O magnésio presente no extrato alcalino precipitado com acetona apresentou um perfil de distribuição onde havia a correlação deste elemento e espécies de peso molecular abaixo de 6,5 kDa (Figura 17). Fato semelhante ocorreu com o zinco, pois

o perfil elementar demonstrou uma associação desta espécie com compostos detectados a partir de 15 mL ($PM < 6,5$ kDa).

Considerando os resultados apresentados anteriormente, verifica-se que a análise de compostos moleculares e elementares presentes no extrato alcalino, utilizando acetona como agente precipitante, demonstrou uma correlação maior entre as espécies eluídas em regiões de baixo peso molecular do que a precipitação com HCl.

O extrato de água após passar pela etapa de precipitação com acetona (Figura 18) modificou o perfil de distribuição elementar (cálcio, cobre e zinco) em relação ao obtido sem precipitação (Figura 13). Após a precipitação com acetona foi encontrado cálcio em volumes de eluição menores que 5 mL, o qual corresponde a regiões de peso molecular maiores que 75 kDa. Porém, este elemento não estava associado a compostos moleculares.

O cobre apresentou comportamento similar ao cálcio em volumes de eluição menores que 5 mL, pois o perfil elementar encontrado não estava associado aos compostos moleculares de interesse. Mas, a interação entre cobre e compostos de peso molecular maiores que 75 kDa foi observada durante a separação do extrato aquoso com precipitação com acetona (Figura 18).

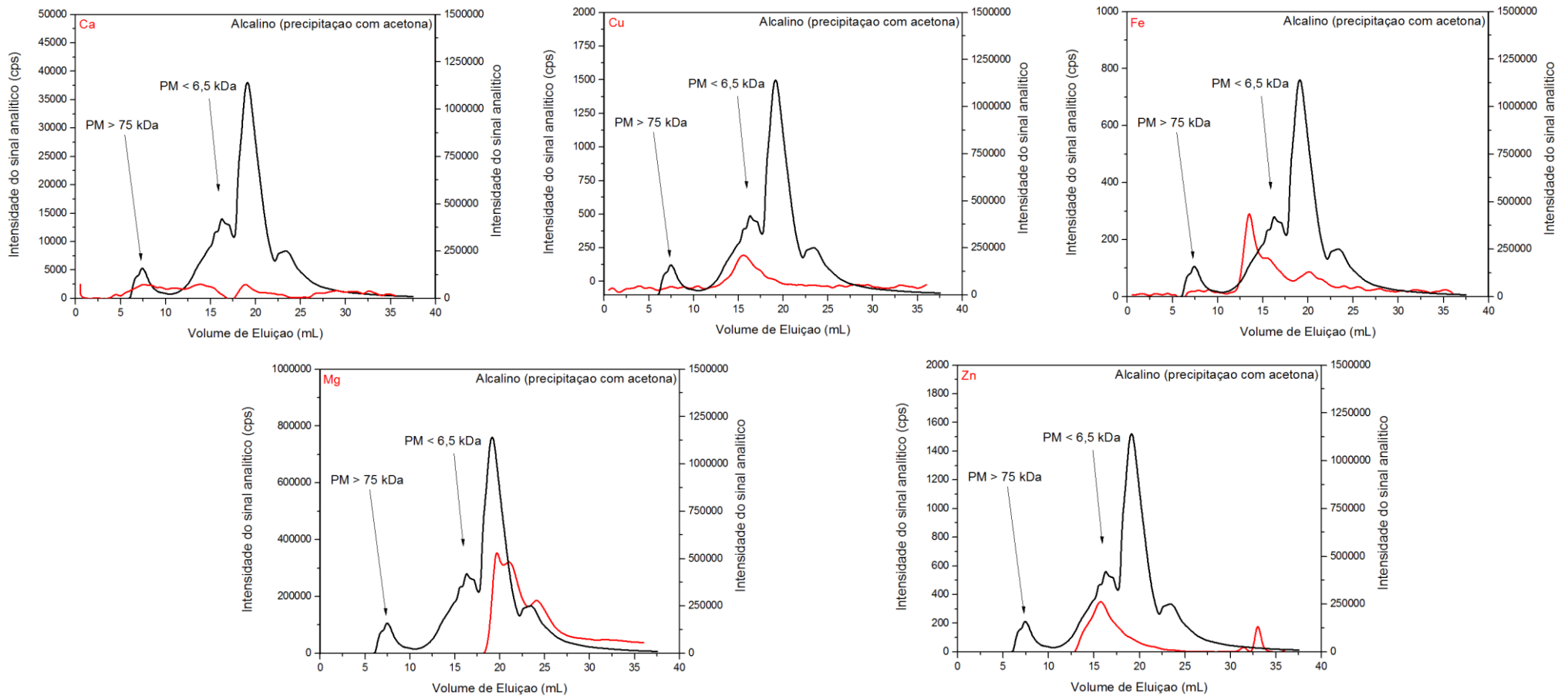


Figura 17: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração alcalina de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

A distribuição elementar do ferro foi análoga à obtida antes da etapa de precipitação com solução orgânica, pois a sobreposição entre os perfis se deu entre 40 e 6,5 kDa (Figuras 12 e 18). Este fato revela que a interação entre ferro e compostos moleculares não foi alterada durante o processo de precipitação, levando à suposição de que este elemento pode estar ligado ao sítio de macromoléculas de baixo peso molecular.

Novamente, o magnésio apresentou um perfil elementar distribuído entre regiões de baixo peso molecular (Figura 18) e o processo de precipitação demonstra que esta espécie não está associada a compostos moleculares. Portanto, pode-se considerar que esta espécie está livre ou associada a compostos que não absorvem neste comprimento de onda.

O zinco foi detectado em diferentes frações do extrato aquoso (Figura 18). Uma parte deste elemento está presente em frações acima da faixa de calibração da coluna cromatográfica ($PM > 75$ kDa), onde não há presença de compostos moleculares. Ou seja, existe a possibilidade do zinco estar associado a macromoléculas que não são detectáveis no comprimento de onda de medida. Há, também, a presença deste elemento em regiões abaixo de 16 kDa, onde são encontradas espécies moleculares, mas a sobreposição entre os perfis não se dá de modo efetivo. E, por fim, foi encontrado zinco em frações abaixo da faixa de calibração ($PM < 6,5$ kDa), onde não há presença de espécies moleculares de interesse. O que leva a supor que esta fração de zinco pode estar associada à compostos de baixo peso molecular que não são detectáveis no comprimento de onda de medida e/ou estão presentes na forma livre.

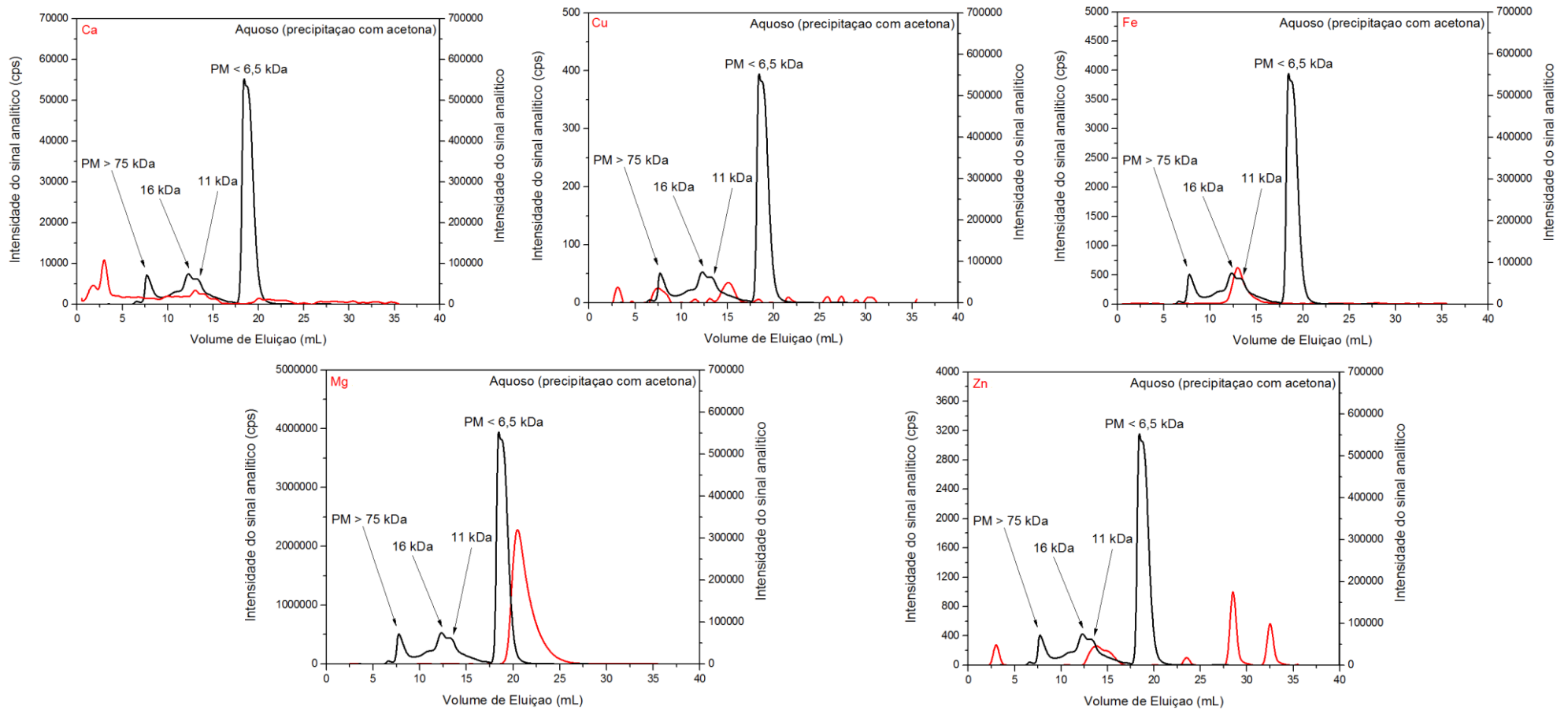


Figura 18: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração aquosa de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

A correlação entre espécies moleculares e elementares de cálcio no extrato tamponado com precipitação em acetona (Figura 19) se dá em faixas de distribuição entre 12 e 40 kDa. As demais frações onde foram encontradas este elemento, demonstram que o mesmo pode estar associado a compostos maiores que 75 kDa e menores que 6,5 kDa, mas que não foram detectados no comprimento de 280 nm. As frações de cálcio detectadas em regiões abaixo de 6,5 kDa podem, também, estar na forma ionizada (não associada a compostos moleculares). Ao realizar a determinação de cobre no extrato tamponado (Figura 19), não foi possível estabelecer uma correlação entre este elemento e as espécies moleculares presentes após o processo de precipitação com acetona, pois o teor de cobre presente no extrato não proporcionou um sinal analítico de intensidade suficiente para ser construído o perfil de distribuição deste analito.

O perfil de distribuição elementar do ferro presente no extrato tamponado se restringiu à região compreendida entre 6,5 e 40 kDa (Figura 19). Porém, a sobreposição entre os perfis não foi efetiva devido a um deslocamento do perfil elementar em relação ao molecular.

As espécies de zinco presentes na extração em meio de tampão Tris-HCl não estão associadas aos compostos moleculares monitorados no comprimento de onda de interesse. Podendo ser consideradas espécies livres ou associadas a compostos de baixo peso molecular não detectáveis no comprimento de onda de medida.

Os estudos sobre os procedimentos de extração de proteínas demonstram que Cu, Fe e Zn podem estar associados a compostos moleculares presentes nas amostras de castanha de caju. Porém, Ca e Mg não apresentam correlação com os compostos moleculares detectados por medidas espectrofotométricas. Ou seja, estes elementos podem estar na forma livre ou associados a compostos que não

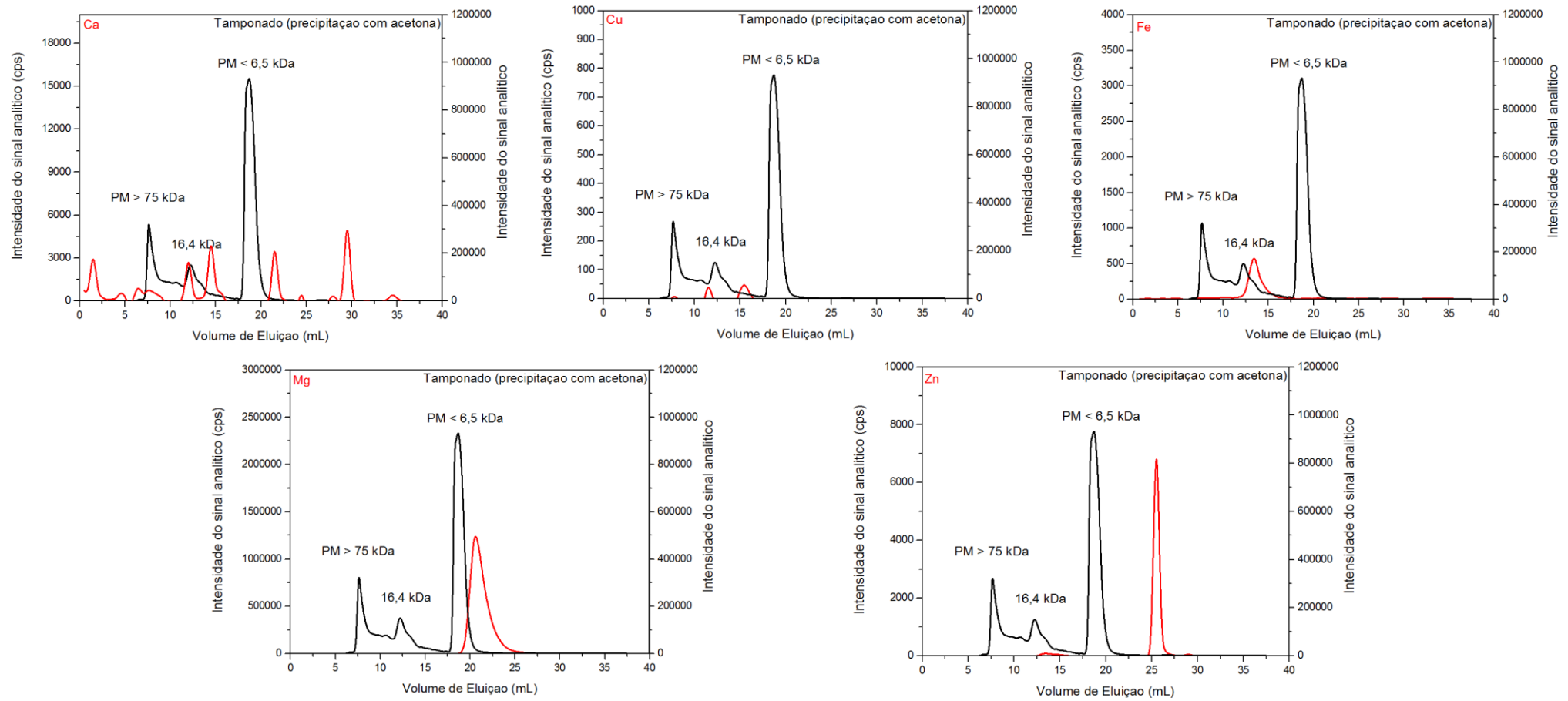


Figura 19: Sobreposição dos perfis moleculares e elementares obtidos a partir de soluções empregadas na extração tamponada de proteínas da castanha de caju + precipitação com acetona (**perfil molecular** ; **perfil elementar**)

absorvem no comprimento de onda de medida.

A realização de diferentes etapas de “clean up”, empregando HCl ou acetona como agente precipitante, demonstrou que as interações entre Cu, Zn e as espécies moleculares podem ser afetadas devido a desnaturação proporcionada por estes precipitantes. Porém, notou-se que a interação entre Fe e compostos de baixo peso molecular ocorre de forma bastante efetiva e não se altera após a etapa de precipitação/ressuspensão dos analitos.

Os estudos relativos aos processos de extração e precipitação das soluções extratoras e análise por SEC-UV-ICP OES proporcionaram uma caracterização do perfil de distribuição molecular e elementar das espécies presentes nestes diferentes meios solubilizantes. E, caso sejam realizados ensaios de digestão simulada *in vitro*, pode-se avaliar se tais interações serão desfeitas e se os compostos formados a partir deste processo de digestão gastrointestinal aumentam ou reduzem a bioacessibilidade dos elementos presentes nas amostras de castanhas de caju.

4.5. Ensaios para simulação de digestão *in vitro*

4.5.1. Determinação de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em extratos de soluções de digestão *in vitro*

A avaliação da biodisponibilidade dos elementos Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanhas de caju foi realizada a partir de um procedimento, recomendado pela “United States Pharmacopeia” (USP), que simula a ação do sistema gastrointestinal sobre o alimento. Porém, para avaliar a quantidade de analito bioacessível é necessário empregar uma etapa de diálise após a digestão simulada da amostra. O emprego deste processo se baseia no fato de que os compostos presentes no

extrato gastrointestinal simulado devem atingir uma condição de equilíbrio entre a parte interna e externa da membrana de diálise para que possa simular o processo de transporte do analito em direção ao organismo (Shiowatana, Purawatt *et al.*, 2006).

A avaliação do tempo ideal de diálise da solução proveniente da digestão gastrointestinal da castanha de caju foi realizada com água deionizada (solução dialisante), membrana de éster de celulose com tamanho de poro de 12 kDa, coleta e análise da solução dialisadora por ICP OES a cada 1 h.

É importante ressaltar que, em geral, o processo de diálise é feito durante 24 h, empregando 1 L de água como solução dialisante. Porém, neste estudo, foi necessário reduzir o volume de água para 30 mL, caso contrário, a diluição dos analitos seria bastante elevada e não possibilitaria a determinação dos mesmos por ICP OES.

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram que durante a primeira etapa de coleta há uma grande quantidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn sendo liberados para a solução dialisadora. Porém, à medida que o tempo de coleta aumenta, a intensidade do sinal analítico se reduz até atingir um patamar próximo de zero. Este fato indica que após 7 h de diálise os analitos são completamente dialisados e as trocas entre a solução interna e externa à membrana se tornam nulas. Portanto, este estudo demonstra que a etapa de diálise proveniente do processo de digestão gastrointestinal de castanhas de caju pode ser realizada por 7 h, pois, após este intervalo de tempo, não há quantidades significativas dos analitos sendo transportados para a solução dialisante.

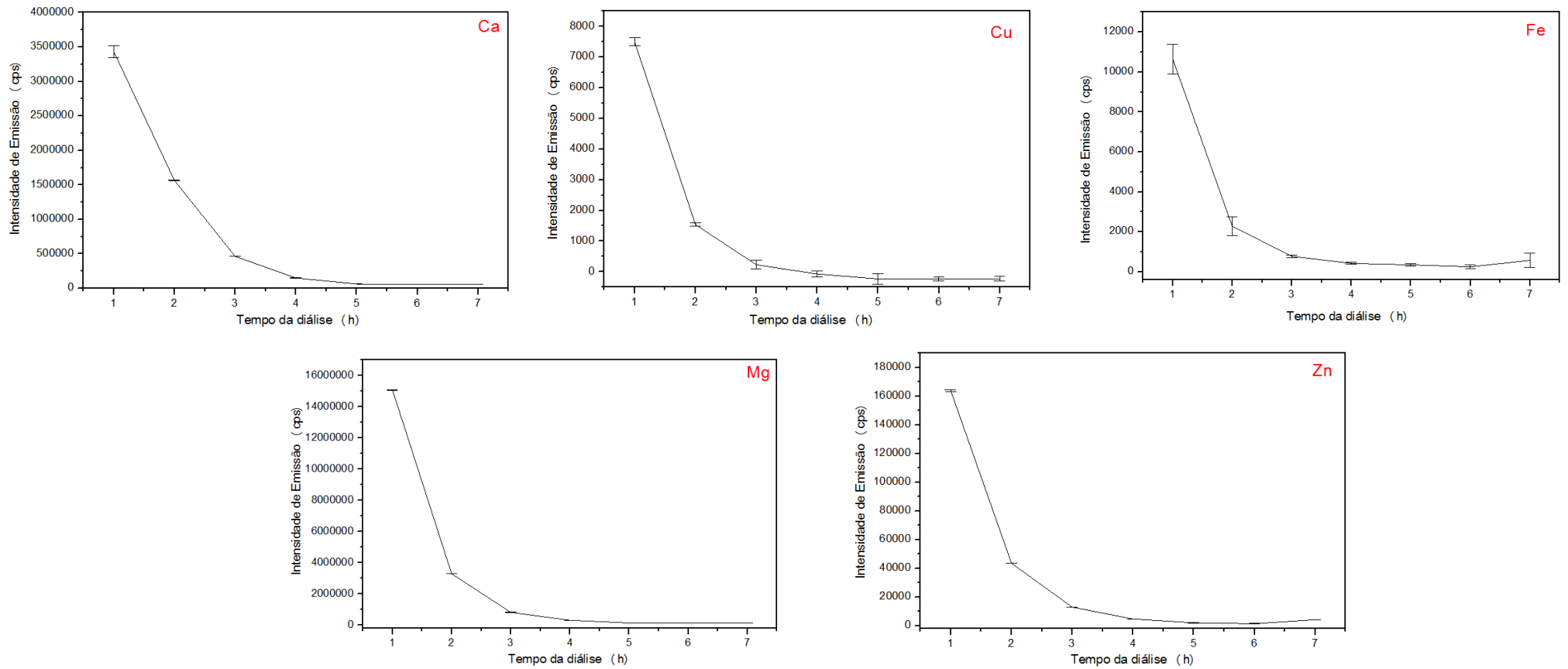


Figura 20: Monitoramento de soluções de água de diálise por ICP OES

Após fixar o tempo ideal de diálise em 7 h foi realizada, novamente, a digestão gastrointestinal da castanha de caju e avaliada a biodisponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn. Porém, neste estudo, a etapa de diálise foi realizada utilizando 1L de água deionizada e realizando-se a troca desta a cada 2 h. Sendo que, os resultados provenientes deste estudo estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Avaliação da biodisponibilidade dos elementos em castanha de caju

Amostra	Ca (mg kg⁻¹)	Cu (mg Kg⁻¹)	Fe (mg Kg⁻¹)	Mg (mg Kg⁻¹)	Zn (mg Kg⁻¹)
Castanha de Caju (Teor total)	310±10	19,1±0,1	53,5±0,2	2200±100	40±3
Digestão Gastrointestinal de Castanha de Caju (Pré – diálise)	29 ±1	17,2±0,2	43±2	960±80	11,5±0,3
Digestão Gastrointestinal de Castanha de Caju (Pós – diálise)	3,5±0,1	5,1±0,4	4,4 ±0,2	111±6	-

Nota-se a partir dos resultados apresentados na Tabela 8 que 10% de Ca, 29% de Zn, 44% de Mg, 80% de Fe e 90% de Cu presentes na castanha de caju foram extraídos em meio da solução de digestão gastrointestinal. A reduzida porcentagem de extração de Ca, Zn e Mg pode ser explicada pela presença de oxalato, pois a castanha de caju apresenta elevado teor deste composto orgânico o qual pode formar compostos bastante insolúveis com Ca, Zn e Mg na etapa de digestão intestinal, diminuindo a bioacessibilidade destes analitos (Ritter e Savage, 2007).

Após a etapa de diálise verifica-se que 100% do Zn e 90% do Ca, Fe e Mg extraídos durante o processo de digestão foram dialisados, porém, para o cobre esta porcentagem foi de 70%. Estes resultados revelam que apesar da elevada concentração de elementos na castanha de caju, apenas uma pequena fração destes analitos foi extraída pelo fluido gastrointestinal. Ou seja, a concentração total dos elementos não refletiu o teor dos analitos extraídos durante o processo digestivo. E, também, os resultados provenientes do processo de diálise demonstram que a bioacessibilidade dos mesmos foi bastante diferenciada, provavelmente devido aos produtos gerados durante a ação do fluido gástrico e intestinal sobre a amostra.

Apesar dos indicativos fornecidos pelo método “*in vitro*”, para se ter um melhor entendimento da biodisponibilidade desses elementos é necessário que seja realizada uma complementação destes estudos através da técnica “*in vivo*”. Uma vez que, os sistemas “*in vitro*” não possuem a capacidade de simular a absorção do analito pelas paredes do intestino, bem como, propiciar uma avaliação global de como o nutriente interage com as diversas substâncias e órgãos que compõem o organismo humano, além de não avaliar efeitos sinérgicos devido à presença de outros elementos (Ammerman, Baker *et al.*, 1995).

4.5.2. Separações cromatográficas dos extratos de digestão simulada pré e pós-diálise

O processo de digestão gastrointestinal simulado das castanhas de caju demonstrou que Ca, Cu, Fe, Mg e Zn podem ser bioacessíveis, porém, em porcentagens diferentes. Entretanto, verifica-se que o emprego do acoplamento

SEC-UV-ICP OES possibilita obter informações mais amplas sobre a correlação entre espécies moleculares e elementares extraídas após a etapa de digestão *in vitro* das amostras, fornecendo indícios sobre a degradação/transformação sofrida pelas espécies químicas nas castanhas de caju.

A avaliação das soluções gastrointestinais simuladas das castanhas de caju, obtidas antes e posteriormente à etapa de diálise, foi realizada, inicialmente, por cromatografia de exclusão por tamanho com o objetivo de avaliar o perfil de distribuição molecular dos compostos extraídos.

O perfil de distribuição obtido para o extrato analisado antes da etapa de diálise (Figura 21) demonstra que os compostos moleculares estão distribuídos por toda a região de calibração da coluna cromatográfica. Nota-se, também, que em volumes de eluição abaixo de 10 mL e acima de 15 mL há regiões onde se encontram compostos de alto (>75 kDa) e baixo (<6,5 kDa) peso molecular.

O perfil encontrado a partir da análise do extrato gastrointestinal sem diálise (Figura 21) se assemelha com o apresentado para o extrato de água na Figura 6, onde foram avaliados os perfis cromatográficos de diferentes soluções extratoras de proteínas. Porém, no extrato proveniente do processo de digestão gastrointestinal foram identificados compostos de baixo peso molecular em volume de eluição igual a 20 mL e, ao analisar o extrato em água, estes compostos estão ausentes. A presença destes compostos de baixo peso molecular na solução gastrointestinal simulada pode representar um processo de digestão das proteínas devido à ação de enzimas como a pepsina, a qual realiza a degradação das proteínas e leva a formação de compostos de pesos moleculares menores, tais como, aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos (Silverthorn, Ober *et al.*, 2003).

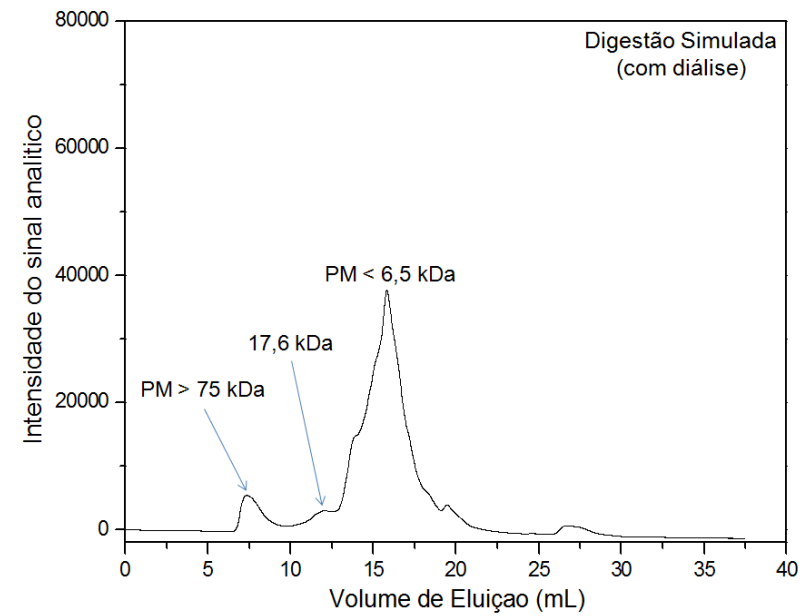
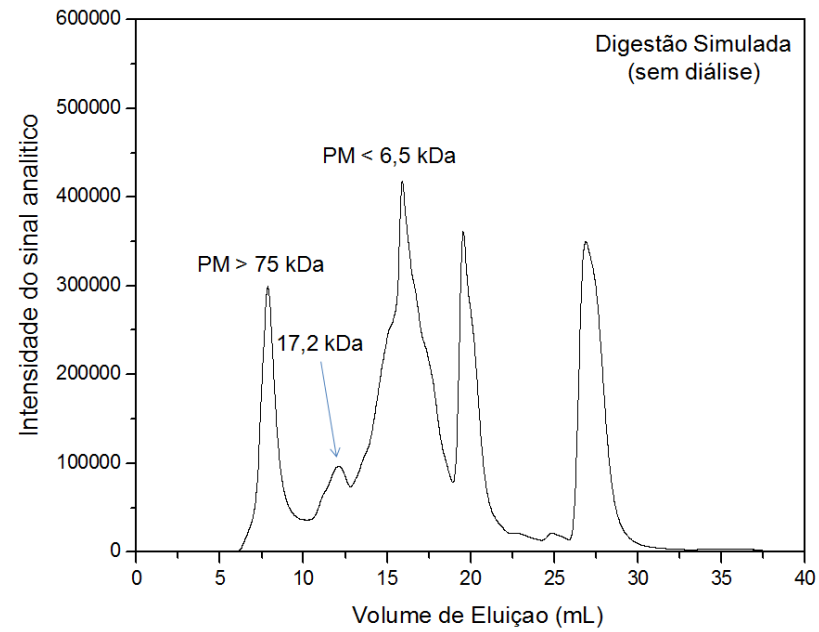


Figura 21: Perfil de distribuição molecular obtido a partir da separação cromatográfica de castanha de caju submetida ao processo de digestão gastrointestinal (sem e com diálise)

A diálise da amostra (Figura 21) demonstra que as intensidades dos sinais analíticos dos compostos eluídos anteriormente apresentam uma elevada atenuação devido ao efeito da diluição da amostra durante o processo de diálise. Outro fator importante foi que os compostos presentes em volumes de eluição entre 20 e 30 mL foram dialisados completamente devido tais substâncias apresentarem peso molecular abaixo da faixa de corte da membrana de diálise (12,5 kDa).

4.5.3. Perfis cromatográficos elementares de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por ICP OES dos extratos de digestão simulada pré e pós-diálise

A avaliação dos perfis elementares obtidos a partir dos extratos de digestão simulada de castanha de caju foi realizada por intermédio do acoplamento entre SEC-UV-ICP OES e SEC-UV-GF AAS. Inicialmente, foram determinados os perfis de distribuição elementar de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn presentes nas frações coletadas a partir do processo de separação cromatográfica da solução de digestão gastrointestinal de castanha de caju.

Os resultados obtidos a partir da avaliação do perfil de distribuição elementar do Ca antes do processo de diálise por SEC-UV-ICP OES (Figura 22) demonstram que este analito pode estar associado à compostos de alto e baixo peso molecular, notando-se uma correlação deste elemento e espécies maiores que 75 kDa. Observa-se, também, uma correlação destas espécies na faixa de distribuição compreendida entre 17,2 e 6,5 kDa. A intensidade do sinal analítico para este elemento foi reduzida após a etapa de diálise e as correlações anteriores não permaneceram constantes. Estas constatações demonstram que a interação entre

Ca e os compostos moleculares podem ser fracas e este analito pode estar na forma livre ao término do processo de diálise.

O processo de digestão *in vitro* demonstra uma provável associação do cobre com compostos de pesos moleculares maiores que 75 kDa e menores que 6,5 kDa antes do processo de diálise (Figura 23). A correlação entre cobre e espécies de baixo peso molecular (<6,5 kDa) também foi observada nas soluções provenientes da extração de proteínas empregando água deionizada e tampão Tris-HCl (Figuras 12 e 13), o que poderia indicar uma forte correlação entre estas espécies mesmo após o processo de digestão gastrointestinal da castanha de caju. Porém, ao realizar a diálise da amostra, observa-se que não foi encontrada a correlação entre cobre e espécies moleculares presentes neste extrato, o que leva a suposição de que o Cu pode estar fracamente ligado aos compostos eluídos por SEC e durante a diálise estas interações são desfeitas e o analito é liberado para a parte externa da membrana de éster de celulose.

As espécies elementares de Fe presentes na etapa de digestão simulada (Figura 24) foram correlacionadas a frações de compostos de alto (> 75 kDa) e baixo peso molecular (17,2 a 6,5 kDa). Ao comparar este perfil de distribuição elementar com os obtidos através da análise de diferentes soluções extratoras (Figuras 11, 12 e 13), verifica-se que no extrato alcalino a correlação entre compostos de alto e baixo peso molecular com o Fe é similar às obtidas para o extrato gastrointestinal de castanha de caju. Porém, os extratos em água (Figura 12) e tamponado (Figura 13) apresentam apenas a correlação de Fe com espécies moleculares compreendidas entre 17 e 6,5 kDa.

O processo de diálise da amostra digerida (Figura 24) demonstra que a associação entre Fe e proteínas continua sendo efetiva apenas na faixa de

distribuição de baixo peso molecular, podendo ser um indício da presença de metaloproteínas nas diferentes soluções extratoras (água, tampão Tris-HCl e fluido gastrointestinal). Ou seja, a ação dos fluidos (gástrico e intestinal) sobre a amostra não afeta a interação do Fe e as espécies de baixo peso molecular.

O monitoramento do perfil elementar do magnésio revelou que este analito estava associado a compostos de baixo peso molecular (< 6,5 kDa) gerados durante a digestão *in vitro* (Figura 25). Porém, a análise de soluções provenientes do processo de solubilização de proteínas (Figuras 11, 12 e 13) não demonstrou a presença deste pico. O qual pode ser atribuído, conforme relatado em tópicos anteriores, a um processo de degradação de proteínas devido a ação da enzima pepsina. Porém, esta correlação se desfez após o processo de diálise, indicando que as espécies de magnésio extraídas durante a digestão simulada podem estar na forma livre e, ocasionalmente, fracamente ligadas aos compostos moleculares de interesse.

O monitoramento das espécies de Zn demonstra que este elemento estava associado a compostos de alto e baixo peso molecular (Figura 26), assim como observado nos processo de extração de proteínas em meio de NaOH e água (Figuras 11 e 12, respectivamente). Porém, ao dialisar a amostra, as informações foram completamente divergentes do processo pré-diálise. Ou seja, não foram encontradas possíveis correlações entre espécies moleculares e o zinco presente em solução. Portanto, as espécies de Zn presentes podem estar na forma livre.

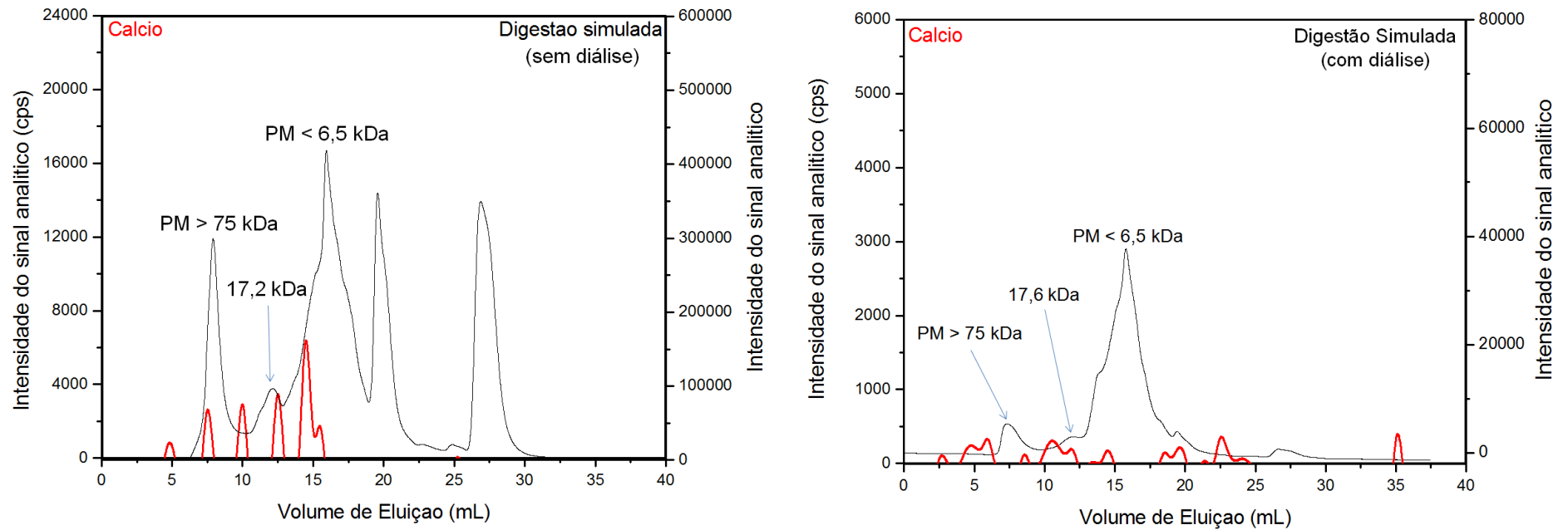


Figura 22: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elemental obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elemental de Ca**)

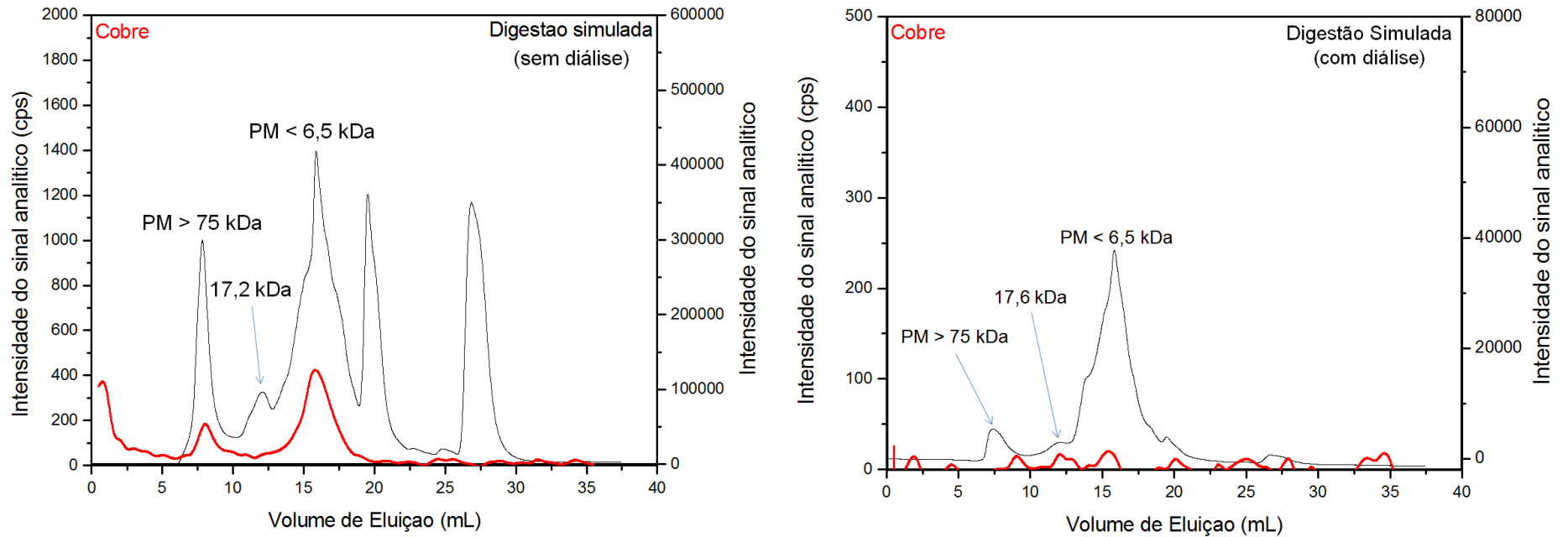


Figura 23: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elemental obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elemental de Cu**)

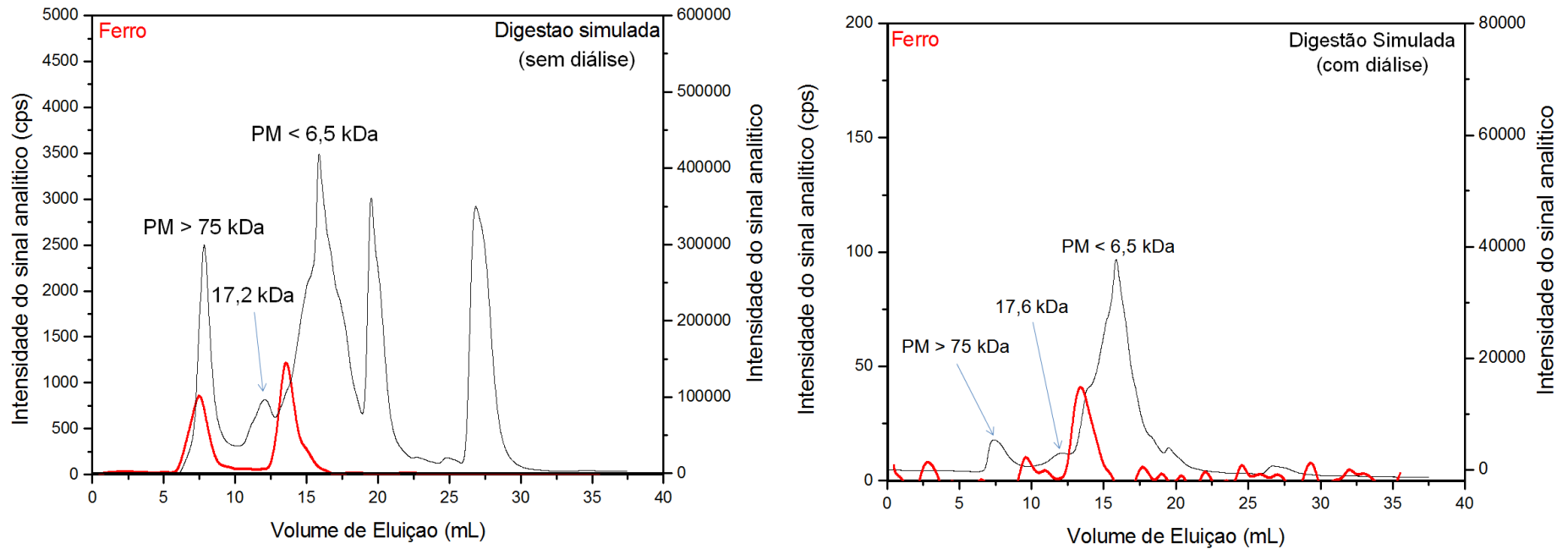


Figura 24: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elemental obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elemental de Fe**)

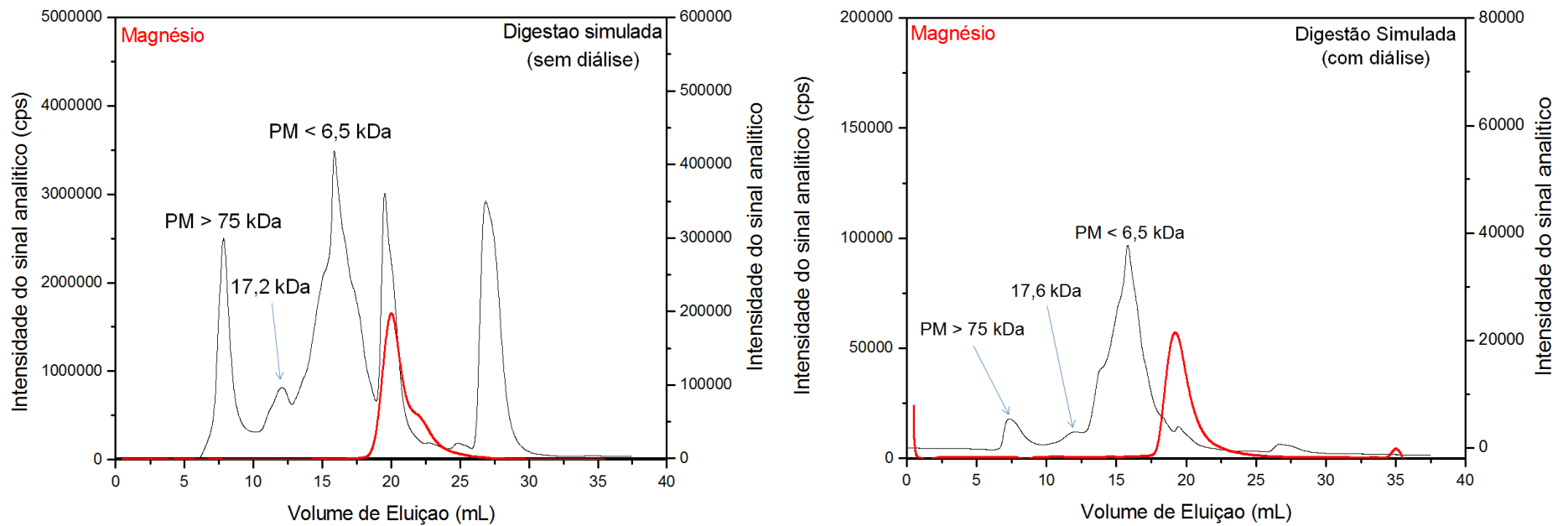


Figura 25: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elemental obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elemental de Mg**)

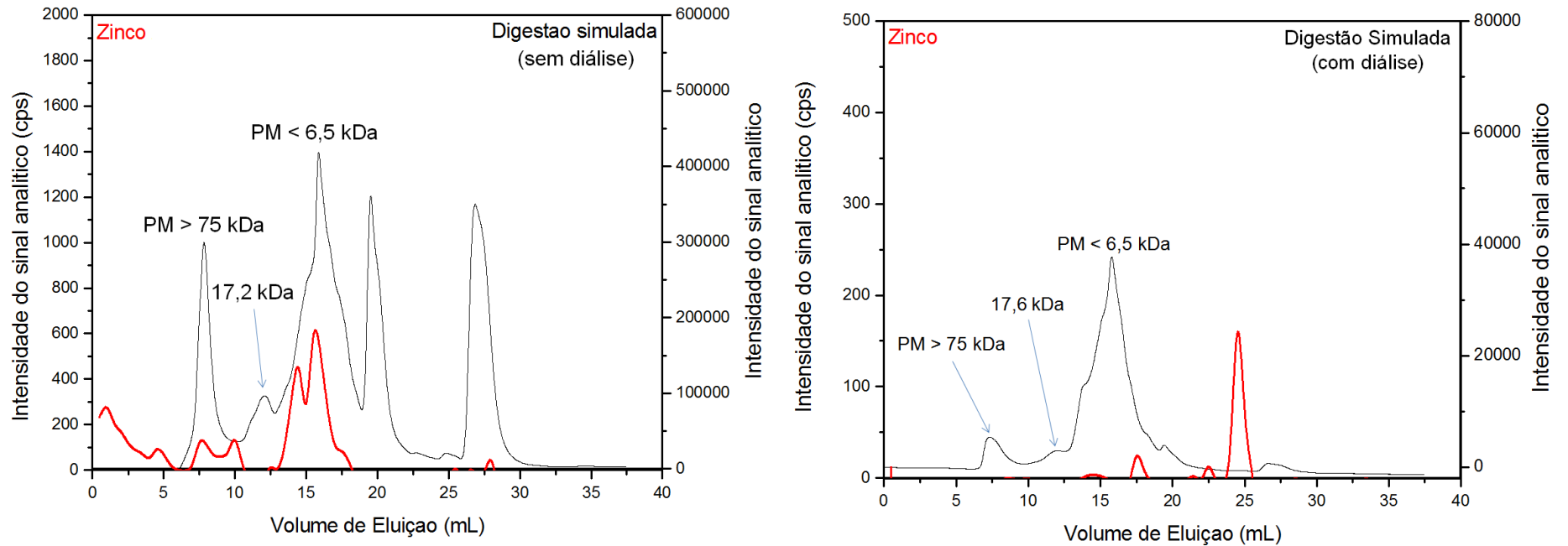


Figura 26: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elemental obtido por SEC-UV-ICP OES a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise (separação molecular; **análise elemental de Zn**)

Conforme relatado no início deste tópico, foi realizada, também, a análise e comparação dos perfis elementares de Fe obtidos por SEC-UV-ICP OES com as determinações feitas por SEC-UV-SIMAAS de soluções provenientes do processo de digestão gastrointestinal da castanha de caju (Figura 27).

O monitoramento das soluções antes da etapa de diálise demonstrou que em ambos os sistemas instrumentais têm-se a identificação de espécies de Fe associadas a compostos moleculares localizados em regiões compreendidas entre 19 e 6,5 kDa. Nota-se, também, que apenas no sistema SEC-UV-ICP OES existe a correlação de Fe com compostos de pesos moleculares maiores que 75 kDa.

A diferença no perfil elementar observado anteriormente pode revelar que há uma fraca interação entre o ferro e compostos de alto peso molecular, o que acarreta em uma mudança no perfil de distribuição deste elemento durante o processo de separação cromatográfica. Este fato pode ser notado quando se avaliam os perfis elementares dos extratos gastrointestinais após a etapa de diálise, uma vez que a provável interação entre os compostos maiores que 75 kDa e espécies de Fe não foram identificadas pelos dois sistemas instrumentais de análise utilizados. Porém, notou-se que a interação entre compostos compreendidos entre 19 e 6,5 kDa continua aparecendo, mesmo após ter sido realizada 7 h de diálise. Sendo assim, a interação entre ferro e estes compostos são mantidas de modo que a ação das enzimas digestivas sobre a amostra não rompe tais ligações.

Portanto, os estudos realizados por SEC-UV-SIMAAS e SEC-UV-ICP OES demonstram que estes acoplamentos podem oferecer uma excelente alternativa para avaliar a correlação entre espécies moleculares e elementares presentes em diferentes faixas de concentração na castanha de caju. Reduzindo-se, assim, os custos relativos a operação e manutenção de equipamentos como o HPLC-ICP MS.

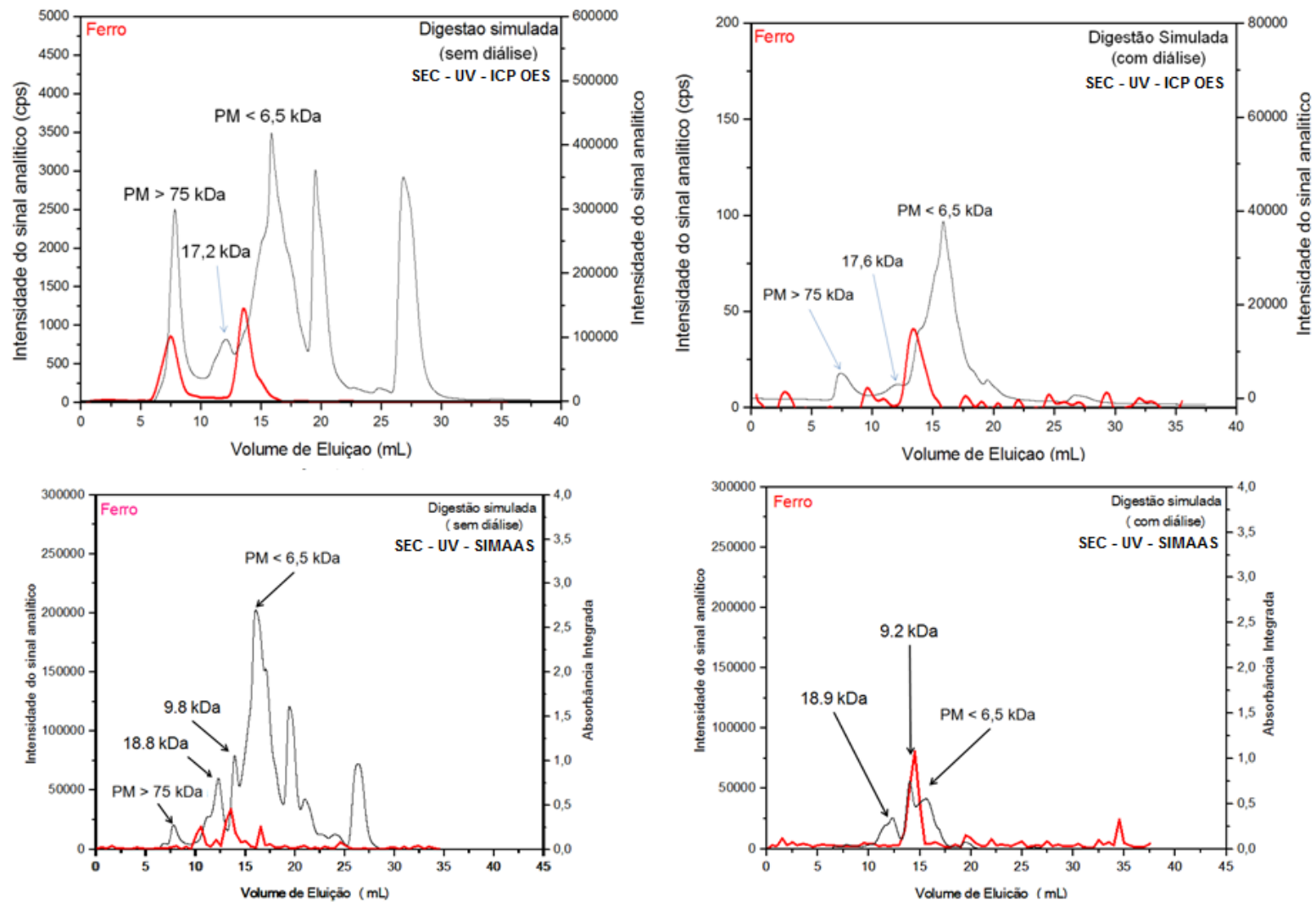


Figura 27: Sobreposição do perfil molecular obtido a partir da separação cromatográfica e elementar obtido a partir do processo de digestão simulada da castanha de caju com e sem diálise analisados por SEC – UV - ICP OES e SEC – UV – SIMAAS (separação molecular; análise elementar de Fe)

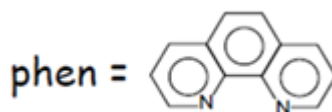
4.6. Especificação de Fe(II)/Fe(III) após diálise da digestão gastrointestinal

Em diversos estudos apresentados na literatura verifica-se que a biodisponibilidade de ferro em alimentos varia substancialmente de acordo com sua forma química. O ferro inorgânico, por exemplo, pode ser absorvido na forma de Fe(II) e Fe(III), sendo que o íon divalente possui uma maior absorção que a forma trivalente. O Fe Heme, o qual é encontrado em alimentos de origem animal, é uma das espécies de ferro mais biodisponíveis, com aproximadamente 25% de absorção desta forma (ferro orgânico) no organismo. A taxa de absorção de ferro nas dietas de modo geral é de apenas 10%, sendo que, em mulheres há uma necessidade maior de absorção deste elemento (entre 1 – 2 mg por dia) do que nos homens (cerca de 1 mg por dia). E, se considerarmos a situação dos vegetarianos, em particular as mulheres vegetarianas, verifica-se que é preciso ter um cuidado redobrado ao estabelecer uma dieta restritiva a alimentos que possuem alto teor de ferro biodisponível (Cornelis, Caruso *et al.*, 2003; Camara, Amaro *et al.*, 2005).

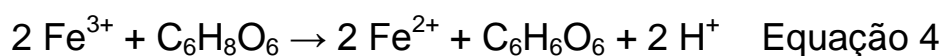
Para se estimar a biodisponibilidade de um nutriente pode-se recorrer ao emprego de métodos *in vitro* e *in vivo* (Dendougui e Schwedt, 2004; Etcheverry, Carstens *et al.*, 2007; Gautam, Platel *et al.*, 2010). No caso dos métodos *in vitro*, dependendo dos procedimentos adotados, têm-se algumas limitações decorrentes da não simulação da etapa de transporte e/ou absorção do nutriente pelas paredes do aparelho digestivo (Machado, 2005; Fernandez-Garcia, Carvajal-Lerida *et al.*, 2009).

Na tentativa de buscar mais informações acerca das espécies de ferro que estariam sendo dialisadas e, portanto, disponíveis para absorção, foi feita a análise de especificação de Fe(II) e Fe(III). O monitoramento das espécies de ferro formadas após o

processo de digestão gastrointestinal possibilita uma melhor compreensão do processo de absorção do nutriente no organismo humano. Portanto, as espécies de Fe(II) e Fe(III) livres foram determinadas por meio de um método espectrofotométrico que emprega uma cela de fluxo capilar com 100 cm de caminho óptico, a qual propicia realizar determinações em baixas concentrações (Melchert, 2009). Ao conhecer as concentrações totais de ferro obtidas após a digestão gastrointestinal e na solução dialisada foi possível inferir, através da análise de especiação, sobre as concentrações de ferro na forma orgânica e inorgânica (Fe (II) e Fe(III)) presentes neste meio. Para a realização desta avaliação foi utilizado o reagente cromogênico 1,10 Fenantrolina (Rocha, Martelli *et al.*, 2000; Rocha e Teixeira, 2004; Teixeira, Brasileiro *et al.*, 2006), o qual possui a capacidade de complexar o íon Fe(II) conforme a equação química representada abaixo (Skoog, West *et al.*, 2006).



Caso haja adição de ácido ascórbico, este provocará a redução dos íons Fe(III) a Fe(II) e, conseqüentemente, a complexação do íon ferroso pelo reagente cromogênico, tornando possível a determinação de ferro total (Fe(II) + Fe(III)) conforme podemos verificar nas seguintes reações:





Baseado nestas reações, pode-se determinar quali e quantitativamente a presença de espécies de Fe(II) e Fe(III) e, por consequência, se dispusermos da concentração total de ferro presente no meio em questão, pode-se diferenciar espécies de ferro livres e/ou associadas a outras moléculas presentes nos extratos de digestão gastrointestinal da castanha de caju através da diferença entre a concentração total e das espécies de ferro presentes no meio.

Considerando estas informações foi realizado o monitoramento destas espécies de ferro em amostras de água de diálise e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 28. O gráfico apresentado nesta figura demonstra que a concentração da espécie de ferro divalente (Fe(II)) foi nula durante toda a etapa de análise. Porém, verifica-se que o sistema de detecção empregado permite a determinação do íon férrico (Fe(III)), o qual apresenta um decaimento exponencial em sua concentração ao longo do processo de análise. Ao realizar a determinação desta espécie, usando o método de adição de padrão e considerando a massa de castanha empregada para realizar o processo de digestão simulada, verificou-se que o teor de Fe(III) livre presente na solução foi de $5,8 \text{ mg kg}^{-1}$. Este valor de concentração corresponde a 15% do ferro total extraído durante o processo de digestão gastrointestinal e que migrou em direção à solução dialisadora. Portanto, supõe-se que a quantidade remanescente de ferro (cerca de 85%) esteja ligada a compostos moleculares estáveis ou formando complexos com ligantes, gerados durante a digestão gastrointestinal, os quais possuem constante de formação superior aquela entre ferro-fenantrolina. Dependendo da forma química dessas espécies de ferro pode-se obter uma maior taxa de absorção pelo organismo

humano. Portanto, os estudos seguintes procuram verificar uma correlação entre espécies moleculares e o ferro através do sistema SEC-UV-ICP OES.

A hidrólise do Fe(II) e Fe(III) também deve ser considerada, visto que o pH da solução gastrointestinal como da água de diálise é igual a 7. Porém, cabe ressaltar que esta possibilidade não foi investigada neste trabalho.

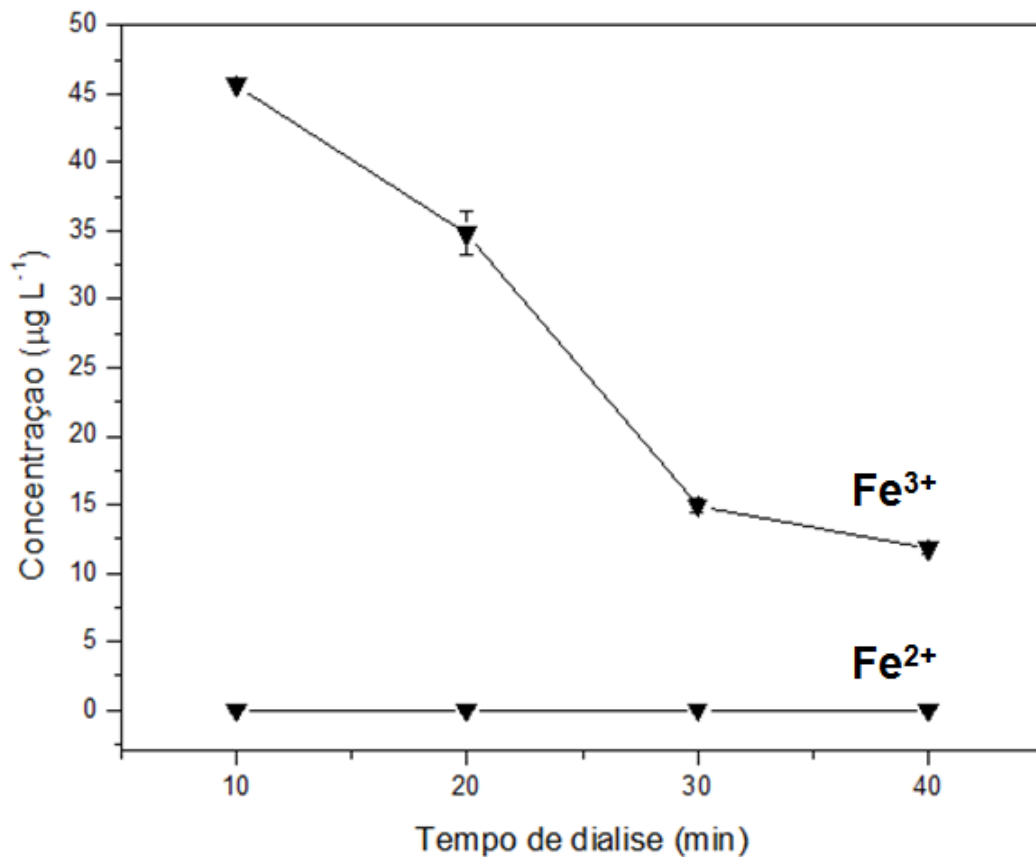


Figura 28: Avaliação da presença de espécies de ferro livres (Fe(II) e Fe(III)) presentes em solução de diálise provenientes de extratos gastrointestinais de castanha de caju (membrana de diálise de 12 kDa)

5. Conclusões

A etapa de extração de proteínas com solução de NaOH demonstrou eficiência de 40%, quando comparada com a determinação do teor total de proteínas realizada por determinação de nitrogênio.

A avaliação do teor de nutrientes forneceu informações acerca da composição elementar da amostra, porém, o valor nutricional deste alimento só pode ser verificado quando se realizam ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*. Sendo assim, a utilização de soluções gástrica e intestinal, as quais simulam as condições de digestão que ocorrem no interior do nosso organismo, possibilita obter maiores informações sobre este parâmetro de suma importância em dietas alimentares. Os estudos realizados por metodologia *in vitro*, revelaram que aproximadamente 10% de Ca, 29% de Zn, 44% de Mg, 80% de Fe e 90% de Cu são extraídos durante a digestão, sendo que a análise da solução proveniente do processo de diálise demonstra que 100% do Zn e 90% do Ca, Fe e Mg passaram através da membrana de diálise. Apenas o cobre apresentou uma porcentagem de diálise de 70%. Ou seja, há uma grande quantidade de Cu, Fe e Mg bioacessível em amostras de castanha de caju.

O monitoramento das espécies de ferro em amostras de água de diálise demonstra que apenas o íon trivalente (Fe^{3+}) foi identificado durante as determinações. Sendo que, ao realizar a quantificação desta espécie, por intermédio do método de adição de padrão, verifica-se que o teor de ferro livre presente na solução foi de 15%. Portanto, esta solução deverá conter aproximadamente 85% de espécies químicas de ferro presentes no extrato gastrointestinal, as quais estão associadas à compostos

moleculares. E, dependendo da forma química das mesmas, pode-se obter uma maior taxa de absorção deste elemento no organismo humano.

A eficiência do processo de extração e solubilização de proteínas empregando solução aquosa, alcalina e tamponada indica que a solução alcalina possui elevada capacidade de solubilização de proteínas, quando comparada com os demais extratos. E, um dos fatores que podem influenciar esta maior solubilização seria a presença dos íons hidroxilas, os quais desprotonam os grupos ácidos presentes nas proteínas facilitando a extração deste analito.

As análises cromatográficas e elementares das soluções gastrointestinais demonstram que os elementos se apresentam distribuídos em proteínas de alto e baixo peso molecular. O processo de diálise demonstra que algumas interações são desfeitas e a correlação elementar e molecular não foi estabelecida após esta etapa de purificação. Porém, estes dados podem fornecer o primeiro indício de que pode haver a presença de metaloproteínas em amostras de castanha de caju e que estudos mais aprofundados devem ser realizados para se confirmar tais informações.

A análise molecular das soluções extratoras de proteínas demonstrou que em meio alcalino ou tamponado há uma maior solubilização de compostos que possuem alto peso molecular, enquanto o meio aquoso possui maiores quantidades de espécies de baixo peso molecular extraídas.

A precipitação realizada a partir dos extratos proteicos utilizando solução ácida (HCl) propicia uma alteração no perfil de distribuição molecular dos compostos presentes nos extratos aquoso e tamponado. Porém, o uso da precipitação em meio de acetona revela que os perfis de separação dos compostos são diferentes em relação aos obtidos durante a precipitação ácida, pois em meio de acetona ocorre a seleção de

compostos de baixo peso molecular ($< 6,5$ kDa). Portanto, os estudos realizados demonstram a possibilidade de selecionar os compostos moleculares de interesse pelo emprego de agentes precipitantes (HCl ou Acetona) que propiciem a separação de proteínas de alto e baixo peso molecular.

6. Referências Bibliográficas

Ammann, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. Journal of Mass Spectrometry, v.42, n.4, Apr, p.419-427. 2007.

Ammerman, C. B., D. H. Baker, *et al.* Bioavailability of nutrients for animals. San Diego: Academic Press. 1995

Andrade, E. C. B., S. P. Alves, *et al.* Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. Ciencia E Tecnologia De Alimentos, v.25, n.3, Set, p.591-596. 2005.

Banco de alimentos e colheita urbana: Noções básicas sobre alimentação e nutrição. Rio de Janeiro: SESC - Serviço Social do Comércio / Departamento Nacional. 2003. 20 p. (MESA BRASIL SESC - Segurança Alimentar e Nutricional)

Benito, P. e D. Miller. Iron absorption and bioavailability: An updated review. Nutrition Research, v.18, n.3, Mar, p.581-603. 1998.

Bora, P. S. e V. Q. Neto. Functionality of native and denatured cashew nut kernel protein isolates at isoelectric pH as a function of salt concentration. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.84, n.15, Dec, p.2022-2027. 2004.

Bora, P. S. e D. Ribeiro. Note: Influence of pH on the extraction yield and functional properties of macadamia (*Macadamia integrifolia*) protein isolates. Food Science and Technology International, v.10, n.4, Aug, p.263-267. 2004.

Brigide, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. 71 p.

Bueno, L. Effect of medium-chain triglycerides, fiber and calcium on the availability of magnesium and zinc by an in vitro method and response surface methodology. Quimica Nova, v.31, n.2, p.306-311. 2008.

Buzinaro, E. F., R. N. A. Almeida, *et al.* Biodisponibilidade do cálcio dietético. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v.50, p.852-861. 2006.

Cabrera, C., F. Lloris, *et al.* Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. Science of the Total Environment, v.308, n.1-3, Jun, p.1-14. 2003.

Camara, F., M. A. Amaro, *et al.* Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus. European Food Research and Technology, v.221, n.6, Nov, p.768-773. 2005.

Chang, J. C., W. H. Gutenmann, *et al.* Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. Chemosphere, v.30, n.4, Feb, p.801-802. 1995.

Cornelis, R., J. A. Caruso, *et al.* Handbook of elemental speciation techniques and methodology. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. 2003. 666 p.

Cozzolino, S. M. Biodisponibilidade de nutrientes. São Paulo: Editora Manole LTDA, v.1. 2009. 1172 p.

Da Silva, M. A. M., V. L. A. Frescura, *et al.* Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, v.55, n.7, Jul, p.803-813. 2000.

Dendougui, F. e G. Schwedt. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. European Food Research and Technology, v.219, n.4, Sep, p.409-415. 2004.

Diaz-Bone, R. A. e T. Van De Wiele. Biotransformation of metal(loid)s by intestinal microorganisms. Pure and Applied Chemistry, v.82, n.2, Feb, p.409-427. 2010.

Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Elements. United States: United States Department of Agriculture (USDA) 2010.

Dumont, E., L. De Pauw, *et al.* Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? Food Chemistry, v.95, n.4, Apr, p.684-692. 2006.

Dundar, M. S. e H. Altundag. Selenium content of Turkish hazelnut varieties: Kara Findik, Tombul and Delisava. Journal of Food Composition and Analysis, v.17, n.6, Dec, p.707-712. 2004.

Etcheverry, P., G. E. Carstens, *et al.* Production of stable-isotope-labeled bovine heme and its use to measure heme-iron absorption in children. American Journal of Clinical Nutrition, v.85, n.2, Feb, p.452-459. 2007.

Fairweathertait, S. J. Bioavailability of trace-elements. Food Chemistry, v.43, n.3, p.213-217. 1992.

Fernandez-Garcia, E., I. Carvajal-Lerida, *et al.* In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. Nutrition Research, v.29, n.11, Nov, p.751-760. 2009.

Food energy - methods of analysis and conversion factors. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2002. 93 p. (Report of a technical workshop)

Freitas, J. B. e M. M. V. Naves. Chemical composition of nuts and edible seeds and their relation to nutrition and health. Brazilian Journal of Nutrition, v.23, n.2, Mar-Apr, p.269-279. 2010.

Freitas, S. C., E. B. Gonçalves, *et al.* Meta-analysis of selenium content in Brazil nuts. Brazilian Journal of Food Technology, v.11, n.1, Jan-Mar, p.54-62. 2008.

Garcia, J. S., C. S. De Magalhaes, *et al.* Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. Talanta, v.69, n.1, Mar, p.1-15. 2006.

Garcia, L. Y. C., A. C. A. Mota, *et al.* Anemias carenciais na infância. Jornal de Pediatria, v.20, n.2, Aug, p.112-125. 1998.

Garruti, D. S., A. R. S. Casimiro, *et al.* Processo Agroindustrial: Elaboração de fermentado de caju. Comunicado Técnico 82. Fortaleza: EMBRAPA: 6 p. 2003.

Gautam, S., K. Platel, *et al.* Higher Bioaccessibility of Iron and Zinc from Food Grains in the Presence of Garlic and Onion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.58, n.14, Jul, p.8426-8429. 2010.

Gervasio, A. P. G., A. F. Lavorante, *et al.* Capillary electrophoresis coupled to plasma spectrometry: An efficient tool for speciation. Quimica Nova, v.26, n.1, Jan-Feb, p.65-74. 2003.

Gomez-Ariza, J. L., A. Arias-Borrego, *et al.* Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A, v.1121, n.2, Jul, p.191-199. 2006.

Gomez-Ariza, J. L., T. Garcia-Barrera, *et al.* Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, v.85, n.4-5, Apr, p.255-266. 2005.

Gomez-Ariza, J. L., T. Garcia-Barrera, *et al.* Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. Analytica Chimica Acta, v.524, n.1-2, Oct, p.15-22. 2004.

Goncalves, A. M., K. G. Fernandes, *et al.* Determination and Fractionation of Barium in Brazil Nuts. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.20, n.4, p.760-769. 2009.

Guimarães, C. P. e U. M. Lanfer-Marquez. Estimativa do teor de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não-proteica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, p.365-375. 2005.

Guntinas, M., G. Bordin, *et al.* Identification, characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography. A review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.374, n.3, Oct, p.369-378. 2002.

Hurrell, R. F. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. Journal of Nutrition, v.133, n.9, Sep, p.2973S-2977S. 2003.

Irvine, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. Analytica Chimica Acta, v.352, n.1-3, Oct, p.387-397. 1997.

Kannamkumarath, S. S., K. Wrobel, *et al.* Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. Talanta, v.66, n.1, Mar, p.153-159. 2005.

Konoha, K., Y. Sadakane, *et al.* Zinc neurotoxicity and its role in neurodegenerative diseases. Journal of Health Science, v.52, n.1, Feb, p.1-8. 2006.

Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas. Piracicaba. 2008. 224 p.

Kulkarni, S. D., R. Acharya, *et al.* Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. Food Chemistry, v.103, n.2, p.681-688. 2007.

Lima, D. M., F. A. B. Colugnati, *et al.* Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA - UNICAMP. 2006. 114 p.

Lima, E. D. Estudo de despeliculamento da amêndoa da castanha de caju com aplicação de baixas temperaturas e ultra-som. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. 74 p.

Lima, J. R. e L. M. Bruno. Stability of cashew nut butter. Ciencia E Tecnologia De Alimentos, v.27, n.4, Oct-Dec, p.816-822. 2007.

Lorenzi, H., S. F. Sartori, *et al.* Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, v.1. 2006. 627 p.

Machado, F. M. V. F. Disponibilidade de Fe em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 88 p.

Martinez-Navarrete, N., M. M. Camacho, *et al.* Iron deficiency and iron fortified foods - a review. Food Research International, v.35, n.2-3, p.225-231. 2002.

Melchert, W. R. Desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos com alta sensibilidade para a determinação de espécies de interesse ambiental. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. 187 p.

Mellon, F. A., J. Eagles, *et al.* Absorption and bioavailability studies of mineral nutrients by mass-spectrometry. Analytica Chimica Acta, v.283, n.1, Nov, p.190-198. 1993.

Millea, K. M. e I. S. Krull. Subproteomics in analytical chemistry: Chromatographic fractionation techniques in the characterization of proteins and peptides. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.26, n.14, p.2195-2224. 2003.

Montaser, A. Inductively coupled plasma mass spectrometry. New York: John Wiley. 1998. 964 p.

Montes-Bayon, M., K. Denicola, *et al.* Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.1000, n.1-2, Jun, p.457-476. 2003.

Moodley, R., A. Kindness, *et al.* Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes, v.42, n.5, p.585-591. 2007.

Moreira, F. R. e J. C. Moreira. The significance of lead speciation analysis in blood plasma for health risk assessment. Quimica Nova, v.27, n.2, Mar-Apr, p.251-260. 2004.

Mounicou, S. e R. Lobinski. Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions. Pure and Applied Chemistry, v.80, n.12, Dec, p.2565-2575. 2008.

Naozuka, J., S. R. Marana, *et al.* Evaluation of Cu, Fe, Mn, Se and Zn distribution in protein fractions by size exclusion chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry. Pittsburg Conference & Expo - Pittcon. Chicago, 2007. p.

Naozuka, J. e P. V. Oliveira. Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic

absorption spectrometry. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.18, n.8, p.1547-1553. 2007a.

Naozuka, J. e P. V. Oliveira. Monitoring Se excretion in urine in Brazil nut by electrothermal atomic absorption spectrometry. Pittsburg Conference & Expo - Pittcon. Chicago, 2007b. p.

Naozuka, J., E. C. Vieira, *et al.* Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. Food Chemistry, v.124, n.4, Feb, p.1667-1672. 2011.

Nardi, E. P., F. S. Evangelista, *et al.* The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. Food Chemistry, v.112, n.3, Feb, p.727-732. 2009.

Nascimento, A. N. Explorando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica para a determinação simultânea de As, Co e Se em produtos petrolíferos. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. 72 p.

Ogunwolu, S. O., F. O. Henshaw, *et al.* Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. Food Chemistry, v.115, n.3, Aug, p.852-858. 2009.

Oliveira, V. H. Nutrição mineral do cajueiro. Fortaleza: Embrapa-CNPAT. 1995. 36 p.

Padovani, R. M., J. Amaya-Farfan, *et al.* Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. Revista de Nutrição, v.19, p.741-760. 2006.

Paiva, F. F. A., R. M. S. Neto, *et al.* Processamento de castanha de caju. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2006. 53 p. (Agroindústria Familiar)

Parisi, A. F. e B. L. Vallee. Zinc metalloenzymes - characteristics and significance in biology and medicine. American Journal of Clinical Nutrition, v.22, n.9, p.1222-+. 1969.

Pinheiro, M. V. S. e A. L. B. Penna. Substitutos de gordura: Tipos e aplicações em produtos lácteos. Brazilian Journal of Food and Nutrition, v.15, n.2, p.175 - 186. 2004.

Pinheiro, M. V. S., A. L. B. Porto, *et al.* A química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas e minerais. Maceió: Edufal. 2005. 52 p. (Conversando sobre ciências em Alagoas)

Pollack, S. e A. Perez. Fruit and tree nuts situation and outlook yearbook 2008. D. O. Agriculture. USA: United States Department of Agriculture: 200 p. 2008.

Prange, A. e D. Schaumlöffel. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.373, n.6, Jul, p.441-453. 2002.

Proposta de preços mínimos - Safra 2006/2007. C. N. D. A.-. Conab. Brasília: Ministério da Agricultura: 294 p. 2006.

Protein Purification Handbook. Björkgatan: Amersham Pharmacia Biotech - GE Healthcare Bio-Science AB. 1999. 94 p.

Queiroz, S. S. e M. A. A. Torres. Anemia ferropriva na infância. Jornal de Pediatria, v.76, n.3, Aug, p.S298-S304. 2000.

Ray, S. J., F. Andrade, *et al.* Plasma-source mass spectrometry for speciation analysis: state-of-the-art. Journal of Chromatography A, v.1050, n.1, Sep, p.3-34. 2004.

Ritter, M. M. C. e G. P. Savage. Soluble and insoluble oxalate content of nuts. Journal of Food Composition and Analysis, v.20, n.3-4, May, p.169-174. 2007.

Rocha, F. R. P., P. B. Martelli, *et al.* Didactic experiments employing a flow injection system. Quimica Nova, v.23, n.1, Jan-Feb, p.119-125. 2000.

Rocha, F. R. P. e L. S. G. Teixeira. Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. Quimica Nova, v.27, n.5, Sep-Oct, p.807-812. 2004.

Rodushkin, I., E. Engstrom, *et al.* Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. Science of the Total Environment, v.392, n.2-3, Mar, p.290-304. 2008.

Sanz-Medel, A., M. Montes-Bayon, *et al.* Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.377, n.2, Sep, p.236-247. 2003.

Sathe, S. K. Solubilization and electrophoretic characterization of cashew nut (*anacardium occidentale*) proteins. Food Chemistry, v.51, n.3, p.319-324. 1994.

Sathe, S. K., M. Venkatachalam, *et al.* Solubilization and Electrophoretic Characterization of Select Edible Nut Seed Proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.57, n.17, Sep, p.7846-7856. 2009.

Scopes, R. K. Protein purification: Principles and practice. New York: Springer Verlag. 1994. 382 p.

Sgarbieri, V. C. Proteínas em alimentos protéicos - Propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela LTDA. 1996

Shah, M. e J. A. Caruso. Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: Recent trends in phosphorus speciation. Journal of Separation Science, v.28, n.15, Oct, p.1969-1984. 2005.

Shiowatana, J., S. Purawatt, *et al.* Enhancement effect study of some organic acids on the calcium availability of vegetables: Application of the dynamic in vitro simulated

gastrointestinal digestion method with continuous-flow dialysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.24, Nov, p.9010-9016. 2006.

Siloto, R. C. Especiação de cobre e zinco em água de coco e a influência do processo de pasteurização sobre essas espécies. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Silverthorn, D. U., W. C. Ober, *et al.* Fisiologia Humana - Uma abordagem integrada. São Paulo: Editora Manole. 2003. 820 p.

Skoog, D. A., F. J. Holler, *et al.* Princípios de análise instrumental. Porto alegre: Editora Bookman. 2002. 1055 p.

Skoog, D. A., D. M. West, *et al.* Fundamentos de Química Analítica. São Paulo: Pioneira Thomson. 2006. 1040 p.

Slavin, W., D. C. Manning, *et al.* The stabilized temperature platform furnace. Atomic Spectroscopy, n.2, p.137-143. 1981.

Sze-Tao, K. W. C. e S. K. Sathe. Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.80, n.9, Jul, p.1393-1401. 2000.

Teixeira, L. S. G., J. F. Brasileiro, *et al.* Simultaneous spectrophotometric determination of iron and copper using ferriin reagents. Quimica Nova, v.29, n.4, Jul-Aug, p.741-745. 2006.

Uriano, G. A. Standard Reference Material 1572 (Citrus Leaves). Washington D. C.: NIST. 1982 (National Bureau of Standards Certificate of Analysis)

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

Venkatachalam, M. e S. K. Sathe. Chemical composition of selected edible nut seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.13, Jun, p.4705-4714. 2006.

Vonderheide, A. P., K. Wrobel, *et al.* Characterization of selenium species in brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, n.20, Sep, p.5722-5728. 2002.

Wakeling, L. T., R. L. Mason, *et al.* Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koh] grown in Australia. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, n.3, Mar, p.1277-1281. 2001.

Watzke, H. J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. Trends in Food Science & Technology, v.9, n.8-9, p.320-327. 1998.

Welna, M., M. Klimpel, *et al.* Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. Food Chemistry, v.111, n.4, Dec, p.1012-1015. 2008.

Wienk, K. J. H., J. J. M. Marx, *et al.* The concept of iron bioavailability and its assessment. European Journal of Nutrition, v.38, n.2, Apr, p.51-75. 1999.

Wilson, C. J., D. Apiyo, *et al.* Role of cofactors in metalloprotein folding. Quarterly Reviews of Biophysics, v.37, n.3-4, Aug-Nov, p.285-314. 2004.

Wu, C. Handbook of size exclusion chromatography. New York: Marcel Dekker Inc., v.91. 1995. 702 p. (Chromatographic Science Series)

Wuilloud, R. G., S. S. Kannamkumarath, *et al.* Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.379, n.3, Jun, p.495-503. 2004.

7. SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Angerson Nogueira do Nascimento

e-mail: angerson@gmail.com

Local e data de nascimento: Suzano, 26 de setembro de 1979

Formação Acadêmica e Titulação

- 2007 Doutorado em Química (Química Analítica)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
Título: Especificação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju (*Anacardium Occidentale*)
Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)
- 2004 – 2006 Mestrado em Química (Química Analítica)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
Título: Explorando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica para a determinação simultânea de As, Co e Se em produtos petrolíferos
Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)
- 2004 – 2006 Licenciatura em Química
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
- 2000 – 2003 Bacharelado em Química
Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil
- 1995 – 1998 Técnico em Química
E. E. P. S. G. Dr. Washington Luís, Mogi das Cruzes, Brasil

Atuação profissional

Universidade de São Paulo

Atividades

02/2005 – 06/2005 Estágio supervisionado em docência junto à disciplina Princípios de Análise Química, ministrada aos alunos de graduação do curso de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

02/2001 – 12/2003 Estágio de iniciação científica no Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) sob a orientação do Prof. Dr. Sérgio Antônio Spinola Machado do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) localizado em São Carlos, SP (Bolsista FAPESP)

Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA)

Atividades

01/2006 – 01/2007 Participação no projeto de instalação e desenvolvimento de procedimentos analíticos para a Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) localizado na cidade de Manaus, AM

Premios e Títulos

2009 Prêmio de melhor pôster, I Encontro da Pós Graduação do Instituto de Química – USP, Universidade de São Paulo

2008 Prêmio de destaque entre os painéis apresentados, XI Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Nascimento, A. N., J. Naozuka, *et al.* Closed-vessel microwave-assisted digestion using a diluted oxidant mixture for trace element determination in petrochemical samples by axially-viewed ICP OES. Brazilian Journal of Analytical Chemistry, v.03, p.131-135. 2011.
2. Naozuka, J., E. C. Vieira, *et al.* Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. Food Chemistry, v.124, n.4, Feb, p.1667-1672. 2011.
3. De Souza, A. P. R., A. S. Lima, *et al.* The use of a gold disc microelectrode for the determination of copper in human sweat. Talanta, v.83, n.1, Nov, p.167-170. 2010.
4. Nascimento, A. N., J. Naozuka, *et al.* In vitro evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by off-line coupled SEC-UV and SIMAAS. Microchemical Journal, v.96, n.1, p.58-63. 2010.
5. Munoz, R. A. A., P. R. M. Correia, *et al.* Electroanalysis of crude oil and petroleum-based fuel for trace metals: evaluation of different microwave-assisted sample decompositions and stripping techniques. Energy & Fuels, v.21, n.1, p.295-302. 2006.

Produção Bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. Pittcon Conference & Expo 2011. Analysis of copper and iron associated to protein using SEC-UV-SIMAAS. 2011. (Congresso).
2. 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Determinação elementar em polpa de graviola por ICP OES. 2011. (Congresso).

3. Pittsburgh Conference (Pittcon 2010).Evaluation of Iron Bioavailability in Presence of Lignin. 2010. (Congresso).
4. II Encontro da Pós Graduação do Instituto de Química - USP.Avaliação da biodisponibilidade e perfil de distribuição de Cu, Fe e proteínas em amostras de castanha de caju por SEC-UV-SIMAA. 2010. (Congresso).
5. 2 Encontro Brasileiro sobre Especiação Química (EspeQ Brasil 2010).Determinação de Cu e Fe em extratos protéicos de polpa de graviola por GF AAS. 2010. (Congresso).
6. II Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP.Determinação simultânea de Al, B, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn em polpa de graviola por ICP OES. 2010. (Congresso).
7. 2 Encontro Brasileiro sobre Especiação Química (EspeQ Brasil 2010).Especiação química de Fe em amostras de castanha submetidas à digestão gastrointestinal simulada. 2010. (Congresso).
8. Congresso Analítica Latin America.Análise elementar em produtos petroquímicos empregando digestão ácida assistida por micro-ondas. 2009. (Congresso).
9. 15 Encontro Nacional de Química Analítica.Avaliação da biodisponibilidade de Cu e Fe em mesocarpo de Babaçu. 2009. (Congresso).
10. International Symposium on Metallomics.Evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts. 2009. (Congresso).
11. I Encontro da Pós Graduação do Instituto de Química - USP.Extração de metaloproteínas de Cu, Fe e Zn em castanha de caju. 2009. (Congresso).
12. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences.Evaluatiation fo Copper and Iron Bioavailability in Babassu Mesocarp. 2009. (Congresso).

13. XI Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos. Avaliação da Biodisponibilidade de Cu e Zn em Amostras de Castanha de Caju. 2008. (Congresso).
14. 1º Encontro Brasileiro sobre Especiação Química. Avaliação da Biodisponibilidade de Cu, Fe, Mn e Se ligados à proteínas de castanha do Pará e amêndoa de babaçu. 2008. (Congresso).
15. Pittcon Conference and Expo 2008. Cu, Fe and Zn in Protein Fractions of Cashew-Nut by Solid-Liquid Extractions and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. 2008. (Congresso).
16. 14 Encontro Nacional de Química Analítica. Determinação Simultânea de As, Co e Se por ETAAS em Óleo Residual e Petróleo via Amostragem Direta de Emulsão. 2007. (Congresso).
17. 14 Encontro Nacional de Química Analítica. Digestão de Amostras Petroquímicas Usando Mistura Oxidante Diluída para Determinação de Elementos por ICP-OES. 2007. (Congresso).
18. 14 Encontro Nacional de Química Analítica. Extração em Ponto Nuvem para a Determinação de Cu, Fe e Ni em Materiais Vegetais por FAAS. 2007. (Congresso).
19. 14 Encontro Nacional de Química Analítica. Determinação de Minerais e Fracionamento de Se-Proteínas na Amêndoa e no Mesocarpo de Coco Babaçu. 2007. (Congresso).
20. 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Avaliação da Distribuição de Metais em Folhas de Copaífera Multijuga por Extração Sequencial e Detecção por ICP-MS. 2007. (Congresso).
21. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Determinação Simultânea de As, Co e Se em gasolina por Espectrometria de Absorção Atômica com

Atomização Eletrotérmica. 2005. (Congresso).

22. 13º Encontro Nacional de Química Analítica. Especificação de fósforo em plantas empregando diferentes procedimentos de preparo de amostras e sistema de análise em fluxo monossegmentado. 2005. (Congresso).
23. 26 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Estudo da Eletro-Oxidação de Etanol sobre Eletrodos de Ni, Co e Ni-Co. 2003. (Congresso).
24. 11 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Determinação Eletroanalítica de Etanol em Aguardentes Utilizando Ultramicroeletrodo de Ni. 2003. (Simpósio).
25. 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Estudo da Oxidação Eletroquímica do Etanol sobre Eletrodos de Ni e Co. 2002. (Congresso).