

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO E FRACIONAMENTO DE BÁRIO EM
CASTANHA-DO-PARÁ**

Alexandra Mary Gonçalves*

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE
EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G625df

Gonçalves, Alexandra Mary.

Determinação e fracionamento de bário em castanha-do-Pará / Alexandra Mary Gonçalves. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Química analítica. 2. Castanha-do-Pará. 3. Bário. 4. Fracionamento. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

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

Albert Einstein

*Dedico este trabalho à minha
filhinha amada Ane Caroline.
Aos meus familiares que
apoiaram e incentivaram a
minha caminhada.
À minha inesquecível mãe
Marli (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela contínua presença em minha vida. Por ser fonte de luz, proteção e força nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Joaquim A. Nóbrega pela sua preciosa orientação, compreensão, paciência, confiança, apoio e amizade. Pelos valiosos ensinamentos e conselhos.

Ao Prof. Dr. Eduardo F. A. Neves (in memoriam) por ter gerado a idéia inicial deste trabalho e colaborado para a sua realização. Por ter contribuído com seus ensinamentos e sugestões.

À Profa. Dra. Ana Rita A. Nogueira e Prof. Dr. Edenir R. P. Filho pela amizade, apoio e sugestões no decorrer do trabalho.

Ao Prof. Éder T. G. Cavalheiro e Luiz Ramos pela colaboração com a análise térmica.

À Kelly pela amizade, apoio experimental e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Lilian pela amizade, bom convívio e sugestões.

A todos os amigos que colaboraram indiretamente para a realização deste trabalho, ajudando a cuidar carinhosamente de minha pequena Ane.

Aos amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA): Adriana, Allen, Amália, Andréa Oliveira, Bia, Caio, Carla, Carol, Dani, Eveline, Fernanda, Gilberto, Guto, Kelber, Mário, Marquinho, Rodolfo, Silmara, Silvéria, Silvia, Simone, Telma e Wladiana e aos amigos que já fizeram parte do GAIA: Andréa, Cláudia, Clésia, Edivan, Edilene, Fabiana, Kelly, Lilian e Sherlan pelas sugestões e boa convivência.

À minha filha amada Aninha pelo amor, carinho, companheirismo, descontração e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus pais Marli (in memoriam) e Osvaldo pelos valores e ensinamentos depositados nas fases iniciais de minha vida.

Aos meus irmãos Alexsandro e Leônadas, primos e tios pela convivência.

À minha avó Maria e tia Tereza pelo carinho, apoio e auxílio.

Ao Marquinho pelos bons momentos.

Aos meus vizinhos Andréia, Luiz e Mel pela amizade, presença agradável e apoio.

A todos os funcionários da UFSCar, em especial às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química: Ariane, Cristina e Luciani.

Ao CCDM e Embrapa, onde parte do trabalho foi desenvolvida.

À Coordenação de Auxílio à Pesquisa CAPES pela bolsa concedida.

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

Minha eterna gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
OES	Espectrometria de emissão óptica
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
ICP OES AXIAL	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial
LMW	Compostos de baixa massa molecular
HMW	Compostos de alta massa molecular
ICRP	International Commission for Radiation Protection
AAN	Análise por ativação neutrônica
PGM	Metais do grupo da platina
STPF	Stabilized temperature platform furnace
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
IgE	Imunoglobulina E
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com um espectrômetro de massa-massa de triplo quadrupolo com uma interface de ionização por electrospray
IC-ICP-MS	Cromatografia de troca iônica acoplada à espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
ES-MS	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
DAN	2,3 - diaminonaftaleno
HG	Geração de hidretos
UV	Ultravioleta
DMAs	Dimetilarsênio
MMAAs	Monometilarsênio
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
TG	Termogravimetria
DTA	Análise térmica diferencial
PFA	Perfluoralcóxi
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo
SBR	Razão sinal analítico / sinal de fundo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação

WHO World Health Organization

DNA Ácido desoxirribonucleico

RNA Ácido ribonucleico

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 -	Parâmetros operacionais do ICP OES AXIAL.....	41
TABELA 4.2 -	Programa de aquecimento utilizado no forno de microondas.....	43
TABELA 4.3 -	Programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de bário.....	48
TABELA 4.4 -	Programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de selênio.....	49
TABELA 5.1 -	Teores médios de bário determinados em castanha-do-Pará por GFAAS.....	55
TABELA 5.2 -	Teores médios de bário determinados em castanha-do-Pará por ICP OES com configuração axial.....	57
TABELA 5.3 -	Teores médios de selênio determinados em castanha-do-Pará por GFAAS.....	59
TABELA 5.4 -	Teores médios de cálcio, magnésio, fósforo e enxofre determinados por ICP OES com configuração axial.....	61
TABELA 5.5 -	Teores médios de bário, enxofre e selênio em mg/kg nas diferentes frações da extração seqüencial com base na solubilidade.....	65
TABELA 5.6 -	Percentual em massa lipídico e protéico para as amostras de castanha-do-Pará.....	72

TABELA 5.7 -	Teores médios de bário, enxofre e selênio em mg/kg nas diferentes frações da extração sequencial com base na composição química.....	76
TABELA 5.8 -	Massas determinadas de bário e enxofre na fração LMW e massa estequiométrica de enxofre necessária para reagir com bário formando o respectivo sal de sulfato.....	79
TABELA 5.9 -	Massas determinadas de enxofre e bário nas frações 2 e 3, respectivamente, e massa estequiométrica de enxofre necessária para reagir com bário formando o respectivo sal de sulfato.....	80
TABELA 5.10 -	Teores médios de bário, enxofre e selênio em mg/kg para os diferentes procedimentos de preparo de amostra.....	82
TABELA 5.11 -	Teores elementares obtidos nas diferentes frações dos procedimentos de fracionamento.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Planta nativa de castanheira-do-Pará.....	18
FIGURA 2.2	Frutos da castanheira-do-Pará: A – ouriço aberto; B – ouriço fechado e castanhas com casca; C – castanhas sem casca..	19
FIGURA 4.1	Esquema do procedimento de extração com água.....	44
FIGURA 4.2	Esquema do procedimento de extração em meio alcalino	45
FIGURA 4.3	Esquema do procedimento de dissolução do resíduo 2	45
FIGURA 4.4	Esquema do procedimento de extração lipídica	46
FIGURA 4.5	Esquema do procedimento de extração de LMW	47
FIGURA 4.6	Esquema do procedimento de extração protéica	47
FIGURA 5.1	Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Ba 80 $\mu\text{g/L}$ em meio HNO_3 0,1% (v/v)	53
FIGURA 5.2	Curva analítica de calibração para Ba em meio do branco do digerido para GFAAS	54
FIGURA 5.3	Curva analítica de calibração para Ba por ICP OES	56
FIGURA 5.4	Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Se 30 $\mu\text{g/L}$ em meio HNO_3 0,1% (v/v) com modificador químico Pd 1000 $\mu\text{g/L}$	58
FIGURA 5.5	Processos e equilíbrios químicos envolvidos no fracionamento com base na solubilidade	63

FIGURA 5.6	Distribuição percentual para o fracionamento baseado na solubilidade (amostra 3)	66
FIGURA 5.7	Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para a amostra 1	67
FIGURA 5.8	Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 1 obtido após extração com água	68
FIGURA 5.9	Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 3 obtido após dissolução do resíduo 2	68
FIGURA 5.10	Curvas TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 2 obtido após extração em meio alcalino e carbonato de bário puro	69
FIGURA 5.11	Combinação das curvas TG para a amostra, resíduos obtidos no fracionamento com base na solubilidade e carbonato de bário puro	70
FIGURA 5.12	Distribuição percentual para o fracionamento baseado na composição química (amostra 3)	77
FIGURA 5.13	Equações indicando a presença dos íons sulfato e bário nas frações 2 e 3	80

RESUMO

DETERMINAÇÃO E FRACIONAMENTO DE BÁRIO EM CASTANHA-DO-PARÁ

Este trabalho envolve o emprego de técnicas espectroanalíticas, *i.e.* espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial (ICP OES), para a determinação e fracionamento de bário em castanha-do-Pará. Esse alimento é amplamente apreciado tanto pelo valor nutricional quanto pelo sabor agradável. Por ser rico em gorduras e proteínas representa uma matriz complexa e de difícil análise. Buscou-se o conhecimento da forma química em que bário se encontra na castanha-do-Pará, devido à toxicidade desse elemento e a dependência do modo pelo qual é absorvido pelo organismo com a sua forma química. Os teores totais de bário nas amostras de castanha-do-Pará variaram entre 860 e 2084 mg/kg. As determinações em diferentes frações obtidas por intermédio de extrações sequenciais com base na solubilidade e composição química envolvendo lipídios, proteínas e compostos de baixa massa molecular (LMW) foram efetuadas por ICP OES. Maiores teores de bário foram determinados nas frações LMW e insolúvel, que variaram entre 778 e 1606 mg/kg e 551 e 1520 mg/kg, respectivamente, indicando a indisponibilidade desse elemento ao organismo humano. Cálculos estequiométricos para as possíveis reações envolvidas indicaram uma relação direta entre bário e enxofre na fração de compostos LMW, possibilitando inferir que bário se encontra na forma de BaSO_4 . Essa suposição também foi confirmada por experimentos termogravimétricos.

ABSTRACT

DETERMINATION AND FRACTIONATION OF BARIUM IN BRAZIL NUTS

In this work it was studied the determination and fractionation of barium in Brazil nuts employing several strategies for sample preparation and spectroanalytical techniques, *i.e.* graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial view (ICP OES). Brazil nuts is a widely consumed food due to its nutritional value and good taste. The chemical analysis of Brazil nuts is not trivial due to its complex matrix. The fractionation of barium in Brazil nuts was studied owing to the toxicity of this element and the strong correlation between chemical form and absorption. The total content of barium varied from 860 to 2084 mg/kg. Sequential extractions were performed based on solubility in different media and also lipids, proteins and low molecular weight fractions (LMW). Barium was determined in all extracts by ICP OES. The highest contents of barium were determined in the LMW and insoluble fractions with 778 to 1606 and 551 to 1520 mg/kg, respectively. As expected, these results indicate the unavailability of this element in this food for humans. Based on the contents of barium and sulfur in different fractions and stoichiometric calculations it was possible to infer that barium occurs in the BaSO₄ form. The presence of this chemical form was also confirmed by thermogravimetric experiments.

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
2 – Revisão Bibliográfica	7
2.1 - Aspectos relacionados ao comportamento químico de bário.....	8
2.2 - Determinação de bário: desempenho de técnicas espectroanalíticas..	10
2.2.1 - Espectrometria de absorção atômica	11
2.2.2 - Espectrometria de emissão óptica	16
2.3 - Castanha-do-Pará: características e especiação química.....	18
2.3.1 - Aspectos relacionados à planta e região produtora.....	18
2.3.2 - Composição química e aspectos nutricionais.....	21
2.3.2.1 - Teores totais.....	27
2.3.2.2 - Especiação química.....	33
2.3.3 - Perspectivas.....	36
3 – Objetivo	37
4 – Parte Experimental	39
4.1 - Instrumentação	40
4.2 - Reagentes e soluções.....	41
4.3 - Amostras.....	42
4.4 - Descontaminação dos materiais.....	42
4.5 - Procedimentos.....	42
4.5.1 - Teores totais.....	43
4.5.2 - Extração seqüencial com base na solubilidade.....	44
4.5.3 - Extração seqüencial: lipídios, proteínas e compostos de baixa massa molecular.....	46
4.5.4 - Determinação elementar.....	48
5 – Resultados e Discussão	51
5.1 - Análise elementar total.....	52
5.1.1 - Determinação de bário.....	52

5.1.2 - Determinação de selênio.....	57
5.1.3 - Determinação de enxofre.....	59
5.2 - Fracionamento de bário com base na solubilidade.....	61
5.3 - Fracionamento de bário com base na composição química.....	70
5.4 - Cálculos com base na estequiometria.....	78
5.5 - Avaliação dos teores totais.....	81
5.6 - Relação entre os teores elementares obtidos para as frações dos diferentes procedimentos.....	83
6 – Conclusões	85
7 – Referências Bibliográficas	89

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre os elementos essenciais e tóxicos presentes nos alimentos vem adquirindo importância vital, bem como a forma química em que estão presentes. Estudos mostram que a biodisponibilidade de elementos e os modos em que são armazenados no corpo dependem de sua forma química¹.

Nesse contexto, a especiação desempenha um papel fundamental, representando um processo importante para a identificação de formas químicas nas quais um elemento está presente nos alimentos, incluindo aspectos relevantes, tais como o estado de oxidação e a formação de complexos estáveis com outros constituintes².

A análise e especiação de amostras biológicas normalmente requerem um tratamento adequado, uma vez que a matriz pode interferir consideravelmente na técnica de determinação e as espécies de interesse provavelmente estarão presentes em baixas concentrações, podendo apresentar baixa estabilidade³. Raramente os alimentos são analisados sem um pré-tratamento, que pode envolver processos de digestão, pré-concentração de traços e remoção de interferentes⁴.

A espectrometria de absorção atômica (AAS) tem sido aplicada para determinar quantitativamente elementos químicos, não somente em amostras alimentícias, mas também em amostras ambientais. Essa técnica envolve a geração de vapor atômico a partir da amostra utilizando geralmente chamas e atomizadores eletrotérmicos.

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é seletiva e rápida, sendo uma técnica frequentemente usada para a determinação elementar. Considerando-se a simplicidade, a atomização em chama é superior a todos os outros métodos de atomização desenvolvidos para medidas de absorção atômica com introdução de amostras líquidas.

Entretanto, em termos de sensibilidade outros métodos são consideravelmente melhores. Entre esses, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) oferece a vantagem de proporcionar alta sensibilidade para baixos volumes de amostra. Os atomizadores eletrotérmicos proporcionam um aumento na sensibilidade devido à eficiente atomização da amostra sob altas temperaturas e ao maior tempo de residência dos átomos no caminho óptico. Além disso, a alíquota de amostra selecionada é totalmente transferida para o atomizador⁵.

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) também é amplamente empregada para análises de amostras biológicas. Em geral, proporciona maior sensibilidade que a FAAS, além de ser uma técnica multielementar e simultânea⁶.

Todas essas técnicas podem ser aplicadas para a análise de castanha-do-Pará desde que sejam adotados procedimentos adequados para a conversão do sólido em uma solução representativa, uma vez que esse alimento representa uma matriz bastante complexa.

A castanha-do-Pará é uma fonte rica de nutrientes, principalmente proteínas, gorduras, vitaminas, minerais e fibras. É um alimento genuinamente brasileiro, nativo da região norte do país, também conhecido como castanha-do-Brasil.

Dentre os efeitos benéficos à saúde humana, destaca-se a ação anticarcinogênica⁷. A ação desse alimento contra a formação de tumores tem sido investigada e esse efeito parece relacionado aos elevados teores de selênio, presente principalmente na forma de selenometionina e também associado a compostos de baixa massa molecular⁸.

O selênio apresenta características essenciais quando presente em baixas concentrações ou tóxicas se estiver presente em altas concentrações, sendo que a diferença em concentração entre a essencialidade e a toxicidade é pequena⁹. Além da anticarcinogenicidade, possui propriedade antioxidante e

antagônica a alguns elementos tóxicos como mercúrio e cádmio¹⁰. CHEN et al. associaram a deficiência de Se à doença de Keshan, que ocorreu na China em 1935, envolvendo cardiomiopatia endêmica¹¹.

Além desse elemento com ocorrência pouco usual em alimentos, a castanha-do-Pará contém altos teores de bário, um metal alcalino terroso que não existe na natureza em sua forma elementar, mas ocorre como um cátion divalente em combinação com outros elementos¹². O bário possui várias aplicações industriais e seus sais solúveis são tóxicos, sendo que em concentrações elevadas pode causar estímulos musculares intensos acarretando vômitos, hemorragia, paralisia, parada cardíaca e até mesmo a morte¹³. A dose letal para humanos é de 3 a 4 g, dependendo do gênero e massa corporal do indivíduo¹⁴. Devido à toxicidade desse elemento, pronunciada na forma solúvel biodisponível, torna-se relevante estabelecer a espécie em que se encontra presente na castanha-do-Pará, uma vez que esse é um alimento amplamente consumido. Como o modo de absorção no intestino e movimentos subseqüentes dentro do organismo são dependentes da forma química, as informações sobre especiação podem ser usadas para prever e interpretar como o elemento em questão é metabolizado.

A determinação de Ba quando presente em baixas concentrações pode ser feita por GFAAS. Contudo, em amostras de castanha-do-Pará esse elemento apresenta altos teores, sendo eventualmente possível o emprego de FAAS. Contudo, ambas as técnicas apresentam algumas limitações para a determinação de Ba. Em FAAS há formação de óxidos termicamente estáveis que são apenas parcialmente dissociados em chama ar-acetileno. Esse efeito pode ser minimizado mediante o emprego de chama óxido nitroso-acetileno. Entretanto, usando-se essa chama o bário é ionizado em 80 a 90 %. Por outro lado, usando-se GFAAS ocorre a formação de carbeto refratários e também uma interferência ocasionada pela emissão de radiação do tubo de grafite. Assim, a qualidade do grafite pirolítico é de fundamental importância e

temperaturas de atomização demasiadamente altas devem ser evitadas⁵. Finalmente, a técnica de ICP OES proporciona sensibilidade superior à FAAS para a maioria dos elementos, podendo ser utilizada para avaliar a exatidão dos teores obtidos.

A análise da castanha-do-Pará é dificultada pela sua composição química complexa, tipicamente contendo de 50 a 70 % de lipídios, 10 a 20 % de proteínas e 10 a 20 % de carboidratos. A determinação elementar pode ser efetuada na fração total ou nas diferentes frações de lipídios, compostos de baixa massa molecular (LMW) e proteínas.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Aspectos relacionados ao comportamento químico de bário

Bário é um metal alcalino terroso que ocorre em torno de 0,05 % na crosta terrestre. Não existe na natureza na forma elementar, mas ocorre como um cátion divalente em combinação com outros elementos, ou seja, como consequência de seu caráter não-nobre e alta reatividade somente ocorre na forma de compostos. Não é considerado essencial e pode apresentar toxicidade conforme a sua forma química¹².

Bário pode ser encontrado em insetos, peixes, água potável, alimentos e árvores de carvalho e nojeira. O solo da região Amazônica é rico no mineral holandita ($Ba_2Mn_8O_{16}$), sendo que as plantas dessa região podem conter até cerca de 14 mg/kg de bário, entretanto a castanha-do-Pará contém até 4000 mg/kg, devido a capacidade de acumular esse metal¹⁰.

O tempo de permanência de bário nos compartimentos: ar, terra e água depende da forma em que é liberado. Os compostos de bário com baixa solubilidade em água, como sulfato de bário, podem permanecer por um longo tempo no ambiente. Contudo, aqueles com maior solubilidade usualmente não permanecem por muito tempo^{10, 13}.

O metal bário possui várias aplicações industriais e seus sais solúveis ou facilmente solubilizados são tóxicos, como por exemplo, acetato, bromato, nitrato e sulfeto de bário. O acetato de bário é usado em óleos lubrificantes, gorduras e tinturas; o bromato, como inibidor da corrosão de ácidos; o carbonato, em cerâmicas, tintas, esmaltes, na indústria de substitutos para o mármore, borracha, papéis, eletrodos e vidros ópticos e também em venenos para ratos; os sais de clorato e cromato são usados como pigmentos e na indústria de fogos de artifício. O mineral de bário mais importante é a barita ($BaSO_4$). O sulfato de bário é utilizado em aplicações médicas, como contraste

em exames de raios X, sendo matéria-prima do medicamento Celobar, caracterizado pela extrema insolubilidade (4,13 mg/L a 100 °C em H₂O). Quando quimicamente puro esse sal não é tóxico para os humanos. Já o cloreto de bário, que é solúvel (375 g/L em H₂O a 26 °C) foi previamente usado como estimulante cardíaco, mas tem sido abandonado devido à sua toxicidade. O uso de depilatórios contendo sulfeto de bário é arriscado, pois o bário pode ser absorvido rapidamente pela pele caso existam fissuras^{13, 14}.

No ano de 2003 ocorreram casos de morte por intoxicação com a ingestão do medicamento Celobar. Nessa ocasião o laboratório fabricante realizou a síntese de sulfato de bário a partir do carbonato de bário também insolúvel em água, porém essa substância se dissolve facilmente em meio ácido. O caso ainda não foi bem esclarecido, sendo que mediante uma coletânea de informações acredita-se que houve falta do conhecimento em estequiometria e processos de precipitação. Foi constatada a presença de cerca de 13 % em massa de carbonato de bário no produto final, indicando a síntese incompleta da matéria-prima, resultando na biodisponibilidade de bário ao organismo e conseqüente toxicidade¹⁵. O bário solúvel pode ser rapidamente absorvido pela corrente sanguínea^{9, 16}.

O bário pode penetrar no corpo oralmente ou pelas vias respiratórias. Também pode ser absorvido quando há contato direto da pele com compostos de bário. O bário que entra no corpo é removido principalmente pelas fezes em alguns dias, também é excretado em menor quantidade pela urina. A quantidade de bário que permanece no organismo é acumulada nos ossos e dentes, cerca de 91 % do metal pode se concentrar nos ossos. Resultados de estudos experimentais com animais indicam que a razão e extensão de absorção de bário pelas vias respiratórias dependem do nível de exposição, da concentração que alcança o espaço alveolar e da solubilidade de sua forma química. Quanto à exposição oral, bário é pouco absorvido pela região gastrointestinal. A ICRP (do inglês: International Commission for Radiation

Protection) estima que a absorção gastrointestinal de bário é menor que 5 %. Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o nível máximo de bário em águas para consumo humano não deve ultrapassar 1,0 mg/L, sendo que a dose letal para humanos é de 3 a 4 g^{14, 17}. Adotando-se uma dose na qual não se observa um efeito adverso de 0,21 mg de bário/kg de massa corporal por dia em humanos, uma ingestão diária tolerável de 0,02 mg de bário/kg de massa corpórea foi determinada¹². Um estudo envolvendo a absorção e excreção de bário por humanos que ingeriram castanha-do-Pará constatou que somente um total de 9,9 % foi excretado pelas fezes e urina, possibilitando inferir que a maior porção tenha sido absorvida. No entanto, não há efeitos tóxicos com a ingestão desse alimento, havendo assim a necessidade de maiores informações quanto à extensão da deposição de bário nos ossos e tecidos humanos¹⁰.

A ação sistemática de bário é caracterizada por vários estímulos intensos de músculos. Vômitos, cólicas fortes, diarreia e hemorragia resultam da ação sobre a musculatura gastrointestinal. Tremores musculares são freqüentes e pode ocorrer paralisia, desordens motoras incluindo imobilidade de membros e tronco. A hipertensão devido aos espasmos da musculatura das artérias é freqüente e os músculos respiratórios podem ser paralisados. Também pode ocorrer irritação estomacal, parada cardíaca e até mesmo morte em alguns casos. Embora bário seja tóxico, não há evidências de ação carcinogênica¹³.

2.2 - Determinação de bário: desempenho de técnicas espectroanalíticas

A determinação de bário pode ser conduzida por diferentes métodos. Esse metal pode ser isolado por precipitação como sulfato ou cromato. No método de cromato o precipitado é dissolvido em ácido e a coloração comparada com a de uma solução de cromato de bário. No entanto, esse método

não é seletivo, pois chumbo e estrôncio apresentam comportamento semelhante. A aplicação de métodos instrumentais é mais adequada e quantitativa, principalmente quando baixas concentrações devem ser determinadas¹³.

As técnicas espectroanalíticas são empregadas com confiabilidade para a determinação de bário em amostras biológicas e ambientais. A análise por ativação neutrônica (NAA) também pode ser empregada, porém apresenta menor disponibilidade e sensibilidade. Essa técnica baseia-se na irradiação da amostra em um reator nuclear e conseqüente decaimento radioativo pelos radionuclídeos gerados. Apresenta um caráter não destrutivo, porém tem alto custo. As principais dificuldades são relacionadas à freqüente indisponibilidade de um reator nuclear, além dos riscos por exposição à radiação nuclear¹⁴.

2.2.1 - Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) tem sido amplamente aplicada para determinação quantitativa de elementos químicos em amostras biológicas. Essa técnica envolve a geração de vapor atômico a partir da amostra utilizando geralmente chamas e atomizadores eletrotérmicos.

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é freqüentemente usada considerando-se a simplicidade, o baixo custo do equipamento e a versatilidade na atomização de elementos com diferentes comportamentos termoquímicos. Basicamente, a solução da amostra é convertida em um aerossol no sistema de introdução de amostras composto por nebulizador e câmara de nebulização, o solvente é evaporado na chama e os íons em solução são convertidos em seus átomos. A radiação da lâmpada de catodo oco passa através da chama sendo parcialmente absorvida pela nuvem de átomos no caminho óptico. Para gerar as freqüências específicas da radiação que são absorvidas pelo analito, as lâmpadas de catodo oco possuem um catodo feito do mesmo elemento. Quando esse é bombardeado com os íons energéticos de Ne^+

ou Ar^+ , os átomos do catodo são disponibilizados se a energia cinética for superior à energia do retículo cristalino. Choques posteriores promovem a excitação dos átomos e conseqüente processo de emissão de radiação em comprimentos de onda bem definidos. A amostra é aspirada pelo nebulizador pneumático por ação da rápida vazão de oxidante que passa próximo ao capilar da amostra, formando um aerossol, que por sua vez é direcionado em alta velocidade contra anteparos mecânicos e as gotas são quebradas em partículas menores, processo denominado como nebulização. As gotículas líquidas com maior diâmetro são coletadas na câmara de nebulização e retiradas por um dreno. O aerossol que atinge a chama contém somente cerca de 5 % da amostra inicial. A técnica de FAAS apresenta algumas desvantagens, tais como a necessidade de volumes relativamente elevados de amostra, a dificuldade para atomização direta de amostras sólidas e altos limites de detecção. No entanto, há as vantagens do curto tempo de análise, baixo custo e reduzidas interferências químicas comparativamente à atomização eletrotérmica^{5, 6}. A determinação de bário pode ser realizada por FAAS, com um limite de detecção de 500 $\mu\text{g/L}$ para a linha de ressonância de 553,6 nm. Esse elemento forma óxidos termicamente estáveis que são apenas parcialmente dissociados em chama ar-acetileno. Exibe dessa forma uma sensibilidade relativamente baixa, numerosas interferências de volatilização de soluto e fase-vapor, que são reduzidas com o emprego da chama óxido nitroso-acetileno. A intensa emissão dessa chama, próximo à linha de bário, pode ocasionar interferências e um considerável ruído, que pode ser solucionado com o aumento da corrente da lâmpada e reduzindo a resolução espectral. Bário é ionizado em 80-90 % na chama óxido nitroso-acetileno. Essa interferência de ionização pode ser controlada pela adição de sais alcalinos (cloreto de potássio ou outro metal que seja facilmente ionizado) às amostras e soluções analíticas de calibração^{5, 13}. Além disso, o espectro molecular de espécies de cálcio pode causar problemas, quando esse elemento se encontra em

altas concentrações, o que normalmente ocorre em materiais biológicos e ambientais¹⁸.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) proporciona vantagens analíticas relevantes comparada com FAAS quanto à sensibilidade mesmo empregando-se menor volume de amostra. A técnica consiste em aquecimento resistivo de um forno tubular, o tubo de grafite com dimensões de 3-5 cm de comprimento e 3-8 mm de diâmetro, que por sua vez é aberto dos dois lados e tem um orifício central para introdução da amostra. Promove-se um fluxo de gás inerte, geralmente Ar, durante as etapas de aquecimento com exceção da etapa de atomização. O fluxo externo de gás evita a entrada de ar no tubo e conseqüente incineração. Por outro lado, o gás inerte introduzido internamente flui através das duas extremidades em direção ao orifício central para eliminar o ar no interior do tubo e transportar os vapores gerados pelo aquecimento gradual da amostra. O tubo é geralmente revestido com uma camada de grafite pirolítico, com baixa permeabilidade e alta resistência ao ataque químico. Essa superfície proporciona aumento na sensibilidade, evita a perda do vapor atômico e formação de carbetos. O programa de aquecimento envolve etapas de secagem, pirólise e atomização sob temperaturas apropriadas. Em uma primeira etapa o forno é programado para secar a amostra evaporando o solvente. Na etapa da pirólise promove-se a destruição da matéria orgânica e a remoção de compostos voláteis da matriz. Após a pirólise, o analito é atomizado sob temperaturas entre 2000 e 3000 °C por cerca de 5 s. A absorvância atinge o valor máximo e diminui à medida que a nuvem atômica é dissipada. O sinal analítico é a absorvância integrada em função do tempo durante a etapa de atomização. Normalmente a temperatura do forno é aumentada até 2400-2800 °C durante aproximadamente 3 s para a eliminação de resíduos. Finalmente, promove-se o resfriamento do tubo de grafite à temperatura ambiente para inserção de nova alíquota de amostra interrompendo-se o fornecimento de corrente elétrica e usando-se

fluxos de água e gás inerte ao redor do forno e tubo, respectivamente. Geralmente o desempenho do forno é melhorado utilizando-se uma plataforma de L'vov, que é aquecida pela radiação emitida pela parede do forno. Assim, o aumento de temperatura é retardado durante o aquecimento e o analito é volatilizado em um ambiente com melhor isotermicidade, o que reduz interferências causadas por processos de recombinação e condensação^{5, 6}. O uso de modificador químico também contribui para um melhor desempenho da técnica, promovendo a separação térmica entre o analito e os concomitantes durante a etapa de pirólise. Durante essa etapa, geralmente o analito é termicamente estabilizado e a matriz removida por volatilização, reduzindo-se interferências matriciais e sinal de fundo durante a atomização. Contudo, técnicas de correção de fundo são indispensáveis para uma boa precisão. Os modificadores químicos mais usuais são metais do grupo da platina (PGM) e nitrato de magnésio, sendo que a mistura composta por nitrato de paládio e nitrato de magnésio foi proposta como modificador universal¹⁹.

Na determinação de bário por GFAAS ocorrem algumas interferências, tais como a emissão de radiação do tubo de grafite e formação de carbetos refratários. Assim, temperaturas de atomização demasiadamente altas devem ser evitadas para minimizar a emissão de radiação do tubo. Outro problema é que a lâmpada de deutério se caracteriza por baixa intensidade de emissão no comprimento de onda de bário e, conseqüentemente, não pode ser usada para correção de fundo. Dessa forma, se faz necessário a correção de fundo baseada no efeito Zeeman. Em atomizadores aquecidos longitudinalmente, bário pode ser determinado satisfatoriamente somente pela atomização a partir da parede do tubo, requerendo uma temperatura de atomização de 2550 °C e proporcionando uma massa característica de 6,5 pg⁵. Entretanto, em atomizador aquecido transversalmente, bário pode ser determinado sob as condições STPF (do inglês stabilized temperature platform

furnace), requerendo uma temperatura de 2300 °C para a atomização a partir da plataforma. Contudo, a massa característica obtida é relativamente alta (15 pg).

Como bário forma carbetos relativamente estáveis, a qualidade do grafite pirolítico é de fundamental importância. Na ausência de modificadores a temperatura máxima de pirólise pode ser de 1200 °C. Os modificadores têm sido aplicados para melhorar a separação de matriz ou para suprimir a formação de carbetos, que dificultam a determinação de bário e diminuem a sensibilidade⁵.

O modificador químico irídio é termicamente e quimicamente estável, conseqüentemente é aplicável em análises de rotina. É um modificador químico eficiente para bário, pois o irídio é um elemento refratário, com alto ponto de fusão (2410 °C) e ebulição (4527 °C), suportando, dessa forma, a alta temperatura necessária para a atomização de bário. Além disso, comparativamente ao paládio, usualmente considerado um modificador universal, proporciona melhor retenção na superfície grafítica²⁰.

Na determinação de bário em amostras de água, o EDTA foi utilizado como modificador químico em um atomizador eletrotérmico com filamento de tungstênio para minimizar as interferências causadas por Ca, contudo quantidades excessivas do modificador afetam a superfície do filamento devido à formação gradativa de carbetos. Utilizou-se como gás de purga a mistura contendo 90 % Ar + 10 % H₂ devido a melhor eficiência sobre a atomização de bário. Isso ocorre porque óxidos e monohidróxidos de bário são reduzidos pelo hidrogênio e, assim, o oxigênio é removido e os átomos de bário são liberados²¹.

Foi desenvolvido um procedimento analítico para a determinação de bário em águas a partir da superfície grafítica modificada com irídio, adição de (NH₄)₂HPO₄ como modificador químico e uso de uma mistura de 90 % Ar + 10 % H₂ como gás de purga. A modificação foi feita termicamente por sucessivas injeções de solução contendo 1000 mg/L de irídio no interior do tubo de grafite. As medidas foram feitas no comprimento de onda de 553,6 nm e

resolução espectral de 0,8 nm. A vazão do gás de purga durante as etapas de aquecimento foi mantida em 1,0 L/min, sendo interrompida na atomização. A sensibilidade obtida para bário utilizando-se a mistura de 90 % Ar + 10 % H₂ foi duas vezes maior quando comparada àquela obtida na presença de 100% Ar^{22, 23}.

2.2.2 - Espectrometria de emissão óptica

A espectrometria de emissão óptica (OES) também pode ser aplicada para medidas de bário em diferentes tipos de amostra. Nessa técnica são gerados espectros eletromagnéticos nas regiões do ultravioleta e visível a partir de transições eletrônicas em átomos e íons excitados. Na espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) o plasma fornece energia suficientemente alta para promover a excitação da maioria dos elementos e mede-se a intensidade da radiação emitida em comprimentos de onda específicos, correspondendo à concentração do analito de interesse. A capacidade multielementar e simultânea são grandes atrativos dessa técnica.

O plasma induzido foi introduzido em análises espectrométricas de emissão a partir da década de 1960, sendo que os primeiros equipamentos comerciais de ICP OES foram disponibilizados em meados de 1970. O plasma é um gás parcialmente ionizado no qual co-existem íons e elétrons em movimento. É gerado pela passagem de um fluxo de argônio por uma tocha de quartzo, sendo que a descarga elétrica de uma bobina de Tesla promove o início da ionização do gás. Assim, em uma bobina de indução um campo eletromagnético alternado de alta rádio-freqüência proporciona colisões entre elétrons e átomos gerando alta energia que é transferida para o gás, formando o plasma. Essa conversão de energia cinética em energia térmica possibilita a formação de um plasma estável sob temperaturas entre 6000 e 10000 K⁶.

A introdução da amostra é realizada por um processo de nebulização, sendo que somente cerca de 5 % do aerossol formado atinge o

plasma. Na tocha ocorrem processos de dessolvatação, vaporização, atomização, excitação e ionização. Os processos de atomização e excitação dos átomos geram espectros atômicos, ao passo que a ionização e excitação da espécie iônica geram espectros iônicos^{24, 25}.

A técnica de ICP OES é relativamente sensível para a determinação de bário em amostras biológicas, sendo que foram obtidos limites de detecção de 0,25 mg/L em urina, 0,60 mg/L em sangue e 0,50 mg/kg em ossos²⁶. A linha de emissão mais sensível é a iônica em 455,50 nm. Uma das desvantagens em ICP OES é a susceptibilidade às interferências espectrais. Compostos de boro, como ácido bórico e borato de sódio podem interferir nos espectros de emissão de bário na linha de 455,50 nm^{14, 25}.

Em um trabalho sobre a aplicabilidade de ICP OES para a determinação de elementos traço em amostras ambientais, foi avaliado o comportamento de bário, dentre outros elementos, utilizando-se plasma tanto com configuração axial quanto com radial. Os limites de detecção mais baixos foram obtidos com configuração axial, os valores para bário em meio de HNO₃ 5 % (v/v) sob condições otimizadas foram 0,002 a 0,32 ng/mL. A metodologia desenvolvida foi aplicada para os materiais de referência certificados de água, sedimentos marinhos e folhas de maçã, sendo que foram obtidos resultados concordantes com os certificados²⁷.

Um estudo desenvolvido sobre a planta *Sempervivum tectorum* L. (Crassulaceae), que apresenta propriedades antiinflamatórias, visou examinar mudanças metabólicas de elementos tóxicos e não essenciais, como o bário, no fígado de ratos submetidos a um tratamento com o extrato da planta. As determinações foram efetuadas por ICP OES, foram detectadas quantidades significativas de bário e alumínio no extrato, no entanto não foi observado acúmulo desses elementos no organismo²⁸.

2.3 - Castanha-do-Pará: Características e Especificação Química

2.3.1 – Aspectos relacionados à planta e região produtora

A castanheira-do-Pará, também conhecida como castanheira-do-Brasil, cujo nome científico é *Bertholletia excelsa* H. B. K. pertencente à família Lecythidaceae, é uma planta nativa da região Amazônica. Possui um fruto contendo amêndoas saborosas e altamente nutritivas, sendo que sua madeira é valiosa. Seu cultivo e extrativismo são importantes considerando-se as condições sócio-econômicas da região, tendo um alto índice de exportação e amplo consumo pela população local.

A castanheira-do-Pará atinge até 50 m de altura e 2 m de diâmetro (Fig. 2.1)²⁹, seu fruto é chamado de ouriço, uma cápsula de formato esférico com casca dura e lenhosa, que por sua vez pode conter de 15 a 24 sementes (Fig. 2.2). Cada amêndoa possui comprimento de 3 a 5 cm e apresenta coloração branca à amarelada com uma película marrom sobre a superfície. Esse alimento não ocorre somente no norte do Brasil, mas também na Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guianas^{30, 31}.



FIGURA 2.1 – Planta nativa de castanheira-do-Pará²⁹



FIGURA 2.2 – Frutos da castanheira-do-Pará: A – ouriço aberto; B – ouriço fechado e castanhas com casca; C – castanhas sem casca.

A floresta primária dessa espécie, localizada no denominado Polígono dos Castanhais na região sul do estado do Pará, ocupa uma vasta área devido ao grande porte das árvores, porém tem sido reduzida expressivamente devido a substituição por pastagens. Em decorrência disso foi incluída na “Lista Oficial de Espécies da Floresta Brasileira Ameaçadas de Extinção”²⁹. O extrativismo é outro fator que também representa uma ameaça às plantas nativas, participando significativamente na produção brasileira destinada à exportação. Saliente-se ainda que há um cultivo racional não expressivo em algumas regiões³².

Estudos diversos enfocaram aspectos direcionados às diferentes partes da planta de castanha-do-Pará, tais como as folhas, cascas, amêndoas e óleo.

Normalmente as folhas das plantas são recobertas por uma fina camada de cera, desempenhando papel biológico importante nas relações entre a

planta e seu habitat. Um estudo avaliou a ocorrência dos compostos de cadeia longa formadores da cera epidérmica em extratos de diversas plantas da Amazônia, inclusive castanha-do-Pará. Verificou-se que as espécies continham grande diversidade de classes de compostos de massa molecular elevada, diferindo na quantidade e funcionalidade química. Foi detectada a presença de ésteres graxos saturados, terpênicos e tocoferol em todas as plantas, sendo que nas castanheiras foram mais evidenciadas as características triterpênicas. Esses compostos conferem algumas ações benéficas às plantas, como defesa contra insetos, animais herbívoros e fungos patogênicos, atração de agentes polinizadores e interações com os gases atmosféricos. Além dos triterpênicos, constatou-se a presença de diterpênicos como os fitóis e tocoferóis, com ações protetivas contra os danos causados pela radiação ultravioleta, radicais livres e agentes químicos³³.

Grande quantidade da castanha-do-Pará é exportada para os Estados Unidos e Europa. Normalmente as cascas são retiradas antes das castanhas serem exportadas, gerando elevada quantidade de resíduos. Com a finalidade de reduzi-los foi avaliado um procedimento de pirólise para conversão das cascas em carbono ativado. Os principais constituintes das cascas são lignina e holocelulose, que por sua vez consiste na mistura de celulose e hemicelulose³⁴.

As sementes da castanha-do-Pará contêm altas quantidades de óleo. As castanhas quebradas, consideradas inadequadas para a comercialização, são normalmente destinadas à produção de óleo vegetal por meio de um mecanismo de prensagem. Após a extração do óleo, ainda podem ser utilizadas na indústria alimentícia para a obtenção de um extrato contendo o denominado leite e concentrado de proteínas. O óleo obtido é composto por uma mistura complexa de triglicerídeos, além de ácidos graxos, monoglicerídeos, diglicerídeos e outros em menores concentrações, tais como tocoferóis, carotenóides e esteróis. O maior percentual dos ácidos graxos corresponde aos insaturados, os ácidos linoléico e oléico. A extração supercrítica com dióxido de carbono foi indicada

como método alternativo para obter o subproduto da castanha-do-Pará sem óleo. A partir da avaliação da fase equilíbrio óleo castanha/dióxido de carbono, notou-se que houve uma baixa solubilidade do óleo na fase vapor do dióxido de carbono, possivelmente devido à presença dos ácidos graxos insaturados^{35, 36}.

O óleo obtido da castanha-do-Pará é bastante instável em decorrência da alta concentração de ácidos graxos, tornando-se assim importante o uso de agentes antioxidantes para sua maior conservação³².

As sementes oleaginosas são susceptíveis à fungos, sendo necessário um controle da umidade dos frutos a fim de evitar a proliferação de aflatoxinas, que são formadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*³⁷. Essas toxinas já foram encontradas na castanha-do-Pará e em outros alimentos, tais como amendoim, milho e soja. As castanhas são contaminadas geralmente pela quebra da superfície de sua casca^{38,39}, comprometendo o consumo e comercialização pois um total de 90 % do seu extrativismo se destina à exportação para os Estados Unidos, Inglaterra e Alemanha³².

2.3.2 – Composição química e aspectos nutricionais

A castanha-do-Pará é uma fonte rica de nutrientes e contém proteínas, gorduras, vitaminas, minerais e fibras. Representa uma matriz complexa, cuja composição química é de 50-70 % de lipídios, 10-20 % de proteínas e 10-20 % de carboidratos⁸. Além disso, o ácido fólico se encontra presente nas castanhas em geral, sendo que um consumo de 100 g proporciona cerca de 16 % da ingestão diária recomendada (400 µg/d), o equivalente a 0,64 µg/g. Esse composto é recomendado como um suplemento no início da gestação reduzindo a incidência de defeito no tubo neural dos bebês. A sua deficiência pode ser associada à complicações nessa fase, como o aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, além de contribuir para a ocorrência da anemia megaloblástica.

As castanhas contêm fitoesteróis e outros compostos fitoquímicos, tais como flavonóides, fenóis, luteolina e tocotrienóis, os quais oferecem importantes contribuições à saúde. Há evidências de que a presença dos flavonóides têm uma relação direta com os efeitos cardioprotetivos, ao passo que os compostos fenólicos e as luteolinas reduzem o teor de colesterol e têm potencial capacidade antioxidante. No entanto, as concentrações desses constituintes nas castanhas são pouco conhecidas^{40, 41}. A prevenção de doenças cardiovasculares também pode ser associada à presença de vitamina E, sendo que a castanha-do-Pará contém α -, β - e γ -tocoferóis possibilitando uma ingestão balanceada dessa vitamina. A concentração estimada desses compostos é de 70 mg/kg.

Estudos direcionados à redução de colesterol mostram resultados positivos mediante a inclusão de castanha em uma dieta bem controlada. Castanha-do-Pará tem um percentual apreciável de fibras, sendo que as fibras solúveis têm se mostrado eficientes para a redução de colesterol em ação conjunta com os compostos fenólicos^{41,42}. Plantas ricas em fibras como as castanhas podem viabilizar o controle da concentração de glicose no sangue, reduzindo as quantidades de insulina requeridas no tratamento de diabéticos⁴³.

Apesar de conter altos teores lipídicos, não é evidenciado o aumento de massa corpórea com um consumo controlado desse alimento, podendo ser até mesmo incorporado com sucesso em dietas alimentares. MCMANUS et al. relataram que indivíduos obesos adeptos de uma dieta para redução de massa baseada em ingestão de teores moderados de gorduras proveniente de diversos tipos de castanhas obtiveram melhores resultados em relação àqueles que dispuseram de uma dieta baseada em baixo teor de gorduras⁴⁴. As possíveis razões pelas quais o consumo de castanhas não se associa a um aumento do índice de massa corpórea envolvem um aumento da taxa do metabolismo humano e incompleta absorção da energia proveniente desse alimento, que por sua vez é facilmente consumida, devido ao alto valor

proteico e de gorduras insaturadas, ocorrendo uma menor deposição de gordura total⁴⁵. A castanha-do-Pará contém em torno de 66 % de lipídios, dos quais apenas 26 % são ácidos graxos saturados, enquanto que os percentuais de monoinsaturados e poliinsaturados são de 36 e 38 %, respectivamente⁴⁶.

A castanha-do-Pará gera diversos benefícios à saúde humana, apresentando principalmente propriedades anticarcinogênicas. Sua ação contra a formação de tumores tem sido investigada, IP e LISK demonstraram que a inclusão desse alimento em dietas para ratos, previamente dopados com um composto cancerígeno, contribuiu para uma redução dos tumores em até 72,7%⁷. Esse efeito parece estar relacionado aos elevados teores de selênio, presente principalmente na forma de selenometionina, e aos compostos de baixa massa molecular⁸.

A má nutrição proteica é um problema comum de saúde. Uma significativa fonte de proteínas na alimentação da população em geral provém dos legumes. No entanto, entre os alimentos proteicos, a castanha-do-Pará é um dos mais ricos em proteínas, apresentando grande quantidade de aminoácidos contendo enxofre, particularmente a metionina e a cisteína (ca. 380 e 130 mg/g, correspondendo a 18 e 8 %, respectivamente), contribuindo para o seu alto valor nutricional^{47,48}.

As proteínas da castanha-do-Pará contêm altos níveis de selênio, sendo que há uma ampla literatura sobre esse elemento. Um estudo desenvolvido por KANNAMKUMARATH et al. constatou que a espécie primária da estrutura proteica contendo selênio é a selenometionina, que representa uma forma biodisponível⁴⁹. A determinação de selenometionina foi baseada no uso de ácido metanossulfônico para a hidrólise proteica em substituição à hidrólise enzimática, proporcionando melhores condições para a análise⁵⁰. Outros trabalhos também concluíram que a espécie majoritária é selenometionina. De acordo com CHUNHIENG et al., as proteínas ocorrem em três famílias na castanha-do-Pará, *i.e.* albuminas, globulinas e glutelinas. A

família das albuminas contém a maior quantidade de selênio, presente principalmente na forma de selenometionina e selenocisteína⁵¹. A fração proteica de albuminas também contém níveis consideráveis de Cu, Fe e Mn. Esses elementos ocorrem em menores concentrações nas globulinas e glutelinas, exceto o Mn que ocorre em maior teor nas glutelinas. Contudo, esses elementos não estão associados somente às proteínas⁵².

Uma possível alternativa para o uso de castanha-do-Pará em indústrias alimentícias é o isolamento das frações proteicas a partir do alimento sem a presença do óleo. RAMOS e BORA propuseram o isolamento da fração proteica das globulinas e avaliaram as suas propriedades funcionais, tais como solubilidade, viscosidade, absorção de água e emulsificação. Constatou-se que as globulinas da castanha-do-Pará possuem uma capacidade mais alta de absorção de água do que a própria fruta. Além disso, foi observado que o perfil da atividade de emulsificação foi similar ao da solubilidade, indicando uma possível dependência dessa propriedade com a solubilidade das proteínas, sendo que ambas foram influenciadas pelo pH do meio, apresentando maior capacidade em pH 3. Tais características são favoráveis para aplicações em indústria alimentícia, sendo que a alta solubilidade das globulinas da castanha-do-Pará em pH abaixo de 4 proporciona um bom potencial para o uso no preparo de bebidas de alto valor proteico, ao passo que a boa capacidade de absorção de água é sugestiva para o uso no preparo de massas para bolos, macarrão e pão. Já a atividade emulsificante é aplicável na formulação de emulsões alimentares⁵³.

As proteínas totais podem ser classificadas quanto ao tamanho em 11S, 7S e 2S, sendo que os coeficientes de sedimentação S de aproximadamente 7 e 11 normalmente correspondem às globulinas, ao passo que 2S é relacionada às albuminas, sendo compostas por 2 polipeptídeos de baixa massa molecular, solúveis em água. Essa fração contém elevadas concentrações dos aminoácidos sulfurosos, metionina e cisteína, considerados essenciais^{54,55}.

As albuminas 2S têm sido descritas como causadoras de alergias na ingestão de algumas plantas, incluindo também a castanha-do-Pará. Os primeiros casos de alergia devido à ingestão desse alimento ocorreram em 1983. O efeito alérgico pode se dar pela estabilidade no trato gastrointestinal, bem como pelas propriedades intrínsecas alergênicas^{48,56}. O diagnóstico de alergia pela ingestão desse alimento é feito com base na história e no tempo de reação, que provavelmente deve ser espontânea, com uma confirmação a partir da medida de soro específico IgE (imunoglobulina E), dentre outros⁵⁷. A estrutura das albuminas 2S, conhecidas por “Ber e 1”, contém resíduos de cisteína que formam ligações de dissulfeto, contribuindo para a sua estabilidade⁵⁸.

Devido ao alto conteúdo de metioninas nas proteínas 2S da castanha-do-Pará, essa planta foi considerada atrativa para aumentar o valor nutricional de plantas deficientes em aminoácidos sulfurosos essenciais, por meio de atividades transgênicas. Assim, o acúmulo de seus genes em batatas foi avaliado e os níveis observados foram condizentes com aqueles esperados. Também foram desenvolvidos estudos para proporcionar um aumento no valor nutricional da soja, baseando-se na introdução de um gene da castanha-do-Pará, promovendo o aumento dos níveis de proteínas contendo enxofre e reduzindo a presença de enzimas inibidoras. Contudo, as propriedades alergênicas das proteínas 2S também são pronunciadas na soja transgênica, bem como nas batatas⁵⁹⁻⁶¹.

A castanha-do-Pará apresenta um aroma característico proveniente da presença de componentes aromáticos voláteis. Alcanos, nona-2,4-dienal, hexanal e benzaldeído foram detectados após extração por destilação e determinação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa. Dentre esses o hexanal desempenha um papel importante no odor da castanha-do-Pará, embora seu aroma não seja exclusivamente proveniente desse composto, mas sim de um efeito combinado dos componentes presentes⁶².

As castanhas também contêm oxalatos solúveis e insolúveis. A castanha-do-Pará apresenta níveis maiores para os oxalatos solúveis, que pode contribuir negativamente em indivíduos que têm tendência para o desenvolvimento de cálculo renal. Dessa forma, pessoas com essa propensão devem ingeri-las moderadamente. Investigações recomendam a ingestão de alimentos que contenham cálcio, pois ele se combina com os oxalatos solúveis no intestino, tornando-os indisponíveis ao organismo humano⁶³.

A composição química de diversas castanhas, tais como amêndoas, amendoim, avelã, castanha-do-Pará, castanha de caju, pistache e nozes, tem sido investigada avaliando-se a umidade, lipídios totais, ácidos graxos, proteínas, cinzas, açúcar, taninos, fitatos e atividade inibitória enzimática. A castanha-do-Pará foi estudada considerando-se esses diversos componentes. O teor lipídico foi de 67 %, caracterizando-se como parte do grupo que contém os maiores percentuais. O conteúdo de açúcar nas castanhas varia consideravelmente conforme as condições de armazenamento, maturidade, cultivo e região. Para a castanha-do-Pará o valor de 0,69 % foi relativamente baixo. Todas as castanhas contêm predominantemente ácidos graxos insaturados. Para a castanha-do-Pará os percentuais foram de 25, 29 e 46 % correspondente aos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados respectivamente. O teor proteico foi de aproximadamente 14 %, sendo que os aminoácidos hidrofóbicos foram mais pronunciados⁶⁴.

Dessa forma, constata-se que a castanha-do-Pará apresenta uma composição química bastante diversificada e rica, contribuindo expressivamente para uma boa nutrição e saúde humana.

2.3.2.1 – Teores totais

A castanha-do-Pará é uma fonte expressiva de elementos químicos. Além do selênio, outros elementos com características relevantes à saúde humana se encontram em quantidades apreciáveis, tais como o arsênio, bário, cálcio, magnésio, manganês, molibdênio e zinco. A análise da composição inorgânica é importante considerando-se aspectos nutricionais e toxicológicos.

Ainda há uma carência de informações sobre a presença de uma forma inorgânica de selênio nesse alimento. VONDERHEIDE et al. caracterizaram as espécies de selênio por meio das técnicas HPLC-ICP-MS e ES-MS mostrando que outras espécies contendo esse elemento estão presentes, além dos aminoácidos previamente estudados, sendo que a identificação dessas espécies não foi elucidada. Nos experimentos realizados com a adição de analito, não foi obtida a recuperação de selenito, levando a postular que a forma Se (IV) foi reduzida a seleneto (Se^{2-}) ou à sua forma elementar, após a extração com ácido clorídrico⁶⁵. Na determinação de selênio conduzida por fluorescência atômica aplicou-se um procedimento de derivatização de selenito com um agente derivatizante DAN (2,3- diaminonaftaleno), assumindo-se que há presença de Se (VI) na amostra. Dessa forma, foi promovida a redução dessa espécie a Se (IV) com adição de ácido clorídrico e resultados coerentes foram obtidos⁶⁶.

A concentração total de selênio em castanha-do-Pará varia conforme a sua procedência em um intervalo de 0,20 a 253 mg/kg⁶⁷. Um trabalho sobre a determinação desse elemento em castanhas proveniente de duas regiões do Brasil demonstrou que as castanhas da região compreendida entre Acre e Rondônia apresentam um intervalo em concentração de 0,03 a 31,7 mg/kg, já entre Manaus e Belém esse intervalo foi de 1,25 a 512 mg/kg, sendo que 162 amostras foram analisadas em ambos os casos. Amostras provenientes de Manaus e Belém foram compradas sem a casca e da outra região com casca.

Tais condições refletem o fato de que geralmente a concentração desse elemento varia conforme o solo e de árvore para árvore⁶⁸.

O selênio apresenta características essenciais ou tóxicas, conforme a concentração em que se encontra, sendo que a diferença de concentração entre os efeitos é pequena. Um consumo de alimentos contendo menos de 0,1 µg/g desse elemento resulta em deficiência, ao passo que o consumo regular daqueles contendo mais do que 1 µg/g pode resultar em toxicidade, conforme a quantidade ingerida⁶⁹. A dose diária recomendada é de 70 e 55 µg, para homens com 70 kg e mulheres com 60 kg de massa corpórea, respectivamente. A deficiência pode resultar na doença de Keshan, que foi registrada pela primeira vez em 1935, na cidade de Keshan situada na zona rural da China. Os sintomas incluem degeneração dos músculos, tais como necrose multifocal e fibrose no miocárdio, cardiomegalia, isquemia do miocárdio, eletrocardiograma anormal e edema pulmonar^{10,40}. Além das propriedades antiinflamatórias e anticarcinogênicas, apresenta características antioxidantes decorrentes principalmente da espécie selenometionina e uma correlação com outras substâncias, tais como vitamina E, sulfato e metais pesados. A vitamina E e selênio possuem funções antioxidantes semelhantes e o requerimento desse elemento em dietas é diretamente dependente do nível ingerido da vitamina. Sulfato e selenato apresentam similaridade química e existe um antagonismo biológico entre esses íons, sendo que a presença de sulfato pode alterar significativamente o metabolismo de selenato e reduzir sua possível toxicidade. O selênio pode atuar como antagonista a metais tóxicos como Cd e Hg. Proporciona habilidade na prevenção da degeneração testicular induzida por cádmio provavelmente porque ocorre a formação de um complexo constituindo uma forma não tóxica de cádmio, sendo que uma dose em torno de 1,9 mg/kg de selênio é suficiente para a prevenção dos efeitos desse metal e redução da mortalidade pela ingestão de doses em torno de 4,9 a 7,4 mg/kg⁷⁰. Um estudo demonstrou que a inclusão de selenito em dietas para ratos reduziu a toxicidade

de cloreto mercúrico, além da eliminação da necrose renal decorrente da presença dessa espécie. Supõe-se que um antagonismo mútuo é ocasionado por meio de uma combinação entre selênio e mercúrio no sangue formando um complexo capaz de se associar com selenoproteínas, evitando seu armazenamento nos rins. Dessa forma, os efeitos tóxicos de mercúrio no organismo são reduzidos^{71,72}.

O conteúdo de cálcio na castanha-do-Pará é estimado em aproximadamente 1760 µg/g e a ingestão diária adequada desse elemento para adultos é em torno de 1,30 g. Esse elemento tem funções importantes no organismo, especialmente na formação dos ossos e também exercendo um efeito protetivo contra doenças como raquitismo e osteoporose. Já o magnésio apresenta uma concentração aproximada de 2400 µg/g e uma ingestão de 350 mg/dia é recomendada. A sua deficiência pode ocasionar um aumento da irritabilidade muscular, arritmias cardíacas, tetania e elevação da pressão sangüínea. O manganês se encontra em concentração em torno de 8 µg/g, sendo que uma ingestão diária adequada é de 1,8 a 2,3 mg. Esse mineral é considerado um nutriente essencial envolvido no metabolismo de aminoácidos, colesterol, carboidratos e na formação dos ossos, além de contribuir positivamente para as atividades enzimáticas. Também há presença de cerca de 0,3 µg/g de molibdênio, que por sua vez desempenha um papel importante como co-fator de enzimas do tipo sulfito oxidase, envolvidas no catabolismo de aminoácidos sulfurados. A ingestão recomendada é de 33 a 45 µg/dia e sua deficiência ocasiona danos neurológicos a recém-nascidos. A castanha-do-Pará também contém cerca de 17 e 45 µg/g de cobre e zinco, respectivamente. Ambos exercem importantes atividades enzimáticas, com ingestões recomendadas de 0,54 a 0,70 mg/dia para Cu e de 6,8 a 9,4 mg/dia para Zn⁴⁰. Há relatos de uma correlação entre a razão Zn/Cu e a incidência de doenças cardiovasculares, sendo que esses elementos foram detectados nos diferentes tipos de castanhas:

de caju, avelãs, amêndoas, pistache, amendoim e nozes, nas quais também foram encontrados os elementos cromo, ferro, alumínio, níquel e chumbo⁷³.

Informações sobre a associação de elementos essenciais e tóxicos com os diferentes compostos presentes em um determinado alimento são importantes para monitorar os benefícios ou riscos de sua ingestão. Um trabalho preliminar avaliou os perfis cromatográficos de magnésio, ferro, cobalto, molibdênio, prata, mercúrio e chumbo associados com frações de diferentes massas moleculares presentes na castanha-do-Pará utilizando-se diferentes procedimentos de extração em meios básico, ácido e água. Os perfis para os elementos foram diferentes em cada caso considerado, ou seja, compostos de baixa e alta massa molecular (LMW e HMW), conforme o meio empregado para a extração. Os elementos Co, Ag e Hg apresentaram similaridade nos perfis cromatográficos e foram extraídos mais eficientemente com NaOH indicando maior associação aos compostos de HMW. O chumbo demonstrou percentuais semelhantes na extração tanto em meio ácido quanto em meio básico, porém apresentou picos cromatográficos mais pronunciados na região de alta massa molecular. Os metais Mg e Fe estavam presentes em maiores teores, porém não foram extraídos com bom percentual para os diferentes meios. Assim, ficou evidente a associação dos elementos aos compostos de HMW¹.

O acesso a informações sobre a ingestão diária recomendada dos minerais é importante para a saúde e nutrição. Um estudo envolveu determinações de 18 elementos em diversos grupos de alimentos visando estabelecer uma estimativa da ingestão diária de pessoas de etnia japonesa. Dentre as categorias de alimentos, foram inclusas as castanhas, embora a espécie não tenha sido especificada. As medidas foram realizadas por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e ICP OES, sendo que os elementos determinados foram Ba, Ca, Cd, Cs, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Rb, Sr e Zn. A classe das castanhas apresentou altas concentrações de fósforo e magnésio, 2,44 e 1,25 mg/g, com ingestões diárias de 1,1 e 0,27 g

respectivamente. Essa categoria também apresentou altos teores quanto aos metais alcalinos, rubídio com 13 $\mu\text{g/g}$ e lítio com 0,710 $\mu\text{g/g}$. Dentre os metais alcalino terrosos, o bário foi encontrado em maior concentração nas castanhas (5,91 $\mu\text{g/g}$) em comparação a todas as outras categorias de alimentos, contribuindo para uma ingestão diária estimada de 0,54 mg. Vários outros elementos foram encontrados em concentrações relativamente altas, tais como zinco (29,1 $\mu\text{g/g}$), manganês (20,2 $\mu\text{g/g}$), cobre (5,45 $\mu\text{g/g}$), níquel (4,22 $\mu\text{g/g}$) e cobalto (43,3 $\mu\text{g/g}$). Assim, a classe de castanhas e sementes apresentou altas concentrações de vários elementos, contribuindo expressivamente à ingestão diária desses elementos⁷⁴.

É notável a presença de bário em teores elevados na castanha-do-Pará podendo atingir até 4000 $\mu\text{g/g}$. Esse elemento é um metal alcalino terroso que não existe na natureza em sua forma elementar, mas ocorre como um cátion divalente em combinação com outros elementos. Não é considerado essencial e dependendo de sua forma química pode apresentar toxicidade, que é pronunciada para sais solúveis^{11, 12}. Sendo assim, é necessário o entendimento da forma na qual bário se encontra na castanha-doPará. Além disso, poucos estudos avaliaram esse elemento nesse alimento.

A ocorrência desse elemento decorre da presença do minério Holandita ($\text{Ba}_2\text{Mn}_8\text{O}_{16}$) no solo⁶⁷. Estudos realizados sobre a deposição de bário no esqueleto de ratos alimentados com castanha-do-Pará, indicam que bário pode se disponibilizar nesse alimento em uma forma solúvel, similar ao cloreto de bário. Os sais solúveis de bário são rapidamente absorvidos pela corrente sanguínea. Esse metal pode se depositar nos ossos e ser facilmente excretado pelas fezes¹⁶.

O caso Celobar que causou mortes em 2003 de indivíduos passando por exames radiológicos devido a ingestão de medicamento à base de sulfato de bário pode ser explicado considerando-se esses aspectos químicos. O sulfato de bário pode ser empregado como matéria-prima devido à baixa solubilidade em

água. Porém, de forma equivocada sua síntese foi conduzida a partir do carbonato de bário, que também é insolúvel em água, mas que se dissolve facilmente em meio ácido. Dessa forma, a conversão incompleta da matéria-prima resultou na biodisponibilidade de bário no organismo causando drásticos efeitos tóxicos¹⁵.

O alto conteúdo de bário desperta interesse sobre os teores dos outros metais alcalino terrosos, sendo que esses também apresentaram valores consideráveis conforme SMITH, em uma investigação sobre a absorção de cálcio, estrôncio, bário e rádio pela planta⁷⁵. Há presença de ²²⁸Ra e ²²⁶Ra possivelmente devido a altos níveis no solo, conferindo uma certa radioatividade ao alimento, sendo que atividade para ²²⁶Ra medida foi de 29,6 a 205 Bq/kg. A quantidade de bário encontrada foi de 190 a 5890 mg/kg. O acúmulo de bário e rádio é ocasionado pela capacidade única da castanha-do-Pará em absorver esses metais, em comparação a outras plantas. Possivelmente ocorre um mecanismo especial nessa planta, sendo provável a formação de complexos orgânicos que aumentam a mobilidade dos íons alcalino terrosos, em especial bário e rádio, favorecendo o seu movimento e redistribuição durante o desenvolvimento dos frutos⁷⁵.

Um trabalho recente constatou uma surpreendente atividade de ²²⁸Th em castanha-do-Pará, mediante análise do alimento e de amostras de excreção seguidas do seu consumo. Os isótopos de tório ocorrem usualmente em indústrias nucleares. Esse radionuclídeo foi observado provavelmente em decorrência do decaimento de ²²⁸Ra com meia-vida de 5,76 anos, não sendo tão facilmente absorvido pelo intestino quanto o rádio, o que dificulta a medida de sua atividade na urina⁷⁶. Em 1968 foi reportada a atividade para ²²⁸Ra de 5,9 a 133 Bq/kg na castanha⁷⁷. No entanto, foi encontrado que esse elemento radioativo ingerido ao se alimentar com castanha-do-Pará não ficou retido no organismo⁷⁸. Dessa forma, não há implicações danosas em relação à radioatividade.

Considerando-se todos esses aspectos constata-se que há uma riqueza inestimável de nutrientes na castanha-do-Pará, sendo que particularmente o conteúdo mineral requer atenção quanto à biodisponibilidade, tanto no âmbito de essencialidade quanto de toxicidade. Estudos mostram que a biodisponibilidade de elementos e os modos em que são armazenados no corpo dependem de sua forma química¹.

2.3.2.2 – Especiação química

A especiação tem sido relevante para elucidação da forma química na qual um determinado elemento pode ser encontrado em uma matriz biológica. Esse aspecto auxilia a compreensão da absorção incompleta que geralmente ocorre para muitos minerais. Os processos relevantes envolvidos incluem estado de oxidação e a presença de complexos estáveis ou transientes com outros alimentos². O procedimento desenvolvido para a especiação química é fortemente dependente da natureza da amostra, do elemento de interesse, da precisão e exatidão almejadas⁷⁹.

Assim, o termo especiação tem sido usado para indicar estratégias analíticas visando a identificação de espécies químicas e medir sua distribuição em uma determinada amostra. O impacto de um determinado elemento não deve ser baseado somente na concentração total. Nesse âmbito, a prática de fracionamento tem sido realizada para identificar várias classes de espécies de um certo elemento, bem como suas concentrações em cada classe. Os processos envolvidos no fracionamento se fundamentam nas diferentes propriedades das espécies químicas, tais como tamanho, solubilidade, afinidade, estado de valência e hidrofobicidade⁸⁰.

A especiação de selênio em castanha-do-Pará tem sido explorada, devido a importância desse elemento e a alta concentração nesse alimento. Entre os trabalhos desenvolvidos nesse âmbito há uma revisão direcionada à

especiação de selênio em alimentos⁶⁹. A castanha-do-Pará foi selecionada para avaliar a possibilidade de produção de um material de referência para a especiação de compostos de selênio, por ser uma fonte natural. Esse alimento se mostrou um candidato adequado para a produção do material de referência considerando-se a confiabilidade dos resultados da determinação de selenometionina de acordo com dois diferentes testes de estabilidade. Diferentes materiais de referência da castanha-do-Pará podem ser produzidos, representando níveis de selênio distintos, considerando-se que os seus teores variam conforme o local de origem da castanha⁸¹. Métodos analíticos devem ser minuciosamente estabelecidos para a produção de materiais de referência certificados para especiação. Estratégias como extração, separação e análise por espectrometria de massa para compostos de selênio devem ser desenvolvidas.

Diferentes métodos empregando a hifenação de técnicas de separação e detecção têm sido propostos visando a especiação de selênio, como o uso de nebulização ultrassônica associado ao acoplamento com cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com detecção por ICP-MS, HPLC-ICP-MS e com ionização por electrospray HPLC-ESI-MS/MS⁸². Uma alternativa ao sistema de detecção é o emprego de ICP OES, embora a sensibilidade seja limitada para elementos presentes em baixas concentrações. Esse problema pode ser atenuado aplicando-se a geração de hidretos (HG) e a pré-concentração do analito. Assim, o uso de HPLC-UV-HG-ICP OES foi eficaz para a especiação de selênio, no qual alguns parâmetros foram avaliados, tais como tempo de exposição à radiação ultravioleta (UV) em uma câmara de foto-redução, condições adequadas para a geração de hidretos (solução redutora e vazão) e operação do ICP OES (potência aplicada pela fonte de rádio-freqüência, altura de observação e comprimento de onda)⁸³. A especiação de selênio em diferentes tipos de castanha, inclusive castanha-do-Pará, foi realizada por intermédio de seu fracionamento em lipídios, proteínas e compostos de baixa massa molecular (LMW) usando a hifenação das técnicas HPLC e ICP-MS. Os resultados obtidos

evidenciaram que a espécie selenometionina corresponde a cerca de 25 % do conteúdo total do elemento, enquanto que a fração LMW representa em torno de 5 %⁷. Estudo mais recente demonstrou que as espécies selenometionina e selenocisteína são facilmente absorvidas no trato gastrointestinal, onde foram empregadas as técnicas hífenadas de HPLC-ICP-MS e HPLC-ES-MS-MS, após digestão enzimática e gastrointestinal “in vitro”⁸⁴.

Para proporcionar a especiação de arsênio em diferentes tipos de castanhas foi empregada a cromatografia de íons acoplada ao ICP-MS (IC-ICP-MS). Em castanha-do-Pará foram detectadas as formas de As (III), dimetilarsênio (DMAs (V)), monometilarsênio (MMAs (V)) e As (V), sendo que as espécies em maior concentração são As (V) e As (III), 2,9 e 4,3 ng/g em média, respectivamente, para a fração de lipídios. Os níveis foram mais baixos para a amostra sem lipídios⁸⁵. A toxicidade de arsênio é dependente de sua forma química, sendo que os compostos trivalentes são geralmente mais tóxicos do que os pentavalentes por apresentarem maior afinidade de interações com grupos sulfidrilas de enzimas e proteínas, inibindo uma variedade de processos oxidativos intracelulares. Dentre as espécies de arsênio o gás arsina, AsH₃, é a que apresenta toxicidade mais severa. A dose letal para crianças é de 2 mg/kg, em adultos o intervalo é de 120 a 200 mg^{86,87}.

A especiação dos metais níquel, cobre, zinco e manganês também foi investigada. Os teores foram avaliados em diferentes meios, sendo classificados por tamanho molecular, uma vez que o meio ácido extrai seletivamente os compostos de baixa massa molecular. As análises foram conduzidas por SEC-UV-ICP-MS e constatou-se que todos os elementos estão associados principalmente aos compostos de alta massa molecular, como as proteínas⁸⁸.

Estudos mais detalhados sobre a especiação elementar em castanhas são necessários e promissores. Pode-se constatar na literatura que apenas o elemento selênio tem sido estudado de forma minuciosa.

2.3.3 – Perspectivas

Nesta revisão foram compilados alguns trabalhos relacionados à castanha-do-Pará possibilitando acesso à informações com diferentes visões e conteúdos. Além disso, buscou-se verificar os temas que podem ser mais explorados e esclarecidos.

Constatou-se que a castanha-do-Pará apresenta diversidade de composição química, proporcionando uma série de benefícios à saúde. Contudo, ainda há informações que devem ser investigadas visando uma caracterização mais completa desse rico alimento.

Foi relatado que as castanhas em geral contêm ácido fólico⁴¹. No entanto, não há dados detalhados quanto à concentração para as diversas castanhas, inclusive para a castanha-do-Pará. Seria interessante abordar esse assunto de um modo mais específico, uma vez que o ácido fólico desempenha um papel importante na saúde humana.

É possível buscar conhecimentos mais aprofundados em relação ao conteúdo mineral relevante tanto pela essencialidade quanto pela toxicidade. A castanha-do-Pará apresenta uma variedade de minerais de interesse nutricional e toxicológico. Entretanto, não basta estabelecer os teores totais, sendo também necessário gerar informações que possibilitem verificar a atividade de um determinado elemento no organismo com base na forma química na qual ocorre no alimento.

Além de aspectos químicos relacionados à planta, podem ser desenvolvidos estudos sobre a região produtora, contribuindo para um maior entendimento sobre a extensão da absorção de nutrientes pela planta.

Capítulo 3

OBJETIVO

3 - OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo a determinação e fracionamento de bário em castanha-do-Pará.

Assim, buscou-se estabelecer quais as classes dos compostos contendo bário e inferir sobre eventuais implicações relacionadas à saúde humana.

Desta forma, este trabalho avaliará a hipótese de que as espécies químicas de bário na castanha-do-Pará seriam selenato ou sulfato de bário, considerando-se a elevada concentração de selênio e de compostos contendo enxofre. Essa hipótese é condizente com a não toxicidade desse alimento.

Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 – Instrumentação

Os seguintes equipamentos e acessórios foram empregados:

- Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite GTA 100 (Varian, modelo 800) equipado com corretor Zeeman transversal, amostrador automático, tubos de grafite recobertos piroliticamente com aquecimento longitudinal (HGA Varian). Todas as medidas foram feitas em absorbância integrada (integração do sinal transiente de absorbância em função do tempo).
- Lâmpada de catodo oco de bário (corrente elétrica aplicada de 20 mA, resolução espectral de 1,0 nm e comprimento de onda de 553,6 nm) e ultra lâmpada de catodo oco de Se (corrente elétrica aplicada de 15 mA, resolução espectral de 0,2 nm e comprimento de onda de 196,0 nm).
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial (Vista AX, Varian, Melbourne, Austrália). Os parâmetros operacionais encontram-se na Tabela 4.1.
- Módulo termogravimétrico simultâneo TG/DTA SDT Q-600 (TA Instruments), controlado pelo software Thermal Advantage (v. 1.4).
- Forno de microondas com cavidade Milestone modelo Ethos 1600.
- Moinho criogênico SPEX CertiPrep modelo 6750 (Metuchen, NJ, EUA)
- Banho de ultra-som modelo USC 1400 (Unique, São Paulo, SP, Brasil)
- Chapa de aquecimento
- Freezer
- Centrífuga

TABELA 4.1 - Parâmetros operacionais do ICP OES AXIAL

Parâmetro	Descrição
Gerador de rádio-freqüência	40 MHz
Potência de rádio-freqüência aplicada	1,3 kW
Vazão do plasma de Ar	15,0 L/min
Vazão do gás auxiliar	1,5 L/min
Vazão do gás de nebulização	0,9 L/min
Vazão da amostra	0,9 mL/min
Nebulizador e Câmara de nebulização	Ranhura em V e Sturman-Masters
Elemento / Comprimento de onda (nm)	Ba II 233,527; Ba II 455,403 Ca I 393,370 Mg II 285,213 P I 213,618 S I 180,669 Se I 203,985

4.2 - Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes de alta pureza analítica, água purificada e desionizada por sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e ácido nítrico (Merck, Darmsdadt, Alemanha) purificado no sistema de sub-destilação (SubPur, Milestone, Sorisole, Itália).

As soluções analíticas de referência foram preparadas em meio 0,1% (v/v) HNO₃ a partir da diluição adequada das soluções estoque individuais contendo 1000 mg L⁻¹ de cada elemento (Spex Sample Preparation, Metuchen, NJ, EUA).

Além das soluções estoque e de referência de bário, cálcio, fósforo, magnésio, enxofre e selênio, foram utilizados: argônio, nitrogênio líquido,

cloreto de potássio, peróxido de hidrogênio, ácido perclórico, hidróxido de sódio, ácido fosfórico, ácido nítrico, acetona, hidrogenocarbonato de sódio, ácido clorídrico e mistura de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v). Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno descontaminados e mantidas sob refrigeração.

4.3 – Amostras

Castanhas-do-Pará foram compradas com e sem casca no comércio de quatro estados: Maranhão, Pará, Paraná e São Paulo. As amostras adquiridas no Pará tinham diferentes formas: sem casca industrializada, com casca sem processo de industrialização e dentro do ouriço.

4.4 - Descontaminação dos materiais

Os frascos de polietileno, vidrarias, copos do amostrador automático e as ponteiros das micropipetas foram lavados com água corrente, depois com água desionizada e, em seguida, foram imersos por 24 h em um banho com solução de 10 % (v/v) de HNO₃.

Posteriormente, esses materiais foram lavados com água desionizada (Milli-Q) e secos em capela de fluxo laminar.

4.5 – Procedimentos

Os distintos procedimentos de preparo de amostra foram empregados para a determinação de teores totais e em diferentes frações obtidas por extrações seqüenciais visando avaliação da solubilidade e composição química. Na extração seqüencial obtiveram-se as seguintes frações: lipídios,

compostos de baixa massa molecular (LMW) e proteínas, conforme procedimento proposto por KANNAMKUMARATH et al.⁸.

As amostras de castanha-do-Pará foram descascadas e pulverizadas em moinho criogênico usando recipiente imerso em nitrogênio líquido (SPEX), sendo que foi aplicado o seguinte programa com 3 ciclos: Etapa 1 - Pré-congelamento: 4 min; Etapa 2 – moagem: 2 min intercalados por ciclos de recongelamento de 2 min.

4.5.1 - Teores totais

Promoveu-se a digestão ácida assistida por radiação microondas conforme programa apresentado na Tabela 4.2, correspondente a 8 frascos reacionais de PFA, empregando 2 mL de HNO₃ e 3 mL de H₂O₂ concentrados para uma massa de amostra de 0,250 g aproximadamente. Os digeridos foram diluídos em balões volumétricos para um volume de 50 mL com água desionizada. O procedimento de digestão também foi conduzido empregando-se ácido diluído em uma concentração de 7 mol/L, porém com volumes de 3 mL da solução ácida e 2 mL de H₂O₂.

TABELA 4.2 - Programa de aquecimento utilizado no forno de microondas

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	3,0	300	120
2	1,0	0	120
3	6,0	500	210
4	5,0	650	240
5*	5,0	0	0

* ventilação

4.5.2 – Extração seqüencial com base na solubilidade

Este procedimento envolveu 3 etapas sucessivas, demonstrados abaixo de modo descritivo e ilustrativo:

Etapa 1 - Extração com água quente - (ca. 60°C por 30 min) proporciona a separação de compostos solúveis adicionando-se 10 mL de água desionizada a uma massa de 0,5 g da amostra. A mistura foi agitada por cerca de 2 min, centrifugada por 10 min à 4500 rpm e filtrada (Fig. 4.1).

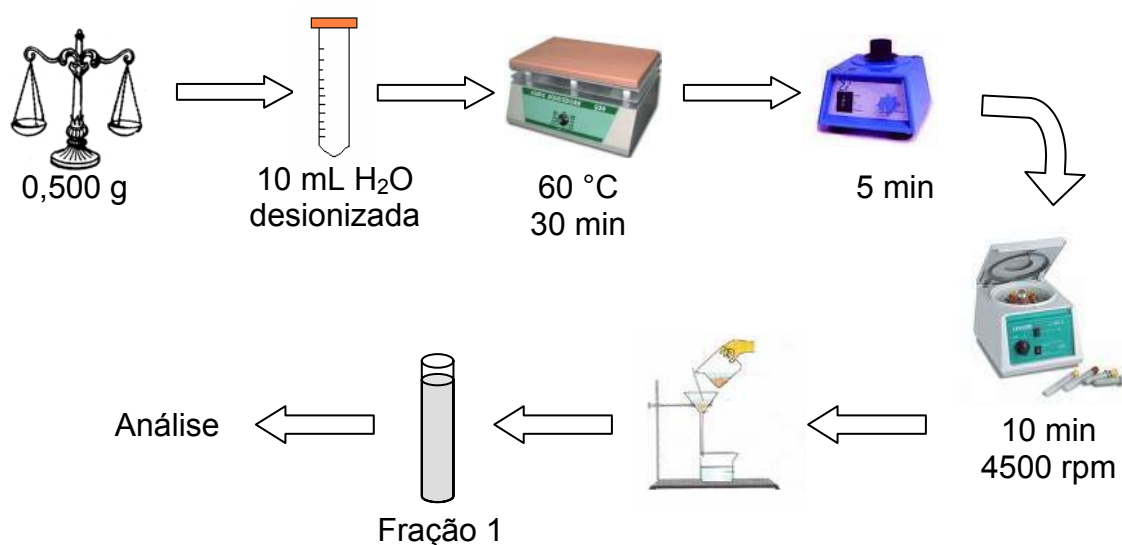
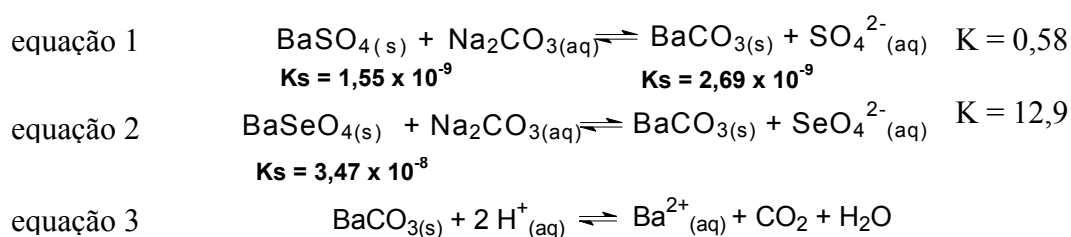


FIGURA 4.1 – Esquema do procedimento de extração com água

As etapas subseqüentes se baseiam nas reações de equilíbrio químico, envolvendo reações de metátese (dupla troca) representadas pelas equações 1 e 2 e dissolução em meio ácido representada pela equação 3. As constantes de equilíbrio combinadas foram calculadas a partir de constantes de equilíbrio de solubilidade⁸⁹.



Etapa 2 - Extração em meio alcalino - ao resíduo sólido foi adicionado Na_2CO_3 em excesso (0,3 g) e 5 mL de água com aquecimento por 15 min na temperatura de ca. 60°C , sendo que a mistura também passou pelos processos de agitação, centrifugação e filtração mencionados na etapa 1 (Fig. 4.2).

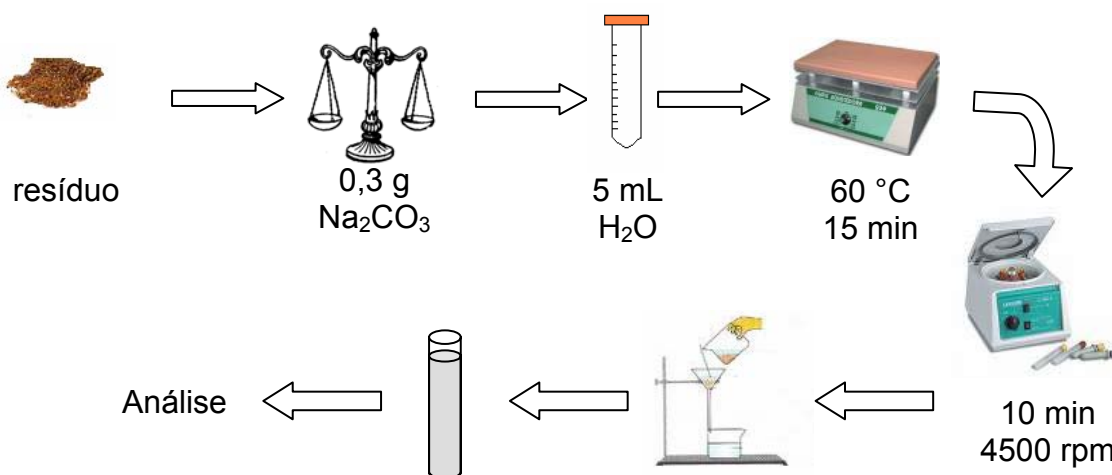


FIGURA 4.2 – Esquema do procedimento de extração em meio alcalino

Etapa 3 – Dissolução do resíduo - o sólido residual, ou seja o resíduo obtido na etapa 2, foi dissolvido em 10 mL de HNO_3 5% (v/v), realizando-se os processos de centrifugação e filtração. Dessa forma, resíduos decorrentes da eventual formação de carbonato de bário na etapa 2 foram dissolvidos em meio ácido (Fig. 4.3).

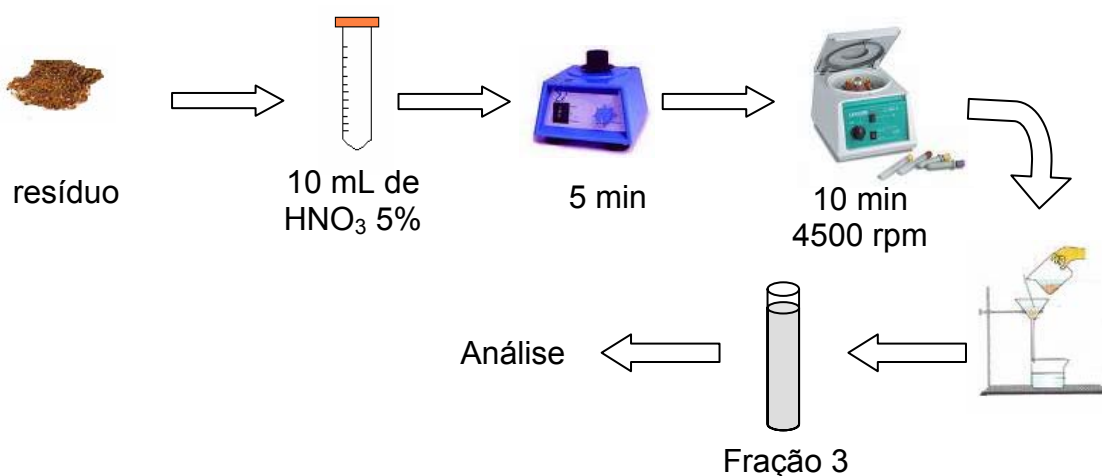


FIGURA 4.3 – Esquema do procedimento de dissolução do resíduo 2

Termogravimetria – foi efetuada a análise térmica dos resíduos obtidos em todas as etapas para uma das amostras. Os resíduos secos foram submetidos a uma programação de temperatura controlada, avaliando-se a variação de massa.

4.5.3 – Extração seqüencial: lipídios, proteínas e compostos de baixa massa molecular

A *extração lipídica* foi promovida mediante a adição de uma mistura clorofórmio-metanol 2:1 v/v (10 mL) à uma massa de 2,0 g de amostra moída. Após a evaporação do solvente, uma massa de 0,250 g do sólido residual composto pelos lipídios extraídos foi digerida adotando o mesmo programa citado anteriormente (Fig. 4.4).

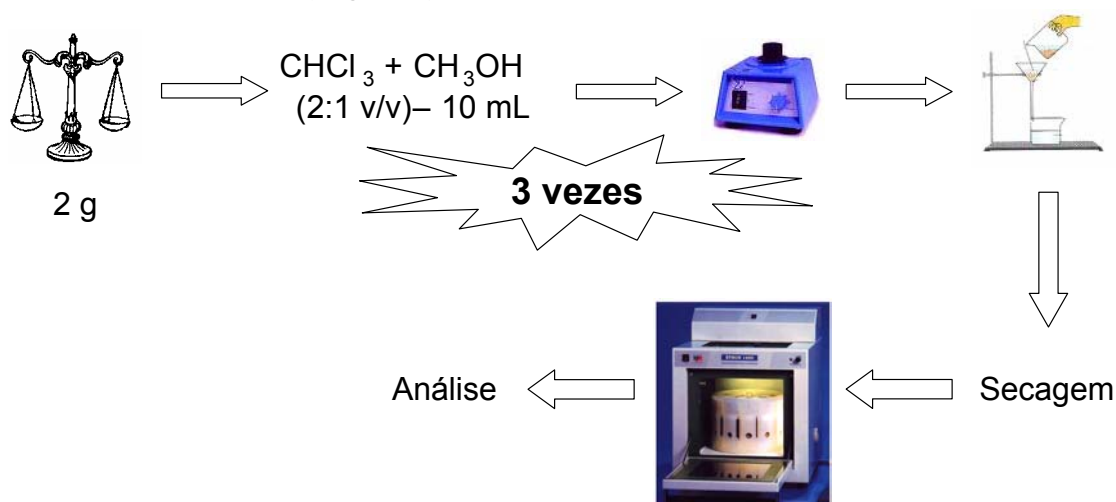


FIGURA 4.4 – Esquema do procedimento de extração lipídica

As extrações de proteínas e compostos de baixa massa molecular foram efetuadas para a amostra sem lipídios, após a evaporação de solvente à temperatura ambiente.

A *extração de LMW* foi promovida por intermédio da adição de HClO₄ 0,4 mol/L (40 mL) à amostra seca (2,0 g), mantendo-se a mistura em um

banho de ultra-som por 2 h, trocando-se a água periodicamente a fim de manter a uniformidade da temperatura. Uma única posição do frasco no banho foi usada para todas as amostras (Fig. 4.5).

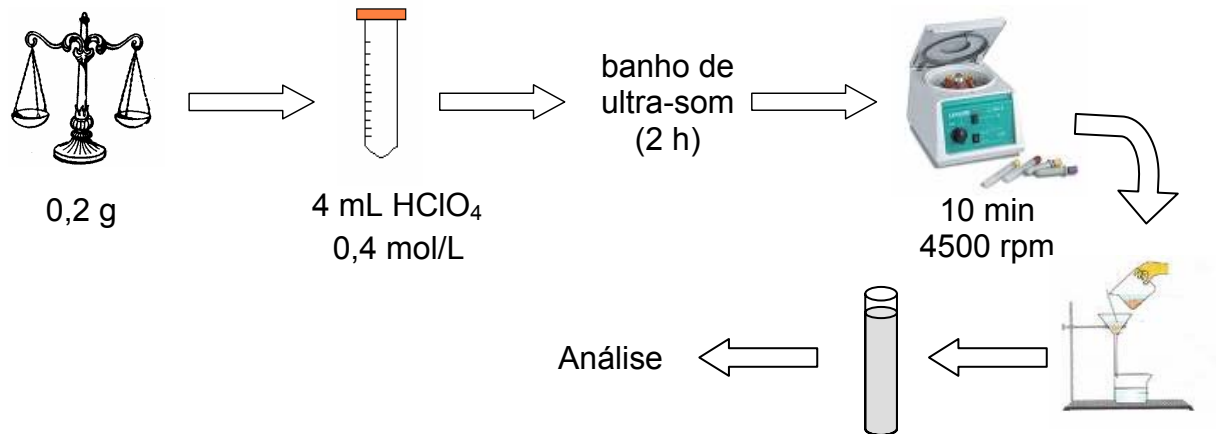


FIGURA 4.5 – Esquema do procedimento de extração de LMW

A *extração proteica* foi efetuada mediante adição de 10 mL de NaOH 0,1 mol/L à amostra seca (1,0 g), seguida da neutralização do sobrenadante com H₃PO₄ 4 mol/L e a precipitação com adição de acetona, sob refrigeração, por 30 min. As proteínas precipitadas foram digeridas em meio ácido usando-se aquecimento por radiação microondas (Fig. 4.6), após evaporação do solvente à temperatura ambiente, seguindo o mesmo programa apresentado na Tabela 4.2.

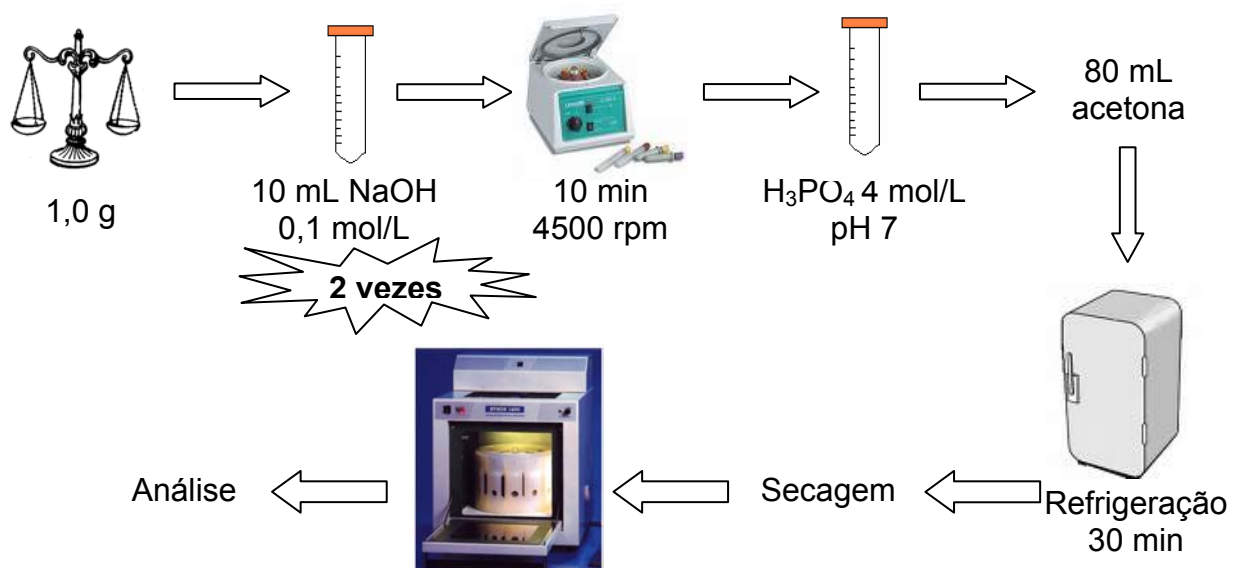


FIGURA 4.6 – Esquema do procedimento de extração protéica

4.5.4 – Determinação elementar

Foram empregadas as técnicas de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com arranjo axial (ICP OES AXIAL) para a determinação dos teores totais de bário.

O teor de Se foi determinado por GFAAS usando-se solução de Pd 1000 mg/L como modificador químico. Os programas de aquecimento foram estabelecidos utilizando soluções contendo 80 e 30 $\mu\text{g/L}$ de Ba e Se, respectivamente, em meio de 0,1 % HNO_3 (v/v). Os programas estabelecidos estão apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4.

A técnica de ICP OES foi empregada para determinação dos elementos Ca, Mg, P, S e Se.

A análise dos extratos obtidos nas extrações sequenciais foi conduzida por ICP OES para todos os elementos citados na determinação de teores totais. As soluções analíticas de calibração foram preparadas considerando-se os diferentes meios de cada fração decorrente do processo de extração sequencial.

TABELA 4.3 - Programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de bário

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s) (rampa, patamar)	Vazão de Ar (L min⁻¹)
Secagem	90	5, 15	3,0
Secagem	120	10, 20	3,0
Pirólise	1600	5, 10	3,0
Atomização	2600	2, 3	0
Limpeza	2700	1, 3	3,0

TABELA 4.4 - Programa de aquecimento do GFAAS para a determinação de selênio

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s) (rampa, patamar)	Vazão de Ar (L min⁻¹)
Secagem	90	5, 15	3,0
Secagem	120	5, 25	3,0
Pirólise	1200	3, 5	3,0
Atomização	2200	1, 5	0
Limpeza	2600	1, 3	3,0

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Análise elementar total

Para a determinação dos teores totais as amostras pulverizadas em moinho criogênico foram digeridas em forno com radiação microondas usando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio concentrados devido ao alto teor lipídico na castanha-do-Pará.

No entanto, foi possível o emprego de solução de ácido nítrico 7 mol/L aumentando-se os volumes dos reagentes, mantendo-se o mesmo programa de aquecimento e a mesma massa de amostra. Dessa forma, a digestão assistida por radiação microondas também foi eficiente com o emprego de ácido nítrico diluído correspondente a 50 % (m/v), possibilitando reduzir o manuseio de ácido concentrado e a concentração ácida dos resíduos. O emprego de ácidos diluídos na decomposição de amostras biológicas é desejável por proporcionar maior segurança no decorrer do processo, custos mais baixos e redução nos valores de branco. Além disso, a presença de moléculas de água facilita o aquecimento em função de sua alta capacidade calorífica⁷⁹.

5.1.1 – Determinação de bário

A determinação da concentração total de Ba nos digeridos da castanha-do-Pará foi efetuada tanto por GFAAS quanto por ICP OES, com o intuito de avaliar a exatidão dos resultados.

Também foi feita a determinação por FAAS com o uso de potássio como supressor de ionização, pois bário é facilmente ionizável e a sua atomização fica comprometida, principalmente na chama óxido nitroso-acetileno, que é recomendável para esse elemento. Porém, os resultados não

foram concordantes com aqueles obtidos por GFAAS e ICP OES, sendo que a sensibilidade obtida foi baixa.

Para a determinação de Ba por GFAAS foram obtidas as curvas de temperatura de pirólise e de atomização (Fig. 5.1). Sendo que, para estabelecer a temperatura ótima de pirólise fixou-se a temperatura de atomização em 2600 °C e variou-se a temperatura de pirólise entre 800 e 2200 °C. Ao passo que, para a obtenção da curva de temperatura de atomização fixou-se a temperatura de pirólise em 1600 °C e variou-se a temperatura de atomização entre 2200 e 2700 °C. Desse modo, as temperaturas de pirólise e de atomização estabelecidas foram de 1600 e 2600 °C, respectivamente, para uma solução de Ba 80 µg/L em meio HNO₃ 0,1 % (v/v).

Bário apresenta caráter refratário e pode formar carbeto relativamente estáveis no interior do tubo de grafite, dificultando a atomização do elemento⁵. No entanto, não foi empregado modificador químico, uma vez que os teores são relativamente altos e houve concordância dos resultados com aqueles obtidos por ICP OES, que serão apresentados posteriormente.

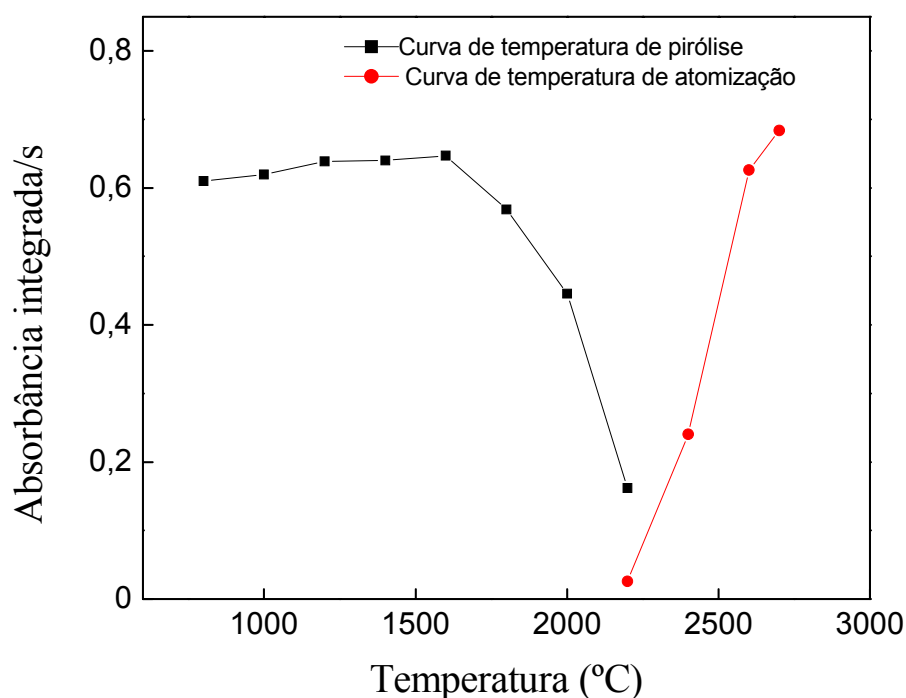


FIGURA 5.1 - Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Ba 80 µg/L em meio HNO₃ 0,1% (v/v)

Os resultados obtidos por GFAAS (Tab. 5.1) foram compatíveis com dados da literatura, sendo que os teores de bário em castanha-do-Pará podem chegar até 4000 mg/kg¹³. Os teores de bário determinados variaram em um intervalo de concentração de 860 a 2084 mg/kg. Os desvios padrão relativos foram de 0,80 a 3,1 %, possivelmente decorrentes das limitações da técnica para a determinação desse elemento, envolvendo a formação de carbeto refratário e interferências causadas pela emissão de radiação pelo tubo de grafite incandescente.

O limite de detecção (LOD) calculado após 10 medidas do branco a partir da curva analítica de calibração (Fig. 5.2) foi de 0,14 µg/L. Enquanto que, o valor calculado de limite de quantificação (LOQ) foi de 0,45 µg/L.

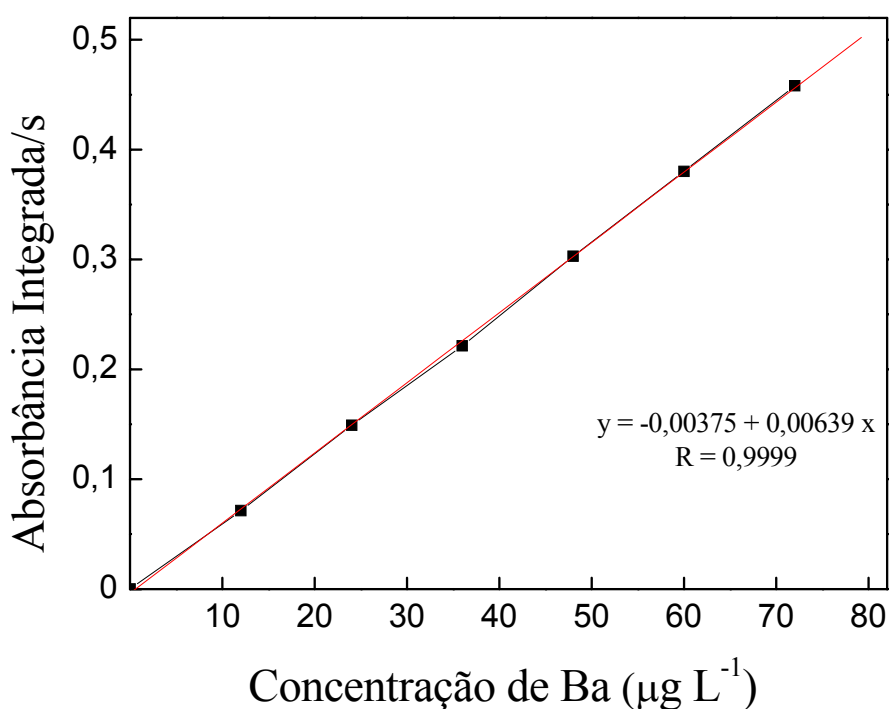


FIGURA 5.2 - Curva analítica de calibração para Ba em meio do branco do digerido para GFAAS

TABELA 5.1 – Teores médios de bário* determinados em castanha-do-Pará por GFAAS

Amostra	Ba (mg/kg)
1	1769 ± 43
2	1340 ± 42
3	2084 ± 25
4	893 ± 7
5	860 ± 15
6	1909 ± 30

* média ± desvio padrão, n = 3

Na determinação de bário por ICP OES foi empregada a linha iônica de emissão mais sensível em 455,403 nm. Os resultados encontram-se na Tabela 5.2, sendo que o LOD calculado a partir de 10 medidas do branco analítico foi de 8,33 µg/L, ao passo que o LOQ foi de 27,8 µg/L, considerando-se os valores de intensidade de emissão e da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC). A curva analítica de calibração está apresentada na Figura 5.3. O BEC é correspondente à concentração do analito que gera um sinal equivalente à intensidade de emissão do fundo na linha considerada. Com o seu emprego no cálculo de LOD é possível verificar mais claramente os efeitos do ambiente espectral em relação ao cálculo convencional estabelecido pela IUPAC. Assim, o cálculo de LOD por ICP OES envolvendo o BEC foi estabelecido conforme as equações abaixo^{25, 90}:

$$\text{Equação 4} \quad \text{BEC} = \frac{C_{\text{sr}}}{\text{SBR}}$$

$$\text{Equação 5} \quad \text{SBR} = \frac{I_{\text{sr}} - I_{\text{bco}}}{I_{\text{bco}}}$$

$$\text{Equação 6} \quad \text{LOD} = \frac{3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{bco}}}{100}$$

Nas quais, C_{sr} é a concentração da solução de referência, SBR é a razão entre o sinal analítico e o sinal de fundo, I_{sr} é a intensidade da solução de referência, I_{bco} é a intensidade de emissão do branco analítico e RSD é o desvio padrão relativo do branco analítico.

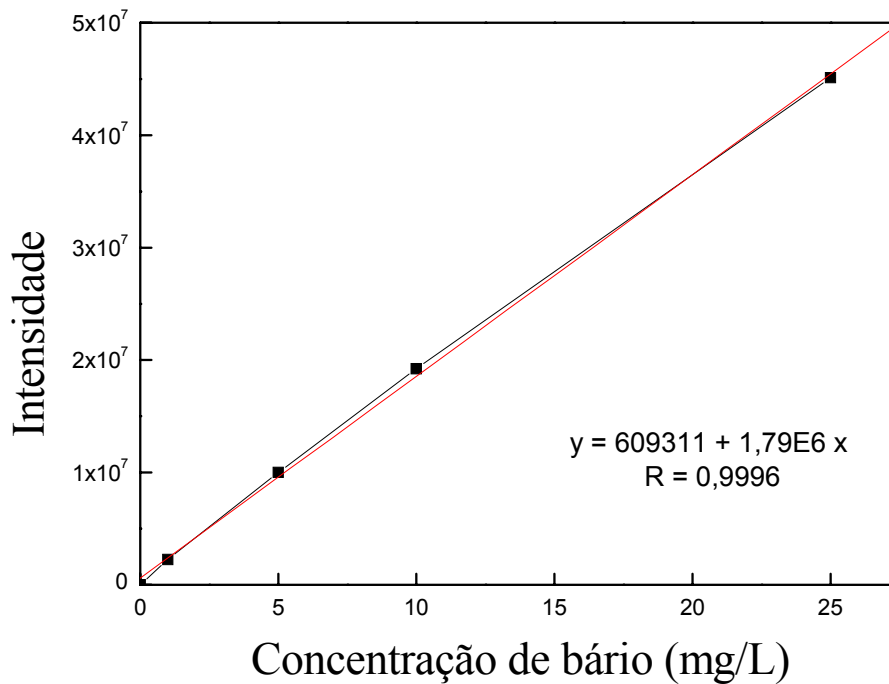


FIGURA 5.3 - Curva analítica de calibração para Ba por ICP OES

Os teores determinados foram similares aos obtidos por GFAAS e variaram entre 888 e 2067 mg/kg. Aplicando-se o teste-t foi constatado que os resultados obtidos por GFAAS e ICP OES foram concordantes a um nível de 95 % de confiança. Assim, tal como esperado, ambas as técnicas são aplicáveis para a determinação de bário em castanha-do-Pará.

TABELA 5.2 – Teores médios de bário* determinados em castanha-do-Pará por ICP OES

Amostra	Ba (mg/kg)
1	1868 ± 7
2	**
3	2067 ± 80
4	905 ± 8
5	888 ± 38
6	1947 ± 35

* média ± desvio padrão, n = 3;

** indisponibilidade de amostra

Também foi efetuada a determinação dos teores totais de outros elementos, tais como enxofre e selênio nas amostras digeridas para avaliar uma possível associação com bário. Esses dados serão apresentados e discutidos posteriormente.

5.1.2 – Determinação de selênio

A determinação da concentração total de Se foi efetuada por GFAAS utilizando-se Pd 1000 µg/L como modificador químico para uma adequada estabilização térmica do analito durante a etapa de pirólise⁹.

As temperaturas de pirólise e de atomização estabelecidas experimentalmente foram de 1200 e 2200 °C, respectivamente, para uma solução de Se 30 µg/L em meio HNO₃ 0,1% (v/v). As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 5.4.

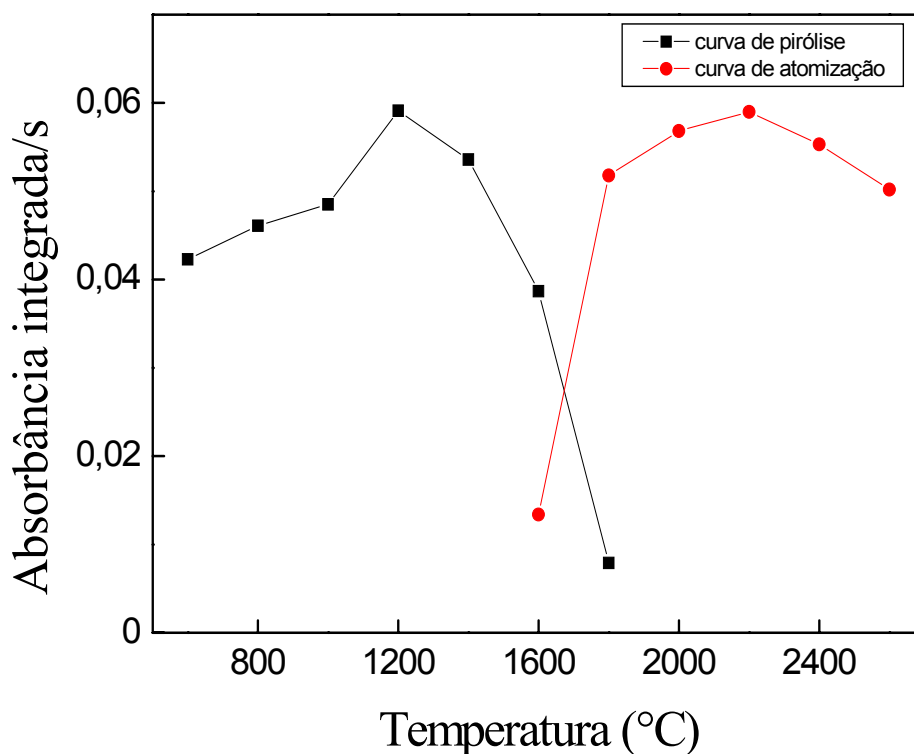


FIGURA 5.4 - Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Se 30 $\mu\text{g/L}$ em meio HNO_3 0,1% (v/v) com modificador químico Pd 1000 $\mu\text{g/L}$

Os teores de selênio nas amostras de castanha-do-Pará normalmente são altos em comparação com aqueles encontrados em outras fontes alimentícias de selênio. Os teores determinados variaram de 6,30 a 41,6 mg/kg nas amostras.

De acordo com Chang et al. a concentração total de selênio nesse alimento varia conforme a procedência, em um intervalo de 0,20 a 253 mg/kg⁶⁸.

TABELA 5.3 – Teores médios de selênio* determinados em castanha-do-Pará por GFAAS

Amostra	Se (mg/kg)
1	8,50 ± 0,55
2	19,0 ± 0,7
3	12,3 ± 0,3
4	8,40 ± 0,72
5	41,6 ± 0,3
6	6,30 ± 0,34

* média ± desvio padrão, n = 3

A determinação da concentração total de selênio também foi efetuada por ICP OES, porém foram observados altos desvios em virtude das concentrações estarem próximas ao limite de detecção da técnica para esse elemento. Entretanto, foram detectados teores concordantes com os obtidos por GFAAS.

5.1.3 – Determinação de enxofre

A castanha-do-Pará contém alta concentração de enxofre presente principalmente nas proteínas, na forma de metionina e cisteína, o que contribui para o alto valor nutricional do alimento⁵⁵.

Dessa forma, foi relevante a determinação desse elemento. A determinação foi conduzida por ICP OES com configuração axial. Os valores de LOD e LOQ calculados após 10 medidas do branco analítico foram de 72 e 240 µg/L, respectivamente.

Também foi efetuada a determinação simultânea dos elementos cálcio, magnésio e fósforo empregando-se ICP OES.

Com isso foram obtidas mais informações sobre a composição elementar das amostras de castanha-do-Pará (Tab. 5.4). Observaram-se desvios mais altos para as amostras 3 e 5 em relação a todos os elementos, sendo que o maior valor de RSD é correspondente a 5 %, podendo ser associado a erros no preparo de amostra que podem envolver perda do analito por volatilização ou contaminação.

Foram obtidos teores elevados para todos os elementos, em especial para o fósforo. Os valores de LOD calculados após 10 medidas do branco analítico foram de 85, 22 e 41 $\mu\text{g/L}$ para cálcio, magnésio e fósforo, respectivamente, e os valores de LOQ foram de 284, 75 e 140 $\mu\text{g/L}$. Considerando-se as altas concentrações, esses elementos despertaram interesse por desempenharem funções biológicas importantes.

Além disso, acredita-se na possibilidade de associação de fósforo com bário, assim como enxofre e selênio, na forma de compostos. Por outro lado, cálcio e magnésio podem apresentar perfis similares ao bário e se associarem aos não metais mencionados.

A castanha-do-Pará possui capacidade única entre as plantas de acumular facilmente metais, tais como bário e rádio. Em um estudo desenvolvido por SMITH foi observada uma alta razão entre bário e cálcio, no endosperma da planta, indicando maior facilidade na mobilidade de bário da raiz aos tecidos. Alguns agentes quelantes podem aumentar a mobilidade de cálcio, contribuindo para que esse metal também seja encontrado em altos teores nos frutos da castanha-do-Pará⁷⁵.

TABELA 5.4 – Teores médios de cálcio, magnésio, fósforo e enxofre* determinados por ICP OES com configuração axial

Amostra	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	P (mg/kg)	S (mg/kg)
1	1904 ± 18	2622 ± 14	16618 ± 87	3512 ± 14
2	**	**	**	**
3	906 ± 45	2360 ± 93	14513 ± 573	2964 ± 132
4	1985 ± 17	2330 ± 21	16445 ± 78	2651 ± 14
5	2296 ± 86	2792 ± 66	20577 ± 735	4266 ± 91
6	1360 ± 37	2384 ± 33	15691 ± 151	3018 ± 51

* média ± desvio padrão, n = 3;

** indisponibilidade de amostra

Em decorrência dos altos teores de fósforo, selênio e enxofre, formulou-se preliminarmente a hipótese de que a forma química de bário em castanha-do-Pará seja fosfato, sulfato ou selenato de bário. Essas espécies não apresentam toxicidade devido à sua baixa solubilidade em água¹⁴.

Sendo assim, foi importante a realização de um fracionamento de bário com base nas propriedades de solubilidade e massa molecular dos compostos. Essa estratégia possibilitou avaliar uma possível associação com os elementos mencionados na Tabela 5.4, nos diferentes compartimentos de compostos solúveis, de baixa massa molecular, lipídios e proteínas.

5.2 – Fracionamento de bário com base na solubilidade

O fracionamento de compostos de bário com base na solubilidade em água foi efetuado conforme os procedimentos de extração seqüencial envolvendo três etapas de extração com água, extração em meio alcalino e solubilização do resíduo em meio ácido. As determinações nos extratos obtidos

foram feitas por ICP OES com configuração axial. Os resultados para as três frações encontram-se na Tabela 5.5.

Obteve-se a separação dos compostos solúveis (fração 1) simplesmente com a adição de água à amostra moída, obtendo-se o resíduo 1. Observou-se uma quantidade pequena de bário nessa fração, indicando a presença desse elemento na castanha-do-Pará como uma forma insolúvel e indisponível ao organismo.

As etapas subseqüentes foram estabelecidas conforme os equilíbrios químicos envolvidos na reação entre carbonato de sódio e os sais sulfato e selenato de bário, possíveis formas químicas de bário em castanha-do-Pará, gerando carbonato de bário e sua posterior dissolução em meio ácido.

Com a adição de carbonato de sódio em excesso à quente, ocorre a conversão dos sais insolúveis contendo íons bário em carbonato de bário, sendo que o equilíbrio é deslocado no sentido de formação desse sal, de acordo com as equações 1 e 2 apresentadas no capítulo 4. Esse tipo de reação é denominado de metátese (do grego *metátesis*, transpor), na qual ocorre uma troca entre os íons das espécies envolvidas. A reação pode ser caracterizada por processos químicos, tais como a formação de produto insolúvel, de eletrólito fraco ou não-eletrólito e liberação de gás. O carbonato de bário possui baixa solubilidade ($K_s = 2,69 \times 10^{-9}$). No entanto, esse sal é facilmente solubilizado em ácido diluído. A reação entre carbonato e ácido promove a formação de ácido carbônico, liberando os íons bário em solução, esse ácido decompõe-se com facilidade em água e gás carbônico⁹¹.

Dessa forma, após a adição de carbonato de sódio ao resíduo 1, foi promovida a conversão dos possíveis sais de bário em carbonato de bário, ficando esse retido em um segundo resíduo, possivelmente liberando-se em solução os íons selenato e/ou sulfato (fração 2). Em seguida, o bário precipitado na forma de carbonato de bário no resíduo 2 foi solubilizado em meio ácido

(fração 3). Os procedimentos e as equações envolvidas estão apresentados na Figura 5.5.

As constantes de equilíbrio globais foram calculadas utilizando-se as constantes de solubilidade das espécies, obtiveram-se os valores de 0,58 e 12,9 para a reação entre carbonato de sódio e os sais de selenato e sulfato de bário, respectivamente. Esses valores indicam que há possibilidade das reações ocorrerem espontaneamente, sendo que a formação de selenato de bário seria mais provável, mediante o valor mais alto encontrado para a constante de equilíbrio dessa reação. Entretanto, também devem ser considerados outros fatores, como a relação entre os teores elementares nas diferentes frações para uma afirmação mais consistente. Conforme a alta concentração de fósforo observada nos resultados dos teores totais, seria razoável supor que fosfato de bário também poderia representar uma das possíveis formas químicas, sendo que esse sal possui extrema insolubilidade ($K_s = 6,03 \times 10^{-39}$). Porém, ao verificar a baixa constante global de equilíbrio ($K = 3,09 \times 10^{-13}$) essa hipótese foi descartada⁸⁹.

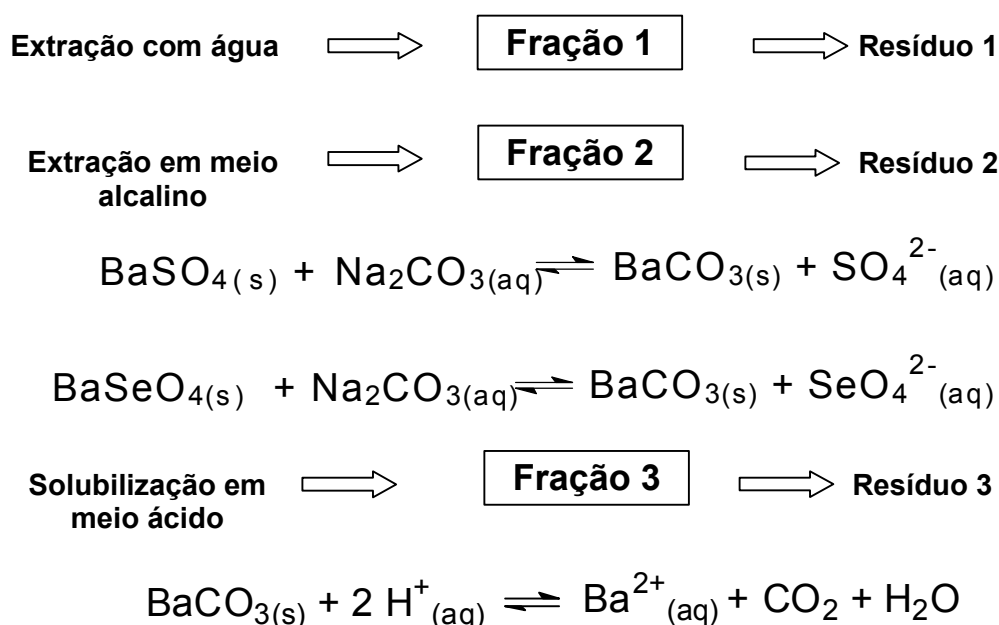


FIGURA 5.5 – Processos e equilíbrios químicos envolvidos no fracionamento com base na solubilidade

As determinações foram conduzidas considerando-se o meio de cada fração e construindo-se curvas analíticas individuais. Para a análise da fração 2, obtida por intermédio da extração alcalina, foi necessário adicionar o sal carbonato de sódio ao branco e soluções de referência, visando corrigir eventuais efeitos de interferência causados pelos íons sódio. É conhecido que os metais alcalinos são facilmente ionizáveis e podem alterar as intensidades das linhas de emissão do analito. A determinação de bário foi comprometida quando não se adicionou esse composto às soluções analíticas de calibração.

De acordo com os equilíbrios químicos apresentados na Figura 5.5, pode-se afirmar que as concentrações de enxofre e selênio devem ser maiores para as frações 1 e 2, já a concentração de bário deve ser maior na fração 3. Os resultados obtidos (Tab. 5.5) confirmaram essas suposições.

Os teores mais baixos de bário foram encontrados na fração de compostos solúveis, que variou entre 11 e 39 mg/kg. Para as amostras 3 e 6 obtiveram-se os maiores valores, 39 e 32 mg/kg respectivamente, sendo que ambas as amostras também apresentaram os maiores teores totais de bário nos digeridos. Entretanto, os teores encontrados na fração 1 não causam implicações danosas à saúde humana, conforme a WHO (do inglês: World Health Organization) a dose letal para humanos é de 3 a 4 g¹⁷. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina que é permitida uma concentração máxima de 1 mg/L de bário em águas, porém não há informações quanto à concentração nos alimentos.

Foram constatadas as maiores concentrações para enxofre e selênio na fração 1 em todas as amostras, com exceção da amostra 6, que apresentou um teor baixo de selênio. Esses resultados confirmam a biodisponibilidade desses elementos na castanha-do-Pará. Os perfis no fracionamento como um todo para esses não metais foram semelhantes para a maioria das amostras. Foi observado que a somatória dos teores das frações está coerente com os teores totais obtidos nos digeridos para os três elementos em questão.

TABELA 5.5 – Teores médios de bário, enxofre e selênio* em mg/kg nas diferentes frações da extração seqüencial com base na solubilidade

Elemento	Amostra	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Somatória
Ba	1	15,0 ± 0,3	199 ± 20	895 ± 26	1109 ± 33
	2	11 ± 1	130 ± 13	984 ± 9	1125 ± 16
	3	39 ± 1	127 ± 7	1757 ± 22	1923 ± 23
	4	18 ± 1	45,8 ± 0,6	571 ± 32	635 ± 32
	5	17 ± 1	61,9 ± 1,5	551 ± 7	630 ± 7
	6	32 ± 2	126 ± 10	1520 ± 223	1678 ± 223
S	1	1872 ± 157	619 ± 24	50 ± 6	2760 ± 159
	2	2240 ± 20	759 ± 42	89 ± 8	3090 ± 47
	3	1921 ± 89	377 ± 1	21 ± 1	2319 ± 89
	4	1574 ± 39	396 ± 17	9 ± 1	1979 ± 43
	5	2600 ± 17	335 ± 2	34 ± 6	2969 ± 18
	6	1430 ± 27	520 ± 30	39 ± 3	1989 ± 40
Se	1	3,33 ± 0,10	0,90 ± 0,10	1,90 ± 0,20	6,90 ± 0,24
	2	14,4 ± 0,5	2,45 ± 0,20	2,30 ± 0,30	20,7 ± 0,6
	3	9,82 ± 0,60	2,96 ± 0,08	1,56 ± 0,08	14,3 ± 0,6
	4	3,92 ± 0,05	0,99 ± 0,10	2,44 ± 0,10	7,35 ± 0,15
	5	30,8 ± 2,2	1,93 ± 0,15	2,76 ± 0,15	35,5 ± 2,2
	6	0,63 ± 0,09	1,32 ± 0,12	1,72 ± 0,12	3,67 ± 0,19

* média ± desvio padrão, n = 3

A distribuição percentual de bário, enxofre e selênio nas três frações obtidas na extração seqüencial com base na solubilidade para a amostra 3, está ilustrada na Figura 5.6. Os perfis de distribuição obtidos para as demais amostras são similares ao obtido para a amostra 3.

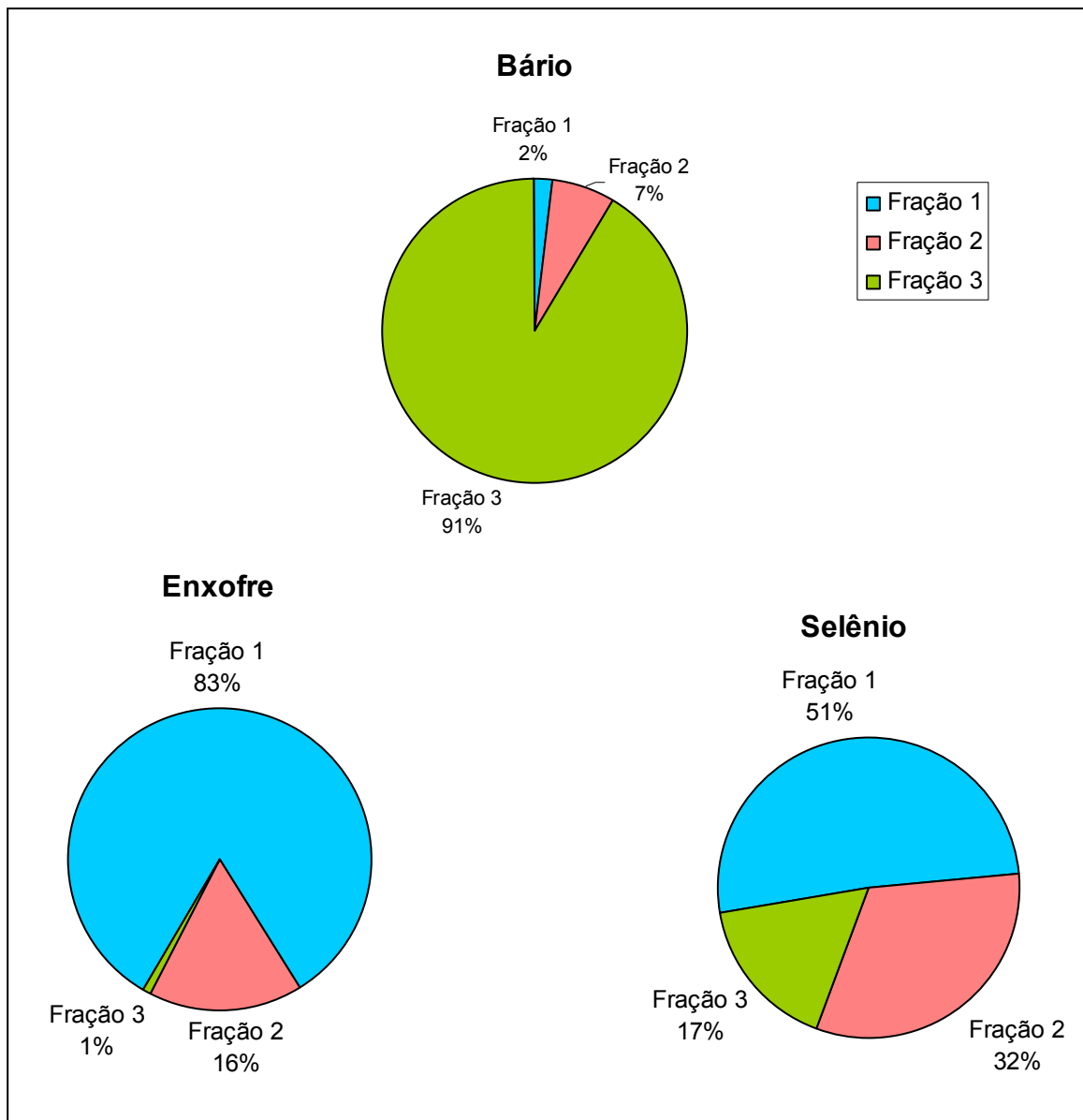


FIGURA 5.6 – Distribuição percentual para o fracionamento baseado na solubilidade (amostra 3)

Efetuiu-se a análise térmica dos resíduos obtidos nas três etapas do fracionamento para a amostra 1. Assim, avaliou-se a variação de massa com o aumento da temperatura para a amostra e os resíduos de acordo com uma programação controlada de temperatura. A curva TG para a amostra está apresentada na Figura 5.7, os resíduos 1 e 3 apresentaram curvas semelhantes (Figs. 5.8 e 5.9), ocorrendo queima total da matéria orgânica a partir de aproximadamente 600 °C.

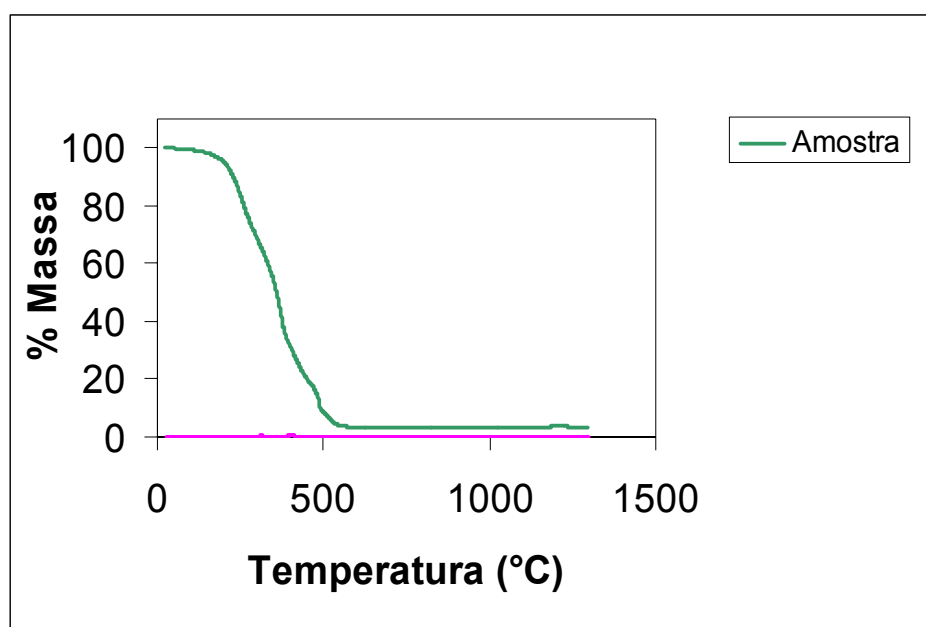


FIGURA 5.7 – Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para a amostra 1

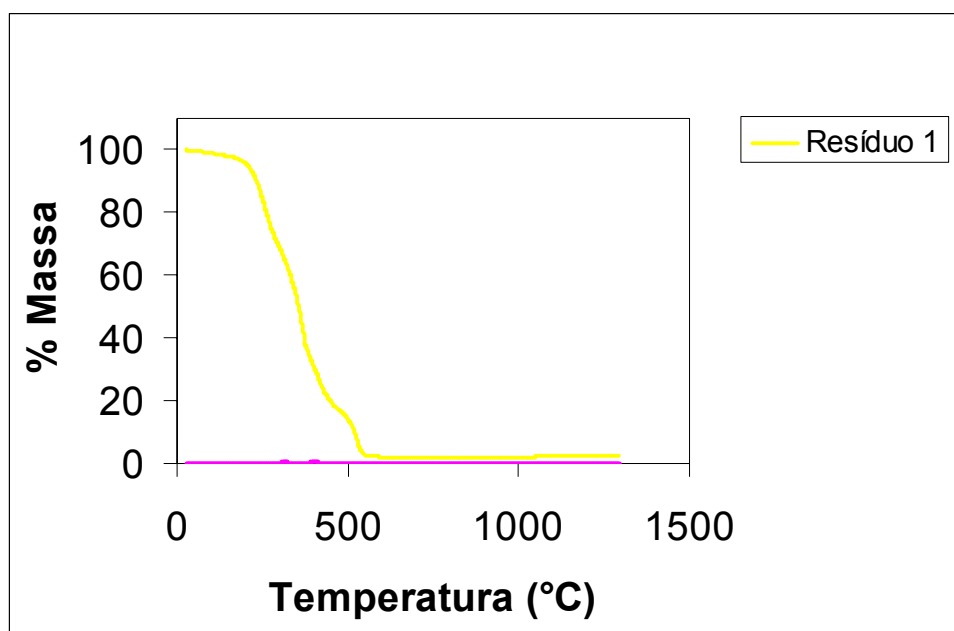


FIGURA 5.8 – Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 1 obtido após extração com água

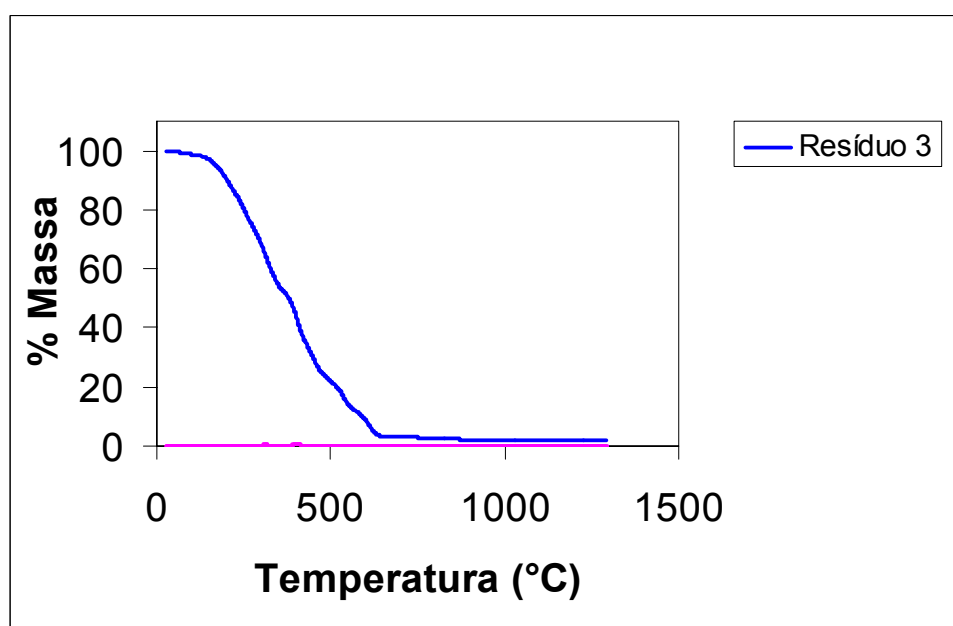


FIGURA 5.9 – Curva TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 3 obtido após dissolução do resíduo 2

A única alteração apreciável nas curvas TG ocorreu para o resíduo 2 (Fig. 5.10). Sendo que seu perfil se assemelha ao do BaCO_3 , observando-se perda em torno de 20 % em massa entre as temperaturas de 900 e 1100 °C.

Esse resultado reforça a hipótese de que realmente o bário esteja sendo precipitado na fração 2 como carbonato de bário, conforme os equilíbrios de metátese já mencionados (Fig. 5.5). Essa forma insolúvel confirma a indisponibilidade de bário na castanha-do-Pará. A Figura 5.11 contém as curvas TG combinadas para facilitar a comparação.

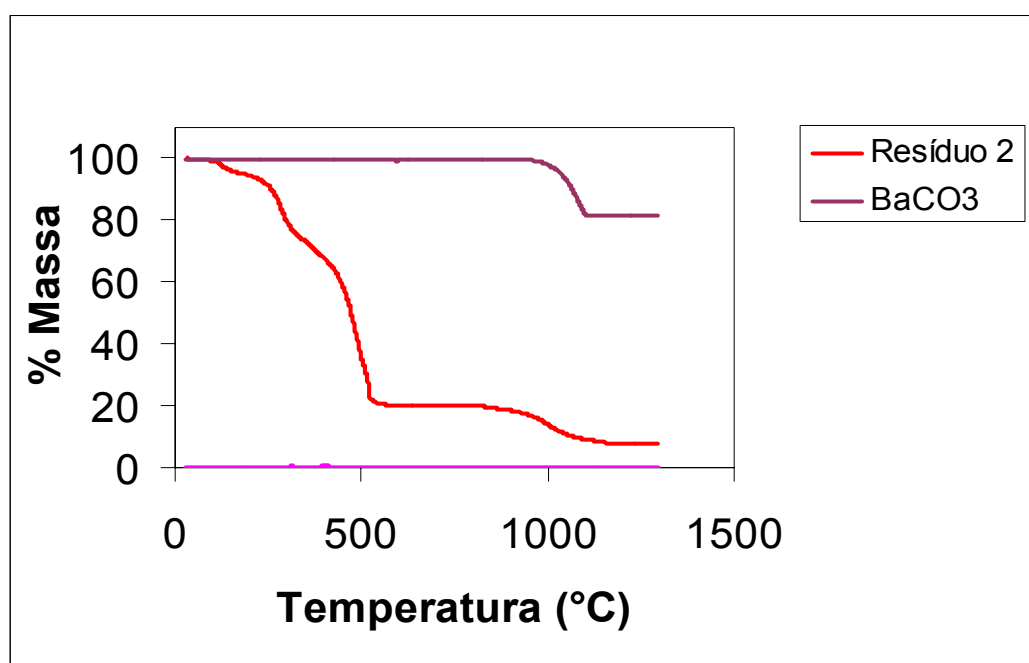


FIGURA 5.10 – Curvas TG (% de massa residual em função da temperatura) para o resíduo 2 obtido após extração em meio alcalino e carbonato de bário puro

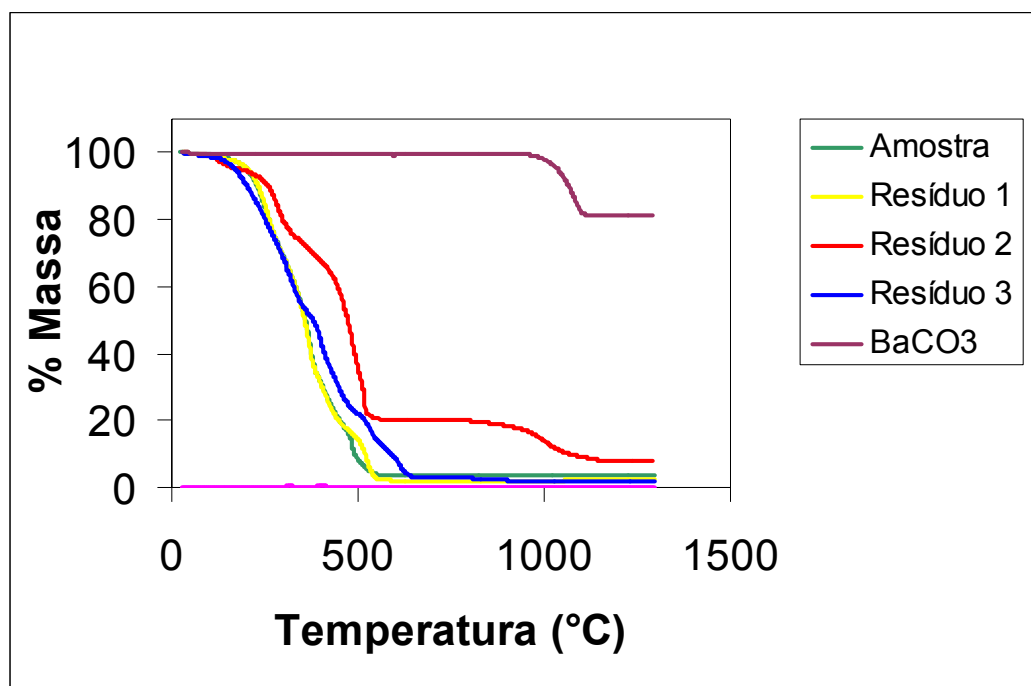


FIGURA 5.11 – Combinação das curvas TG para a amostra, resíduos obtidos no fracionamento com base na solubilidade e carbonato de bário puro

Portanto, com os procedimentos desenvolvidos no fracionamento com base na solubilidade foi possível verificar a insolubilidade das espécies químicas de bário presente na castanha-do-Pará.

Além disso, a técnica de termogravimetria contribuiu para confirmação da hipótese quanto à presença de sulfato de bário na castanha-do-Pará.

5.3 - Fracionamento de bário com base na composição química

Também foi realizado um fracionamento de bário conforme procedimentos relacionados à composição química. Essa estratégia possibilitou uma melhor avaliação da distribuição de bário em castanha-do-Pará entre os vários compartimentos.

Os extratos obtidos nas diferentes frações de lipídios, proteínas e compostos de baixa massa molecular foram analisados por ICP OES com configuração axial. As soluções analíticas de calibração foram preparadas de acordo com os diferentes meios das frações de lipídios, proteínas e LMW.

A determinação de bário em LMW foi feita no comprimento de onda de 233,527 nm, que é uma linha de emissão com menor intensidade que aquela em 455,403 nm usada para as outras frações. Essa linha foi inadequada para a fração LMW devido à alta concentração de bário nessa fração. Por outro lado, a diluição das amostras seria inviável, pois foram determinados simultaneamente outros elementos, presente em menores concentrações, tal como o selênio.

A extração lipídica foi conduzida por intermédio da mistura de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) obtendo-se em torno de 65 % de lipídios.

O método Kjeldahl indicou a presença de aproximadamente 15 % de proteínas. Esse método é freqüentemente utilizado para a quantificação de proteínas totais em alimentos determinando-se o nitrogênio orgânico. Basicamente a amostra é digerida usando ácido sulfúrico, destilada e, em seguida, titulada⁹².

Os percentuais totais lipídicos e protéicos determinados (Tab. 5.6) foram coerentes com relação aos dados da literatura, que indicam uma composição química complexa da castanha-do-Pará, contendo de 50 a 70 % de lipídios, 10 a 20 % de proteínas e 10 a 20 % de carboidratos⁸.

TABELA 5.6 – Percentual em massa lipídico e proteico* para as amostras de castanha-do-Pará

Amostra	% Lipídios	% Proteínas
1	64,8 ± 0,5	14,7 ± 0,2
2	60,3 ± 1,6	15,8 ± 0,7
3	63,7 ± 1,1	14,8 ± 1,6
4	69,1 ± 1,6	11,0 ± 0,2
5	61,9 ± 2,5	16,0 ± 0,1
6	69,2 ± 1,5	16,1 ± 0,5

* média ± desvio padrão, n = 3

Os lipídios são substâncias que representam moléculas de origem biológica com características hidrofóbicas. São facilmente solubilizados em solventes orgânicos, como clorofórmio e metanol⁹³. Assim, após a eficiente separação dos lipídios das outras frações da castanha-do-Pará pela ação da mistura desses solventes, foram obtidas as frações contendo proteínas e os compostos LMW.

As proteínas foram solubilizadas e separadas da matriz orgânica em meio alcalino devido à alta solubilidade nesse meio. Após a neutralização da solução contendo as proteínas, a precipitação foi promovida com a adição de acetona sob baixas temperaturas, uma vez que solventes orgânicos solúveis em água diminuem a solubilidade das proteínas devido ao baixo valor de suas constantes dielétricas e por sofrerem hidratação⁹⁴.

Foi necessário um controle minucioso após a separação das proteínas, sendo que alguns fatores como pH, temperatura e presença de enzimas degradativas podem influenciar a estabilidade conformacional, tornando-as facilmente susceptíveis à desnaturação⁹². Assim, justifica-se o

desenvolvimento dos processos sob baixas temperaturas, além do ajuste de pH para 7 após a solubilização, adicionando-se ácido fosfórico.

Para determinar os compostos de baixa massa molecular as amostras livres de lipídios foram tratadas com ácido perclórico, sendo que o meio ácido extrai seletivamente esses compostos. Por outro lado, o meio alcalino promove a extração de compostos de alta massa molecular¹. A extração dos compostos LMW assistida por ultra-som foi desenvolvida mediante o controle de alguns parâmetros, tais como a posição do frasco reacional no banho e a temperatura da água, mantendo-se a posição central no banho para todas as amostras e trocando-se a água periodicamente, sendo que a temperatura foi mantida entre 26 e 30 ° C.

NASCENTES et al. otimizaram condições para uma máxima intensidade de cavitação, estabelecendo o uso de 1 L de água à temperatura ambiente e posicionamento central de um único tubo contendo a amostra. A troca contínua da água do banho ultra-sônico possibilitou que até seis amostras fossem sonicadas consecutivamente, com ausência de desvios altos entre as replicatas⁹⁵.

Houve uma concordância entre a somatória dos teores determinados nas diferentes frações de lipídios, proteínas e LMW (Tab. 5.7) e os teores totais obtidos por digestão ácida.

Tal como esperado, os elementos enxofre e selênio apresentaram teores mais altos para a fração de proteínas. Estudos mostraram que selênio está ligado covalentemente com as proteínas por meio dos aminoácidos seleniometionina e selenocisteína⁵¹, ressaltando-se ainda que o enxofre compõe esses aminoácidos.

Não foi detectada a presença de selênio na fração de lipídios. De acordo com um trabalho desenvolvido sobre esse elemento em castanha-do-Pará⁸, não foi encontrado selênio no extrato lipídico, sendo que a sua remoção proporcionou maior precisão para a determinação do conteúdo total. Nesse caso,

seria necessário o emprego de uma técnica mais sensível, tal como GFAAS, para verificar a eventual presença de selênio nos lipídios.

Embora os teores de enxofre e selênio na fração proteica sejam semelhantes àqueles determinados na fração solúvel em água, o aminoácido metionina é apolar e apresenta baixa solubilidade. No entanto, com o aquecimento da água provavelmente ocorreu a desnaturação parcial das proteínas, que normalmente ocorre à temperaturas abaixo de 100 °C, sendo que pequenas variações na temperatura causam alterações apreciáveis nas propriedades conformacionais, tais como rotação óptica, viscosidade, absorção de UV e solubilidade. Assim, os elementos enxofre e selênio provenientes das proteínas, ficaram disponíveis em solução da fração 1 obtida na extração com água^{93, 94}.

Enxofre e selênio não estão exclusivamente incorporados às proteínas, sendo que a fração LMW também apresentou valores consideráveis, principalmente para enxofre. Pode-se inferir a possibilidade de associação com bário nessa fração.

O bário apresentou altos teores na fração LMW, que variaram entre 778 e 1786 mg/kg, ao passo que os lipídios contêm as menores quantidades. Os maiores teores em LMW contribuem para reforçar a suposição já mencionada da presença de sulfato ou selenato de bário.

Bário também foi detectado na fração de proteínas, sendo que os valores determinados foram de 17,6 a 207 mg/kg. A presença de metais pode influenciar as atividades das proteínas, havendo possíveis interações entre ambos. Há conhecimento da afinidade das proteínas por íons metálicos, sendo que essa habilidade tem sido explorada nos sistemas biológicos para o desempenho de algumas funções importantes aos organismos vivos, tais como catálise (enzimas ativadas por metais), suporte estrutural (proteínas constituintes de membranas) e transporte (hemoglobina). Os metais de transição Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} podem se coordenar com alguns aminoácidos tais como a histidina,

cisteína e triptofano, através de grupos doadores de elétrons nas cadeias laterais desses aminoácidos⁹⁶.

No entanto, há poucas informações relacionadas às interações de bário com proteínas. Sabe-se que o DNA dirige a síntese de proteínas em um determinado organismo, sendo que o RNA representa um elo entre o DNA e as proteínas⁹³. Foi desenvolvido um trabalho para avaliar as interações específicas de metais divalentes, como Mn^{2+} , Ba^{2+} e Mg^{2+} , na presença de L-histidina ligada ao RNA para uma espécie bacteriana. Avaliando-se o arranjo das estruturas é perceptível que os metais divalentes desempenham um papel importante para a regulação das interações entre as proteínas e RNA. Embora o íon metálico bário tenha apresentado uma baixa influência em comparação aos outros íons estudados, mediante as distâncias de ligação no complexo formado, também desempenhou a função de facilitar a ligação entre a proteína e o RNA⁹⁷.

Na fração de lipídios a concentração determinada de bário variou entre 0,14 e 54 mg/L. Alguns estudos foram desenvolvidos envolvendo a influência de cátions divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} em fosfolipídios^{98,99}.

MCLOUGHLIN et al. estabeleceram que cálcio desempenha um maior efeito na interação entre DNA e fosfolipídios em relação ao magnésio e bário. Esses efeitos geralmente são associados às interações com água, volume molar e energia de hidratação (entalpia e entropia)⁹⁸.

WALTER E SIEGEL mostraram que uma comparação da dependência da temperatura para a mistura de bário e cálcio nos lipídios indicou que a energia de ativação para cálcio é maior do que para bário⁹⁹.

TABELA 5.7 – Teores médios de bário, enxofre e selênio* em mg/kg nas diferentes frações da extração seqüencial com base na composição química

Elemento	Amostra	Lipídios	Proteínas	LMW	Somatória
Ba	1	54,3 ± 0,1	66,5 ± 1,7	1641 ± 5	1762 ± 5
	2	8,42 ± 0,92	30,7 ± 0,7	869 ± 5	908 ± 5
	3	39,7 ± 1,1	207 ± 9	1606 ± 23	1853 ± 25
	4	30,7 ± 0,9	133 ± 6	807 ± 3	971 ± 7
	5	5,57 ± 0,24	17,6 ± 0,9	778 ± 35	801 ± 35
	6	0,14 ± 0,03	18,60 ± 0,01	1786 ± 7	1805 ± 7
S	1	19,10 ± 0,05	2814 ± 154	395 ± 6	3228 ± 154
	2	16,8 ± 0,8	1575 ± 106	663 ± 8	2255 ± 106
	3	13,5 ± 0,9	2265 ± 85	380 ± 10	2659 ± 86
	4	17,6 ± 0,7	1911 ± 125	756 ± 7	2685 ± 125
	5	12,9 ± 0,8	2952 ± 98	349 ± 2	3314 ± 98
	6	12,1 ± 0,7	2794 ± 127	363 ± 3	3169 ± 127
Se	1	< LOD	12,9 ± 0,7	0,94 ± 0,03	13,8 ± 0,7
	2	< LOD	14,8 ± 0,5	2,53 ± 0,21	17,3 ± 0,5
	3	< LOD	9,8 ± 0,9	2,65 ± 0,24	12,5 ± 0,9
	4	< LOD	12,4 ± 0,4	1,90 ± 0,08	14,3 ± 0,4
	5	< LOD	37,0 ± 3,1	1,84 ± 0,15	38,8 ± 3,1
	6	< LOD	6,7 ± 0,8	0,14 ± 0,01	6,84 ± 0,80

* média ± desvio padrão, n = 3

** < LOD = abaixo do limite de detecção

Enxofre e selênio apresentaram perfis semelhantes, estando presente em maior porcentagem nas proteínas e em baixa concentração nos

lipídios. Por sua vez, o bário se disponibiliza quase que totalmente em LMW. As proteínas concentram em torno de 11 % desse elemento.

A Figura 5.12 representa uma distribuição percentual dos elementos bário, enxofre e selênio nas diferentes frações de lipídios, proteínas e LMW para a amostra 3, sendo que os perfis de distribuição obtidos para as demais amostras foram semelhantes.

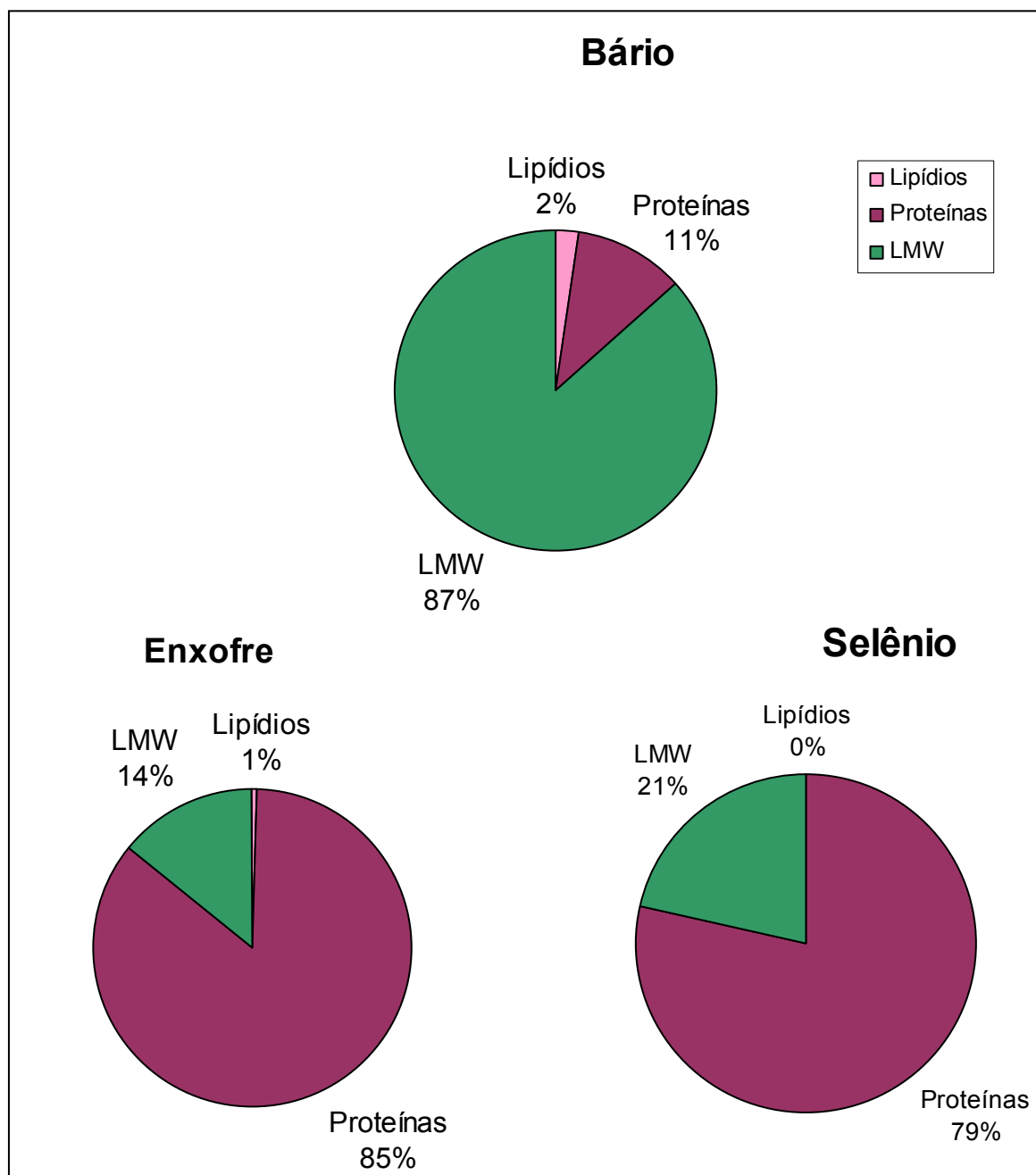
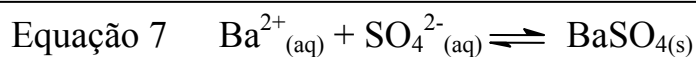


FIGURA 5.12 – Distribuição percentual para o fracionamento baseado na composição química (amostra 3)

5.4 – Cálculos com base na estequiometria

Muitos problemas químicos podem ser compreendidos com os conhecimentos estequiométricos das reações envolvidas em um determinado processo. Assim, foram efetuados cálculos estequiométricos relacionando os teores de bário, enxofre e selênio na fração LMW, conforme os equilíbrios químicos demonstrados nas equações 7 e 8.

Observou-se uma relação direta entre os teores de Ba e S em LMW para várias amostras. Adotando-se como exemplo a amostra 3, constatou-se que para a formação de sulfato de bário a partir de uma massa de 1,606 g de bário, total presente em LMW, são necessários 0,375 g de enxofre. Sendo que, foi detectada uma massa de 0,380 g de enxofre nessa fração para a mesma amostra.



Na Tabela 5.8 apresenta-se a relação entre os teores em massa presentes em 1,0 kg de LMW, bem como os teores necessários para que ocorra a reação química representada na equação 7.

As amostras 1, 3 e 5 apresentaram valores próximos entre as quantidades presentes e aquelas necessárias para a formação de sulfato de bário. Para as amostras 2 e 4 as massas presentes são maiores do que aquelas previstas, indicando que enxofre pode reagir com bário, mas encontra-se em excesso nessa fração. Notou-se que essas amostras apresentaram teores menores de enxofre nas proteínas em relação às outras amostras, ao passo que na LMW os teores

foram maiores. Apenas a amostra 6 apresentou teor de enxofre 14 % abaixo daquele necessário para formação de sulfato de bário.

TABELA 5.8 – Massas determinadas de bário e enxofre na fração LMW e massa estequiométrica de enxofre necessária para reagir com bário formando o respectivo sal de sulfato

Amostra	Ba (g)	S (g)	S (g)
	Determinada	Determinada	Estequiométrica
1	1,64	0,40	0,38
2	0,87	0,66	0,20
3	1,61	0,38	0,37
4	0,80	0,76	0,19
5	0,80	0,35	0,19
6	1,79	0,36	0,42

Conforme os equilíbrios já apresentados da reação entre os sais insolúveis de bário e carbonato de sódio no fracionamento com base na solubilidade, é possível fazer uma associação entre os teores de enxofre e bário nas frações 2 e 3, respectivamente. Assumindo-se que na reação entre sulfato de bário e carbonato de sódio, há formação de carbonato de bário e liberação dos íons sulfato em solução que corresponde à fração 2, ao passo que os íons bário são solubilizados na fração 3, após a dissolução do carbonato de bário em meio ácido (Fig. 5.13).

Assim, também foram efetuados cálculos estequiométricos relacionando os teores de bário e enxofre nas frações mencionadas, conforme o equilíbrio químico de formação de sulfato de bário apresentado na equação 7.

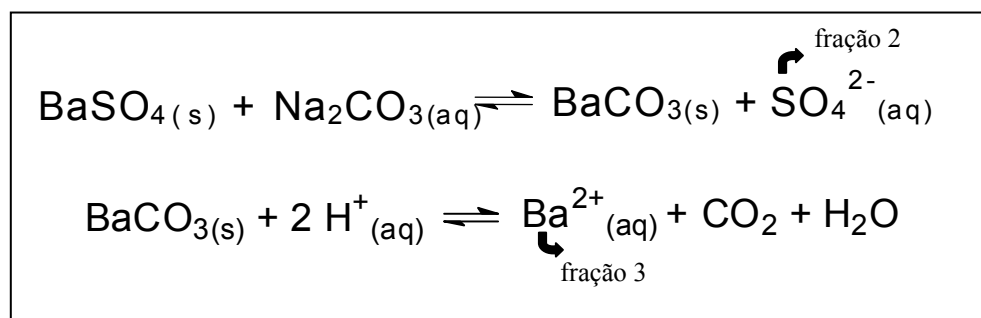


FIGURA 5.13 – Equações indicando a presença dos íons sulfato e bário nas frações 2 e 3

Observou-se que os teores de enxofre determinados na fração 2 são superiores aos necessários para que ocorra a reação de formação de sulfato de bário, com exceção da amostra 3 que contém uma massa de apenas 0,03 g menor do que a estequiométrica. Indicando a possibilidade da ocorrência da reação. Na Tabela 5.9 apresenta-se a relação entre os teores em massa presentes em 1,0 kg das frações 2 e 3, bem como os teores de enxofre necessários para que ocorra a reação química representada na equação 7.

TABELA 5.9 – Massas determinadas de enxofre e bário nas frações 2 e 3, respectivamente, e massa estequiométrica de enxofre necessária para reagir com bário formando o respectivo sal de sulfato

Amostra	Ba (g)	S (g)	S (g)
	Determinada	Determinada	Estequiométrica
1	0,89	0,62	0,21
2	0,98	0,76	0,23
3	1,76	0,38	0,41
4	0,57	0,40	0,13
5	0,55	0,33	0,13
6	1,52	0,52	0,35

Dessa forma, o estudo das relações quantitativas nas reações químicas também evidenciou a presença da forma química de sulfato de bário na castanha-do-Pará. Essa conclusão é coerente com as informações obtidas a partir do fracionamento com base na solubilidade e na composição química.

5.5 - Avaliação dos teores totais

Uma avaliação geral dos teores totais para os diferentes procedimentos de preparo de amostra empregados neste trabalho pode ser verificada na Tabela 5.10.

Comparando-se os teores para cada fracionamento com aqueles obtidos na digestão ácida, verifica-se que há uma boa proximidade. Assim, houve um bom rendimento nos procedimentos de fracionamento envolvendo extrações sucessivas.

Para algumas amostras há uma diferença mais acentuada nos teores dos três elementos considerados. No entanto, esse comportamento é aceitável mediante as várias etapas envolvidas nos dois processos de fracionamento, que podem proporcionar inevitáveis perdas do analito e contaminações, contribuindo para altos desvios. Tais problemas não foram em geral pronunciados, conforme os resultados apresentados na Tabela 5.10, na qual estão dispostos os teores totais obtidos no fracionamento baseado na propriedade de solubilidade (procedimento 1), fracionamento com base na composição química (procedimento 2) e digestão ácida assistida por radiação microondas.

Comparando os teores determinados pelo procedimento 1 com os da digestão observa-se que apenas as amostras 4 e 5 apresentaram diferenças consideráveis em relação aos elementos bário e enxofre. Para o teor de bário na amostra 6, considerando-se o alto desvio, é possível verificar que o valor se aproxima do teor no digerido. Para selênio as amostras 3 e 6 se distanciam mais do teor para as amostras digeridas. Notou-se que há maior concordância para o

procedimento 2, sendo que apenas para a amostra 2 observa-se comportamento atípico para bário e enxofre. Para selênio as amostras 1 e 4 apresentaram maior diferença entre os teores.

TABELA 5.10 – Teores médios de bário, enxofre e selênio* em mg/kg para os diferentes procedimentos de preparo de amostra

Elemento	Amostra	Procedimento 1	Procedimento 2	Digestão ácida
Ba	1	1109 ± 33	1762 ± 5	1868 ± 7
	2	1125 ± 16	908 ± 5	1340 ± 42
	3	1923 ± 23	1853 ± 25	2067 ± 80
	4	635 ± 32	971 ± 7	905 ± 8
	5	630 ± 7	801 ± 35	888 ± 38
	6	1678 ± 223	1805 ± 7	1947 ± 35
S	1	2760 ± 159	3228 ± 154	3512 ± 14
	2	3090 ± 47	2255 ± 106	3708 ± 23
	3	2319 ± 89	2659 ± 86	2964 ± 132
	4	1979 ± 43	2685 ± 125	2651 ± 14
	5	2969 ± 18	3314 ± 98	4266 ± 91
	6	1989 ± 40	3169 ± 127	3018 ± 51
Se	1	6,90 ± 0,24	13,8 ± 0,7	8,50 ± 0,55
	2	20,7 ± 0,6	17,3 ± 0,5	19,0 ± 0,7
	3	14,3 ± 0,6	12,5 ± 0,9	12,3 ± 0,3
	4	7,35 ± 0,15	14,3 ± 0,4	8,40 ± 0,72
	5	35,5 ± 2,2	38,8 ± 3,1	41,6 ± 0,3
	6	3,67 ± 0,19	6,84 ± 0,80	6,30 ± 0,34

* média ± desvio padrão, n = 3

Avaliando-se os procedimentos simultaneamente, nota-se que os teores da amostra 3 para todos os elementos apresentam maior proximidade.

Portanto, há coerência entre os resultados indicando a viabilidade dos diferentes processos de fracionamento para a análise elementar das amostras de castanha-do-Pará.

5.6 – Relação entre os teores elementares obtidos para as frações dos diferentes procedimentos

A partir da Tabela 5.11 é possível fazer uma comparação entre os teores elementares nas frações obtidas pelos procedimentos 1 e 2.

A concentração de bário na fração 3 do procedimento 1 corresponde aos íons bário de sais insolúveis. Assim, é coerente relacionar seus valores aos obtidos para a fração LMW do procedimento 2. As amostras 2, 3 e 6 apresentaram boa proximidade entre os resultados.

As concentrações de enxofre e selênio na fração 2 do procedimento 1, possivelmente correspondem aos íons selenato e sulfato. Dessa forma, pode-se relacionar os teores com aqueles encontrados para a fração LMW do procedimento 2. As amostras 2, 3 e 5 apresentaram valores próximos para enxofre. Em relação ao selênio, houve boa correlação entre os teores, sendo que apenas as amostras 4 e 6 foram discrepantes.

Portanto, além da avaliação dos teores totais há possibilidade de correlacionar os resultados obtidos nos dois procedimentos de fracionamento.

TABELA 5.11 – Teores elementares obtidos nas diferentes frações dos procedimentos de fracionamento

Elemento	Amostra	Concentração (mg/kg)	
Ba		Fração 3	LMW
	1	895 ± 26	1641 ± 5
	2	984 ± 9	869 ± 5
	3	1757 ± 22	1606 ± 23
	4	571 ± 32	807 ± 3
	5	551 ± 7	778 ± 35
	6	1520 ± 223	1786 ± 7
S		Fração 2	LMW
	1	619 ± 24	395 ± 6
	2	759 ± 42	663 ± 8
	3	377 ± 1	380 ± 10
	4	396 ± 17	756 ± 7
	5	335 ± 2	349 ± 2
	6	520 ± 30	363 ± 3
Se		Fração 2	LMW
	1	0,90 ± 0,10	0,94 ± 0,03
	2	2,45 ± 0,20	2,53 ± 0,21
	3	2,96 ± 0,08	2,65 ± 0,24
	4	0,99 ± 0,10	1,90 ± 0,08
	5	1,93 ± 0,15	1,84 ± 0,15
	6	1,32 ± 0,12	0,14 ± 0,01

* média ± desvio padrão, n = 3

Capítulo 6

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Os altos teores lipídicos e protéicos, em torno de 65 e 15 % m/m, respectivamente, dificultaram a digestão da amostra para determinação dos teores totais. A digestão assistida por radiação microondas foi efetuada com ácido nítrico concentrado, mas também se demonstrou a eficácia da digestão empregando-se solução de ácido nítrico 7 mol/L, porém com a adição de um volume maior de ácido.

A determinação do teor total de bário nos digeridos ácidos gerou resultados concordantes usando-se GFAAS ou ICP OES. Contudo, os desvios das medidas foram menores para GFAAS.

Mediante os resultados obtidos na extração seqüencial com base na solubilidade verificou-se que, tal como esperado, o bário se encontra em uma forma insolúvel e indisponível ao organismo humano, não apresentando toxicidade na castanha-do-Pará. A análise termogravimétrica dos resíduos obtidos nas três etapas da extração seqüencial, demonstrou que a suposição da ocorrência das reações de metátese envolvendo compostos insolúveis de bário e carbonato de sódio formando carbonato de bário é coerente e possível.

Considerando-se os elevados teores de enxofre e selênio, formulou-se a hipótese que as formas de bário em castanha-do-Pará seriam compostos insolúveis de selenato ou sulfato de bário. Esses elementos apresentaram perfis semelhantes nos dois modos de extração seqüencial, sendo que obteve-se maior percentual para a fração de compostos solúveis e proteínas, podendo apresentar biodisponibilidade ao organismo. No entanto, enxofre e selênio não estão associados totalmente às proteínas, sendo que 14 e 21 % desses elementos respectivamente, ocorrem na fração LMW, indicando a possibilidade de associação com bário, que por sua vez apresentou um maior teor nessa fração contribuindo para confirmar a hipótese.

A partir de cálculos estequiométricos efetuados para as reações envolvendo a formação das possíveis espécies químicas de bário associadas a enxofre ou selênio conforme os teores obtidos na fração de compostos LMW, constatou-se uma relação direta entre bário e enxofre. Portanto, de acordo com essas considerações e a constante de equilíbrio ($K = 0,58$) envolvida na reação de metátese para a extração em meio alcalino é possível inferir que a principal forma de bário em castanha-do-Pará é composta por sulfato de bário.

Portanto, tal como esperado, apesar do bário estar presente em elevadas concentrações em castanha-do-Pará não há implicações à saúde humana causadas pela ingestão desse alimento. Uma vez, que a principal forma química, sulfato de bário, apresenta baixa solubilidade, não havendo biodisponibilidade de bário ao organismo.

Este estudo demonstra a utilidade da aplicação de procedimentos de fracionamento no preparo de amostras. A crescente importância e evolução de estratégias de fracionamento e especiação química trazem novas vertentes em química analítica com relevantes decorrências para outras áreas do conhecimento.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSO, J. A. Studies of various elements of nutritional and toxicological interest associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts. **J. Agric. Food Chem.**, 52: 5773-5780, 2004.
2. FAIRWEATHER-AIT, S. J. The importance of trace element speciation in nutritional sciences. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 363: 536-540, 1999.
3. CORNELIS, R. et al. **Handbook of elemental speciation: techniques and methodology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.
4. BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **J. Chromatogr. A**, 975: 47-70, 2002.
5. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3ª edição. Weinheim: VCH Publisher, 1999.
6. VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern methods for trace element determination**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.
7. IP, C.; LISK, D.J. Bioactivity of selenium from Brazil nuts for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutr. Cancer**, 21 (3): 203-212, 1994.
8. KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; CARUSO, J. A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Anal. Bioanal. Chem.**, 373: 454-460, 2002.
9. ALEIXO, P. C. **Determinação de ferro e selênio em leite por GFAAS**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos, 2000.
10. LISK, D.J. et al. Absorption and excretion of selenium and barium in humans from consumption of Brazil nuts. **Nutr. Rep. Int.**, 38 (1): 183-191, 1988.
11. CHEN, S. S. et al. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. **Biol. Trace Elem. Res.**, 2: 91, 1980.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS), Concise International Chemical Assessment Document 33. **Barium and barium compounds**. Geneva, 2001.

13. BERMAN, E. **Toxic metals and their analysis**. Londres: Heyden & Son, 1980.
14. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Public Health Service, US Department of Health and Human Services. **Toxicological profiles for barium**. Atlanta, 1992.
15. TUBINO, M.; SIMONI, J. A. Refletindo sobre o caso Celobar. **Quim. Nova**, 30 (2): 505-506, 2007.
16. STOEWSAND, G. S. et al. Deposition of barium in the skeleton of rats fed Brazil nuts. **Nutr. Reports Int.**, 38 (2): 259-262, 1988.
17. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **Barium in drinking-water**. Geneva, 2004.
18. CRESSER, M. S. **Flame spectrometry in environmental chemical analysis: a practical guide**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1994.
19. SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry permanent chemical modifier. **Spectrochim. Acta**, Part B 41 (11): 1157-1165, 1986.
20. VASSILEVA, E.; BAETEN, H.; HOENIG, M. Advantages of the iridium permanent modifier in fast programs applied to trace element analysis of plant samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 369: 491-4950, 2001.
21. SILVA, M. M. et al. Determination of barium in waters by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 9: 861-865, 1994.
22. SCATAMACHIA, D. S. et al. Utilização da mistura Ar/H₂ como gás de purga e Ir como modificador permanente para a determinação de bário em águas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. In: 13^o ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, Niterói: 2005.
23. SCATAMACHIA, D. S. **Explorando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta em superfície metálica para a determinação de bário**. Dissertação (Mestrado

- em Química) - Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2006.
24. TREVIZAN, L. C. **Avaliação das condições operacionais de espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial.** Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos, 2007.
 25. MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W., eds. **Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectroscopy.** New York: VCH Publisher, 1992.
 26. MAURAS, Y.; ALLAIN, P. Determination of barium in water and biological fluids by emission spectrometry with an inductively-coupled plasma. **Anal. Chim. Acta**, 110 (2): 271-277, 1979.
 27. PETRY, C. F.; POZEBON, D.; BENTLYN, F. R. S.; Evaluation of ICP OES applicability for trace element determination in environmental samples. **At. Spectrosc.**, 26 (1): 19-27, 2005.
 28. SZENTMIHÁLYI, K. et al. Metabolic alterations of toxic and nonessential elements by the treatment of *Sempervivum tectorum* extract in a hyperlipidemic rat model. **Toxicol. Path.**, 32: 50-57, 2004.
 29. MÜLLER, C. H. et al. **A Cultura da Castanha-do-Brasil.** Brasília: Embrapa SPI, 1995. Coleção Plantar.
 30. LOCATELLI, M. et al. **Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia.** Rondônia: Embrapa, 2005.
 31. HARRI, L. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** 2ª edição. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. Vol. 1.
 32. VIEIRA, T. M. F. S.; REGINATO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant concentration effect on stability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, 49 (3):1999.
 33. SIQUEIRA, D. S. et al. Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. **Quim. Nova**, 26 (5): 633-640, 2003.
 34. BONELLI, P. R. et al. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil nut shells. **Bioresource Tech.**, 76: 15-22, 2001.

35. SCHUETTE, H. A.; ENZ, W. W. F. Expressed Brazil nut oil. **J. Am. Chem. Soc.**, 53 (7): 2756-2758, 1931.
36. RODRIGUES, J. E. et al. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **J. Supercrit. Fluids**, 34: 223-229, 2005.
37. NILÜFER, D.; BOYACIOĞLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 3375-3379, 2002.
38. STEINER, W. E. et al. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. **J. Agric. Food Chem.**, 40: 2453-2457, 1992.
39. OVERY, D. P. et al. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 69-77, 2003.
40. COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005.
41. KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, 70: 504-511, 1999.
42. KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chem.**, 98: 381-387, 2006.
43. SEGASOTHY, M.; PHILLIPS, P. A.; Vegetarian diet: panacea for modern lifestyle diseases?. **Q. J. Med.**, 92: 531- 544, 1999.
44. MCMANUS, K.; ANTINORO, L.; SACKS, F. A randomized controlled trial of a moderate-fat, low energy diet compared with a low-fat, low-energy diet for weight loss in overweight adults. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, 25: 1503-1511, 2001.
45. SABATÉ, J. Nut consumption and body weight. **Am. J. Clin. Nutr.**, 78: 647-650, 2003.
46. US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Agricultural Research Service. **USDA Nutrient Database for Standard Reference**. Release 19, 2006. Disponível em:
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR19/sr19_doc.pdf> (acesso em junho de 2007).

47. ANTUNES, J. A.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of Navy beans with Brazil nuts. **J. Agric. Food Chem.**, 25 (5): 1096-1098, 1997.
48. MORENO, F. J. et al. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). **Biochim. Biophys. Acta**, 1698: 175-186, 2004.
49. KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. **Talanta**, 66: 153-159, 2005.
50. WROBEL, K. et al. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. **Anal. Bioanal. Chem.**, 375: 133-138, 2003.
51. CHUNHIENG, T. et al. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **J. Agric. Food Chem.**, 52: 4318-4322, 2004.
52. NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Estudo da distribuição de Cu, Fe, Mn e Se em frações protéicas de castanha-do-Pará. 13° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA. Niterói: 2005.
53. RAMOS, C. M.; BORA, P. S. Extraction and functional characteristics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) globulin. **Food Sci. Tech. Int.**, 9 (4): 265-269, 2003.
54. SUN, S. S. M.; LEUNG, F. W.; TOMIC, J. C. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein. **J. Agric. Food Chem.**, 35: 232-235, 1987.
55. SUN, S. S. M.; ALTENBACH, S. B.; LEUNG, F. W. Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protein in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Eur. J. Biochem.**, 162: 477-483, 1987.
56. PASTORELLO, E. A. et al. Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. **J Allergy Clin. Immunol.**, 102: 1021-1027, 1998.
57. RIDOUT, S. et al. The diagnosis of Brazil nut allergy using history, skin prick tests, serum-specific immunoglobulin E and food challenges. **Clin. Exp. Allergy**, 36: 226-232, 2006.

58. MORENO, F. J. et al. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. **FEBS J.**, 272: 341-352, 2004.
59. TU, H. M.; GODFREY, L. W.; SUN, S. S. M. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. **Plant Mol. Biol.**, 37: 829-838, 1998.
60. STREIT, L. G. et al. Association of the Brazil nut protein gene and Kunitz Trypsin inhibitor alleles with soybean protease inhibitor activity and agronomic traits. **Crop Sci.**, 41: 1757-1760, 2001.
61. PASTORELLO, E. A. et al. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. **Allergy**, 67: 45-47, 2001.
62. CLARK, R. G.; NURSTEN, H. E. Volatile flavour components of Brazil nuts *Bertholletia excelsa* (Humb. and Bonpl.). **J. Sci. Food Agric.**, 27: 713-720, 1976.
63. RITTER, M. M. C.; SAVAGE, G. P. Soluble and insoluble oxalate content of nuts. **J. Food Comp. Anal.**, 20: 169-174, 2007.
64. VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **J. Agric. Food Chem.**, 54: 4705-4714, 2006.
65. VONDERHEIDE, A. P. et al. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 5722-5728, 2002.
66. SHEFFIELD, M. C.; NAHIR, T. M. Analysis of selenium in Brazil nuts by microwave digestion and fluorescence detection. **J. Chem. Educ.**, 79 (11): 1345-1347, 2002.
67. SECOR, C. L.; LISK, D. J. Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. **J. Food Saf.**, 9: 279-281, 1989.
68. CHANG, J. C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, 30 (4): 801-802, 1995.
69. DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 385: 1304-1323, 2006.

70. ZINGARO, R. A.; COOPER, W. C. **Selenium**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1974.
71. PARIZEK, J.; OSTADALOVA, I. The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. **Experientia**, 23 (2): 142, 1967.
72. GAILER, J. et al. Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. **Chem. Res. Toxicol.**, 13: 1135-1142, 2000.
73. CABRERA, C. et al. Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. **Sci. Total Environ.**, 308: 1-14, 2003.
74. SHIRAIISHI, K. Dietary intakes of eighteen elements and ^{40}K in eighteen food categories by Japanese subjects. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, 266 (1): 61-69, 2005.
75. SMITH, K. A. The comparative uptake and translocation by plants of calcium, strontium, barium and radium – I. *Bertholletia excelsa* (Brazil nut tree). **Plant and Soil**, 34: 369-379, 1971.
76. BULL, R. K.; SMITH, T. J.; PHIPPS, A. W. Unexpectedly high activity of ^{228}Th in excretion samples following consumption of Brazil nuts. **Radiat. Prot. Dosim.**, 121 (4): 425-428, 2006.
77. PENNA-FRANCA, E. et al. Radioactivity of Brazil nuts. **Health Phys.**, 14 (2): 95-99, 1968.
78. GABAY, J. J.; SAX, N. I. Retention of radium due to ingestion of Brazil nuts. **Health Phys.**, 16 (6): 812-813, 1969.
79. KRUG, F. J., ed. **Métodos de Preparo de Amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. VI Workshop sobre Preparo de Amostras. Santa Maria, 2006.
80. TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **Pure Appl. Chem.**, 72 (8): 1453-1470, 2000.
81. BODO, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Anal. Bioanal. Chem.**, 377: 32-38, 2003.

82. INFANTE, H. G. et al. Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection. **J. Anal. At. Spectrom.**, 19 (12): 1529-1538, 2004.
83. FRESCHI, G. P. G.; NOGUEIRA, A. R. A. Especificação química de Se empregando HPLC-UV-HG-ICP OES. X ENCONTRO NACIONAL SOBRE CONTAMINANTES INORGÂNICOS, Belo Horizonte: 2006.
84. DUMONT, E. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack?. **Food Chem.** 95: 684-692, 2006.
85. KANNAMKUMARATH, S. S.; WRÓBEL, K.; CARUSO, J. A. Speciation of arsenic in different types of nuts by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 52: 1458-1463, 2004.
86. DUKER, A. A.; CARRANZA, E. J. M.; HALE, M. Arsenic geochemistry and health. **Environ. Int.**, 31: 631-641, 2005.
87. AMINI, M. Arsenic poisoning: not very common but treatable. Shiraz E-Medical Journal, 3 (2), 2002.
88. WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S. S.; CARUSO, J. A. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS. **Anal. Bioanal. Chem.**, 379: 495-503, 2004.
89. MARTELL, A.; SMITH, R.; MONTEKAITIS, R. J. **Nist critically selected stability constant in NIST Standard Reference Database**. Programa eletrônico versão 4.0, 1998.
90. THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGESS, K. The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry. **Spectrosc.**, 15: 33-36, 2000.
91. BROWN, T. L.; LE MAY, H. E. Jr; BURSTEN, B. E. **Química Ciência Central**. Trad. de Horácio Macedo. 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 1999.
92. MENDHAM, J. et al. **Vogel - Análise química quantitativa**. Trad. de Júlio Carlos Afonso, Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. 6ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2002.

-
93. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Trad. de Arthur Germano Fett Neto et al. Porto Alegre: Artmed, 2000.
 94. MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
 95. NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUZA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **J. Braz. Chem. Soc.**, 12 (1): 57-63, 2001.
 96. KARMALI, A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. **Bol. Biotecnol.**, 67: 2-7, 2000.
 97. KUMAREVEL, T.; MIZUNO, H.; KUMAR, P. K. R. Characterization of the metal ion binding site in the anti-terminator protein, HutP, of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Res.**, 33 (17): 5494-5502, 2005.
 98. MCLOUGHLIN, D. et al. Surface complexation of DNA with insoluble monolayers. Influence of divalent counterions. **Langmuir**, 21: 1900-1907, 2005.
 99. WALTER, A.; SIEGEL, D. P. Divalent cation-induced lipid mixing between phosphatidylserine liposomes studied by stopped-flow fluorescence measurements: effects of temperature, comparison of barium and calcium, and perturbation by DPX. **Biochemistry**, 32: 3271-3281, 1993.